



Universidad de Salamanca

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (CSIC-USAL)

Actividad antitumoral del éter-lípido edelfosina en cáncer de mama

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

Josefa Verónica Alonso Pérez

BAJO LA DIRECCIÓN DEL DOCTOR:

Faustino Mollinedo García

Salamanca, 2015

Dr. FAUSTINO MOLLINEDO GARCÍA, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, CSIC-Universidad de Salamanca).

CERTIFICA:

Que Dña. Josefa Verónica Alonso Pérez, licenciada en Biología por la Universidad de Alicante, ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título "Actividad antitumoral del éter-lípido edelfosina en cáncer de mama", y considera que éste reúne originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el Tribunal correspondiente y optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Salamanca, 06 de Julio de 2015



Dr. Faustino Mollinedo García

Director de la tesis

A mi familia,

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Faustino Mollinedo García, la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio así como su apoyo y entusiasmo en todas las fases de este proyecto.

A la Dra. Consuelo Gajate por su apoyo y disponibilidad.

A la Dra. Angels Sierra por acogerme amablemente en su grupo y su colaboración en los estudios de metástasis.

Al Dr. Marco Calzado por su trabajo con los estudios de angiogénesis.

A los Drs. Rogelio Sarmiento, Jesús Perez-Losada, Eugenio Santos y Pedro Lazo por las líneas celulares que me ofrecieron amablemente. A todas las personas del resto de grupos que me prestaron su ayuda cuando la necesité, además de anticuerpos y material diverso a horas intempestivas: Ali, Pili, Carlos, Carmela, Fer, Nacho, Ricardo, Lara, Ana, Edward.

Al Servicio de Patología Molecular Comparada del CIC por el gran trabajo de histología. Telmo y Susana, muchas gracias por vuestro magnífico trabajo y vuestra disponibilidad cuando había tiempo y cuando no. Mamen, muchas gracias por tus análisis de anatomía patológica con los ratoncitos, tu apoyo y tu entusiasmo, y por ensañarme tanto en tan poco tiempo.

A todos mis compañeros de laboratorio, los que están y los que ya se fueron, los que han sido también compañeros de equipo y los que han compartido trabajo, fiesta, conciertos. Muchas gracias a todas y a todos por hacer la vida más fácil y divertida: Rubén, Janny, Xime, Álvaro, Ana Catarina, Mariana, Ros, Sarita, Ale, Adolfo, Amaya.

A la gente del laboratorio 1, que tiene la costumbre de trabajar en festivos y en esos días en los que no hay nadie a quién recurrir. Gracias por vuestro apoyo profesional y moral siempre y a cualquier hora, y por esos momentazos inolvidables en cultivos. Ali, Pili, Carmela, Fer, Ros, Jimeno, Bego muchas gracias por los reactivos y por las carcajadas.

A Ana, la galleguita, la del labo 17, al que se podía ir a cualquier hora porque allí estaba ella. Muchísimas gracias por alegrarme la vida y hacerme reír tanto, en el CIC, en los torneos, en la calle. Tu apoyo y tu cariño for free han hecho que pueda terminar esta tesis con una enorme sonrisa.

Quiero agradecer especialmente a mi compañera de laboratorio, casa, equipo y vida en general, en esta última etapa, Rosu, gracias infinitas por todo lo que has hecho. Sin tu ayuda no habría podido terminar este trabajo. Así que esta tesis también es un poco tuya, ya tienes dos. Muchas gracias por tu apoyo de corazón, y también por esa cocina de autor que te gastas y todas las palabras venezolanas, sin las que ya no puedo expresar las cosas correctamente.

Finalmente quiero agradecer de forma especial todo el apoyo de mi familia en estos años y en los que me trajeron hasta aquí. Esta tesis es también vuestra. Gracias abuela y mamá por todos vuestros sacrificios y esfuerzos, porque han hecho que hoy esté escribiendo esto. Muchas gracias mami por soportar mis ausencias y ayudarme siempre. Eres la mejor del mundo mundial y estoy muy orgullosa de ti. Gracias papá, por creer en mi siempre y animarme a continuar en todo momento. Y finalmente, gracias a mi hermano por estar cuando yo no estaba, por tu ayuda incondicional, tus chistes en los momentos duros, tus ánimos y por ser el mejor hermano del mundo.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	11
1. Cáncer de mama	12
1.1 Epidemiología	12
1.2 Factores de riesgo	15
1.3 Indicadores pronóstico	17
1.4 Tipos de cáncer de mama	21
1.4 Tratamientos en cáncer de mama	26
2. Problemática en cáncer de mama. Resistencias y metástasis	35
2.1 Resistencias a la terapia	35
2.1 Metástasis en cáncer de mama	43
3. Muerte celular	54
3.1 Definición	54
3.2 Tipos de muerte celular	54
3.3 Aspectos morfológicos de la muerte celular	57
Edelfosina y alquilfosfolípidos	62
4.1 Origen y estructura	62
4.2 Mecanismo de acción y vías de señalización implicadas	63
4.3 Incorporación y selectividad	66
4.4 Lipid rafts en cáncer de mama	67
4.5 Actividad antimetastática	68
4.6 Acción antiangiogénica	69
4.7 Estudios de toxicidad y ensayos clínicos	70
CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS	¡ERROR!MARCADOR NO DEFINIDO.
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	
SECCIÓN I: CARACTERIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR	93
1. La edelfosina induce muerte celular regulada en líneas de cáncer de mama	95
1.1 La edelfosina induce una disminución de la viabilidad y la proliferación en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231	95
1.2 La edelfosina induce muerte celular regulada en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231	95

1.4	La acción de la edelfosina es independiente del tipo de cáncer de mama	98
1.6	Caracterización morfológica por microscopía óptica	102
1.7	Análisis de la muerte celular por citometría de flujo	102
1.8	La degradación de DNA inducida por la edelfosina es dependiente de caspasas	110
1.9	La activación de caspasas no es imprescindible para la muerte celular	112
2.	La inhibición de la autofagia sensibiliza las líneas resistentes	114
2.1	La edelfosina induce autofagia	115
2.2	La inhibición de la autofagia aumenta la muerte celular en parte de las líneas celulares	115
	La edelfosina induce un aumento de células en fase G2/M sin afectar al DNA	120
3.1	El tratamiento con edelfosina induce un aumento de la fase G2/M del ciclo celular	121
3.2	El aumento de la fase G2/M no se debe a una parada del ciclo en la fase G2	122
4.	Señalización de la vía AKT-mTOR	¡Error! Marcador no definido.
	SECCIÓN II: ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DEL FENOTIPO METASTÁTICO	130
1.	La edelfosina inhibe la adhesión celular	132
2.	La edelfosina inhibe la migración celular	134
3.	La edelfosina inhibe la invasión	137
4.	La edelfosina inhibe la angiogénesis	139
	SECCIÓN III: ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LA COLONIZACIÓN METASTÁTICA	142
1.	Sensibilidad del panel de líneas metastáticas derivadas de la mda-mb-435	144
2.	Diseño experimental	145
3.	La edelfosina inhibe la colonización metastática	146
3.1	El tratamiento con edelfosina inhibió la colonización metastática en cerebro y pulmones	147
3.2	El tratamiento con edelfosina aumentó drásticamente la supervivencia	148
4.	Estudio histológico	149
	CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	159
I.	Caracterización de la muerte celular en líneas de cáncer de mama	¡Error! Marcador no definido.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

176

REFERENCIAS

179

Capítulo 1:

INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de mama

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por cambios en el genoma que conducirían a la transformación de células normales en células tumorales, con una capacidad de proliferación potencialmente ilimitada y, posteriormente, en células malignas capaces de invadir el tejido y migrar a otros órganos.¹ La formación de un tumor sería pues un proceso multietapa en el que alteraciones genéticas provocan una serie de cambios en la fisiología de la célula. A través de distintos mecanismos, estos cambios van a permitir la adquisición de unas características determinadas como son:

- Autosuficiencia en señales de crecimiento
- Insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento
- Resistencia a la muerte celular
- Capacidad replicativa ilimitada
- Inducción de angiogénesis
- Evasión del sistema inmune
- Desregulación energética
- Invasión de tejidos y metástasis

Estas características funcionales adquiridas por las células tumorales, les permitirían sobrevivir, proliferar y diseminarse a otros órganos.² La adquisición de estas propiedades se vería facilitada por dos características principales relacionadas con las células transformadas como son:

- la inestabilidad genómica y capacidad de mutación, que generaría mutaciones al azar
- y el estado inflamatorio de las lesiones premalignas y malignas, que promovería la progresión tumoral

Existen más de 100 tipos de cáncer, con distintos subtipos dentro de ellos, que pueden encontrarse en distintos órganos específicos. Según las estadísticas mundiales, el cáncer es una de las principales causas de muerte con un total de 8,2 millones de muertes contabilizadas en el año 2012, y una prevalencia de 32,6 millones de personas a los 5 años de diagnóstico.³ Estas cifras hacen imprescindible la búsqueda de nuevos tratamientos y métodos de diagnóstico que puedan llevarnos a mejorar la prevención y la supervivencia

1.1 Epidemiología

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo y la segunda causa de muerte por detrás de las enfermedades cardiovasculares (Figura I1).

En el año 2012 se diagnosticaron 1,67 millones de casos, siendo el 25 % del total de tumores diagnosticados.³

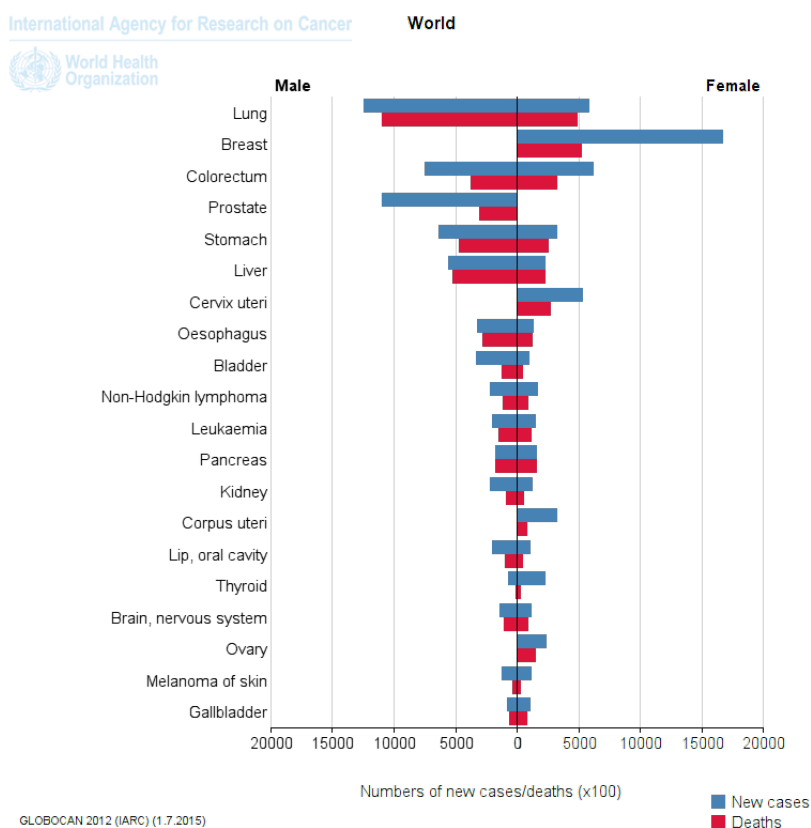


Figura I1: Tasas de incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en el mundo en hombres y en mujeres. Datos de la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) de la incidencia (barras azules) y mortalidad (barras rojas) por tipo de cáncer en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en su último informe GLOBOCAN 2012.

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo si tenemos en cuenta ambos sexos y el tipo de cáncer más común en mujeres, tanto en regiones desarrolladas como en zonas en vías de desarrollo.⁴ En las últimas, el cáncer de mama es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, mientras que ocupa el segundo lugar en los países desarrollados, por detrás del cáncer de pulmón. Existe una gran variación en las tasas de supervivencia entre los países más y menos desarrollados (Figura I2), con una tasa estimada de supervivencia a los 5 años del 80% para las zonas desarrolladas y de un 40% para las regiones más desfavorecidas.⁵ Estas diferencias se deben tanto al diagnóstico temprano como al mejor acceso a tratamientos adecuados en los países desarrollados.

En Europa ha habido una incidencia creciente del cáncer de mama pero a partir de los años 2001-2002, esta tendencia se invierte en países como España, Francia y Dinamarca (Figura I3). Asimismo, a partir del año 1994, empieza a haber una disminución de la mortalidad en España y otros países europeos

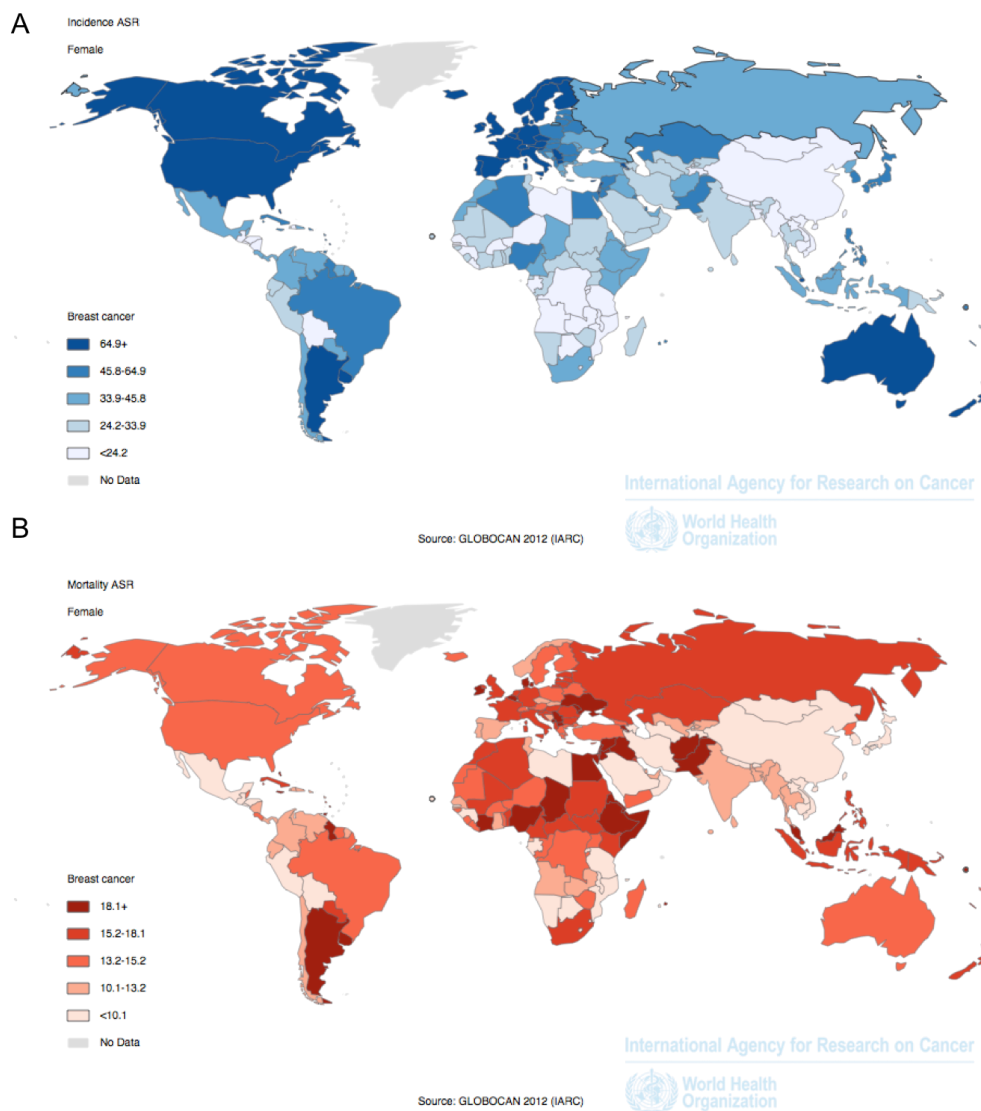


Figura I2: Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en el mundo. GLOBOCAN 2012. ⁴ (A) Incidencia y mortalidad (B) del cáncer de mama a nivel mundial. Escala: número de casos por cada 100000 habitantes y año.

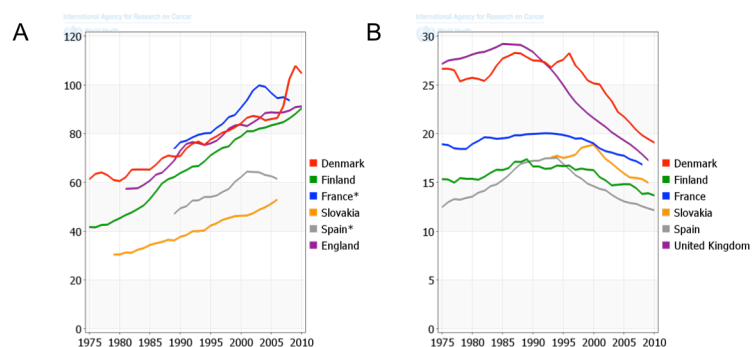


Figura I3: Incidencia y mortalidad por cáncer de mama en países europeos. Curvas de incidencia (A) y mortalidad (B) del cáncer de mama en países europeos. Tasa estandarizada a la edad (ASR) por cada 100000 habitantes. GLOBOCAN 2012⁴.

En España, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres, seguido muy de cerca por el cáncer de colon y pulmón (Figura I4)⁴. También es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres, seguida por los de pulmón y colon. Debido tanto a las mejoras en el diagnóstico precoz como a la implementación de nuevos tratamientos, cada vez se obtienen mejores datos de supervivencia, siendo el tipo de cáncer más prevalente en las mujeres de nuestro país con un 40,8% de los casos.

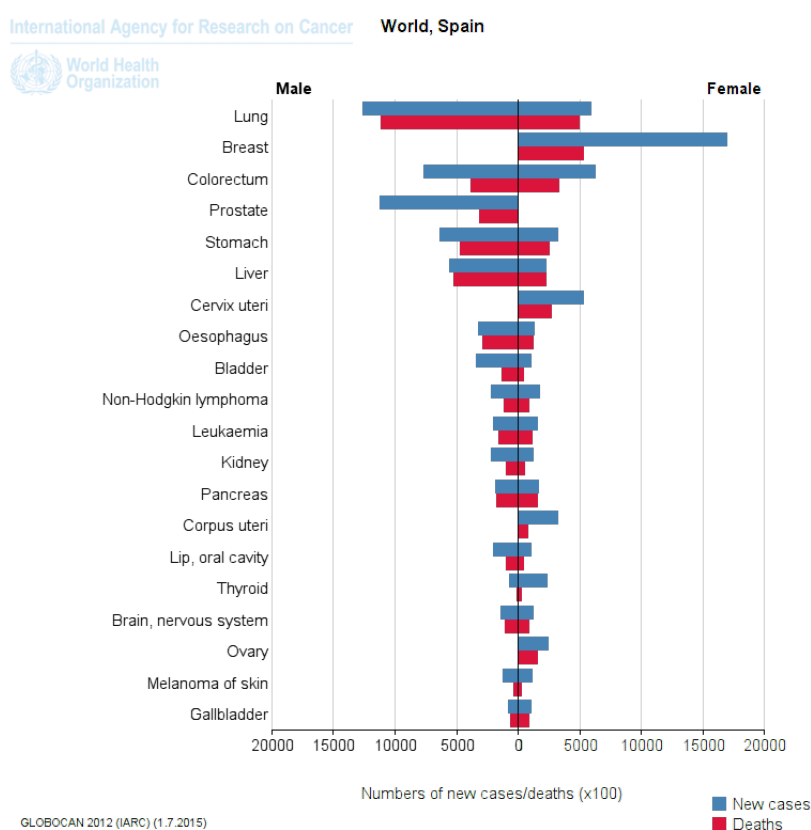


Figura I4: Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en España. Incidencia (Barras azules) y mortalidad (Barras rojas) del cáncer de mama en España. Número de casos o muertes por 100. GLOBOCAN 2012⁴.

1.2 Factores de riesgo

El cáncer de mama es un conjunto heterogéneo de enfermedades con distintas características moleculares y celulares. Desde el punto de vista clínico, esta heterogeneidad se traduce en diferencias en cuanto al pronóstico, el patrón de recaídas y respuesta a los distintos tratamientos. Las causas que dan lugar a los diferentes tipos de cáncer de mama

son desconocidas aunque se han descrito una serie de factores de riesgo.⁶ La edad, factores reproductivos, historial familiar, predisposición genética y factores ambientales se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama.

Edad

El riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta progresivamente con la edad y tiene dos picos, a los 50 y a los 70 años, siendo más agresivos los tumores en mujeres jóvenes y teniendo un mejor pronóstico los tumores en mujeres de mayor edad.⁶

Historia personal

Un factor de riesgo importante es el haber tenido cáncer de mama previamente, ya que aumenta la probabilidad de desarrollar un segundo cáncer de mama contralateral.⁷

Patología de la mama

Las lesiones proliferativas de la mama confieren un riesgo aumentado de sufrir un cáncer de mama, siendo de 1.5 a 2 veces⁸ superior a la población general para las lesiones sin atipias como la hiperplasia ductal y, de 4.3 veces para las hiperplasias con atipias.⁹

Historia familiar

El diagnóstico previo de cáncer de mama en un familiar directo como una madre o hermana, aumenta el riesgo de sufrir cáncer de mama y, es mayor si éste cáncer ocurre en personas de menos de 50 años.¹⁰ Las mujeres con uno, dos o tres familiares de primer grado afectados tienen un riesgo relativo de 1.80, 2.93 y 3.90, respectivamente de desarrollar cáncer de mama.¹¹

Predisposición genética

Un 25 % de las pacientes de cáncer de mama aproximadamente, tienen uno o más familiares afectados también por cáncer de mama, pero solo en el 5 - 10 % de los casos se deben a una herencia autosómica dominante. Una proporción significativa de la susceptibilidad hereditaria se debería a la suma de los efectos de alelos de moderada a baja penetrancia.⁶

Existen tres grupos de genes cuya mutación confiere distintos grados de riesgo de desarrollar cáncer de mama.¹² El grupo de genes de alta penetrancia, que conferirían un riesgo del 40 al 85 %, incluye los genes BRCA1(breast cancer 1), BRCA2 (breast cancer 2) y TP53. Después le seguiría un grupo de riesgo moderado con un 20 a 40 % que incluye a los genes PALB2 (partner and localizer of BRCA2), BRIP1 (BRCA1 interacting protein 1),

ATM (Ataxia telangiectaxia mutated) y CHEK2 (CHK2 checkpoint homolog), y por último habría un grupo de genes cuya mutación conferiría un riesgo menor.

Factores reproductivos

Una serie de factores reproductivos como una menarquia temprana, la nuliparidad y edad tardía del primer embarazo, poco tiempo de lactancia, menopausia tardía y la terapia hormonal sustitutiva, conferirían un riesgo aumentado de sufrir cáncer de mama. Todos tendrían relación con el tiempo de exposición a estrógenos durante la vida de la mujer y el estado de diferenciación del tejido de la mama durante el tiempo de exposición ⁶ a los mismos.

Estilo de vida

Habría una serie de factores de riesgo que estarían relacionados con el estilo de vida y, por tanto serían modificables, como son el consumo de alcohol, la inactividad física, la obesidad y la exposición a radiación. En este sentido, se presentaron varios trabajos en la última conferencia internacional de expertos de St Gallen del año 2013 en los que, evidencias epidemiológicas sugieren que una dieta mediterránea está asociada con una pequeña reducción del riesgo de desarrollar un cáncer de mama.¹³ Algunos meta-análisis recientes han confirmado la asociación entre la actividad física y un riesgo reducido de la incidencia del cáncer de mama, además de con un mejor pronóstico de los tumores diagnosticados.¹⁴

1.3 Indicadores pronóstico

Una serie de características del tumor en el momento del diagnóstico sirven para predecir el pronóstico, el riesgo de recaída y la respuesta al tratamiento. Estas características se denominan indicadores pronóstico y pueden agruparse en tres categorías como son la presencia de receptores hormonales y/o de factores de crecimiento, el grado histológico o de diferenciación y el estadiaje en función del sistema TNM.

1.3.1 Sistema TNM

La Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) propuso un sistema de estadiaje para las pacientes con cáncer de mama en 1954. Esta clasificación se basaría en el tamaño del tumor primario (T), la presencia o ausencia de células tumorales en los ganglios linfáticos regionales (N) y la existencia de metástasis a distancia (M) ¹⁵ (Tabla I1). Los valores de estos parámetros se relacionan con la respuesta a la terapia y la supervivencia, y cada uno de ellos se clasifica en distintos grados.

Tabla I1: Sistema TNM de estadiaje en cáncer de mama

Tamaño del tumor primario (T)	Afectación de ganglios regionales (N) ¹⁶	Metástasis a distancia (M)
T0: carcinoma in situ	No: no hay afectación ganglionar	M0: no hay metástasis
T1: tumor localizado en la mama inferior a 2 cm	N1: de 1 a 3 ganglios positivos	M1: hay metástasis a otros órganos
T2: tumor localizado en la mama con un tamaño entre 2 y 5 cm	N2: de 4 a 9 ganglios positivos	
T3: tumor mayor de 5 cm	N3: más de 9 ganglios positivos	
T4: tumor de cualquier tamaño, diseminado a otros órgano		

1.3.2 Grado histológico

Los carcinomas invasivos se subdividen morfológicamente de acuerdo a sus patrones de crecimiento y grado de diferenciación.¹⁷ Este último refleja la semejanza entre las células tumorales y sus homólogas epiteliales normales. Esta clasificación se lleva a cabo estudiando el tipo histológico y el grado histológico respectivamente. La mayoría de tumores (60-75%) son carcinomas invasivos de ningún tipo especial o NST por sus siglas en inglés y, raramente se presentan tipos especiales con significancia pronóstica. El grado histológico se basa en el grado de diferenciación del tejido tumoral y se refiere a la evaluación semi-cuantitativa de características morfológicas.

Formación de túbulos o glándulas:

La formación de túbulos y glándulas es una característica histológica que refleja el grado de diferenciación tumoral y su semejanza con el tejido glandular normal de la mama. El grado 1 correspondería a tumores bien diferenciados que se asemejan al tejido mamario normal con un pronóstico más favorable, mientras que los tumores con mayor grado de dediferenciación tendrían un peor pronóstico (Figura I5).

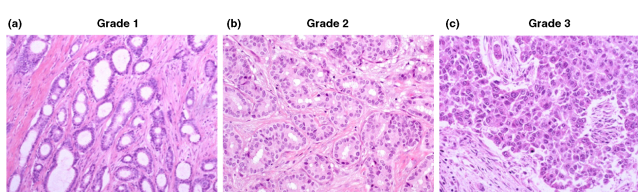


Figura I5: Grado histológico en cáncer de mama. Tumor bien diferenciado o grado 1 (a) con gran homología con el tejido mamario normal, tumor moderadamente diferenciado o grado 2 (b) y tumor poco

diferenciado con alto grado de pleomorfismo nuclear, mitosis frecuentes y escasa formación de túbulos. Ilustración tomada de *Rakha et al. (2010)*.¹⁷

Pleomorfismo nuclear:

El pleomorfismo nuclear es la medida de la diferenciación tumoral a nivel celular y puede dar información indirecta sobre el nivel de aneuploidías, inestabilidad genómica y transcripción (morfología de los nucleolos).

Índice mitótico:

El índice mitótico refleja la proliferación del tumor y es un componente muy significativo a nivel pronóstico del grado histológico.

1.3.3 Presencia de receptores hormonales y/o HER2

La presencia de receptores hormonales como el receptor de estrógeno (ER) o el de progesterona (PR), constituye un factor de buen pronóstico ya que estos tumores pueden responder a la terapia dirigida frente a hormonas como el tamoxifeno.¹⁸ Los receptores de estrógeno y progesterona por sí mismos no representan factores de buen pronóstico, pero predicen una respuesta a la terapia endocrina que sí lo sería. Por ello, la determinación de la presencia de factores hormonales se usa rutinariamente para estratificar a las pacientes.

Receptor de estrógeno (ER)

El receptor de estrógeno se activa tras la unión de hormonas esteroides como el estrógeno y está implicado en procesos como la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, invasión y angiogénesis¹⁹. La inhibición de este receptor aumenta las tasas de curación y mejora la tasa de respuesta a la terapia en enfermedad avanzada, por lo que los tumores positivos para ER son susceptibles de tratamiento con terapia antiestrogénica.

Receptor de progesterona (PR)

El gen del receptor de progesterona está regulado por estrógenos y su expresión depende de la presencia de ER, por lo que raramente se encuentra en tumores negativos para ER. Aproximadamente la mitad de los tumores positivos para ER expresan también PR.²⁰ A pesar de que las pacientes con tumores negativos para PR tienen peor pronóstico que los PR positivos²¹, el beneficio relativo del tratamiento con tamoxifeno es similar en ambos grupos.²² Estudios recientes muestran que el estatus del PR no afecta a la supervivencia de las pacientes tratadas con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa.²³

HER2

HER-2/neu es un proto-oncogén que codifica para un receptor de factores de crecimiento con actividad tirosin quinasa. La sobreexpresión o amplificación del gen para el receptor HER2 está reportada en el 10 al 34 % de los cánceres invasivos. Está implicado en diferentes vías de señalización celular como son proliferación, supervivencia y progresión a través del ciclo celular (Figura I6). HER2 es un factor predictivo de respuesta a las terapias que bloquean la señalización del receptor como el trastuzumab, un anticuerpo monoclonal dirigido frente al receptor, y otros compuestos que bloquean su dimerización.⁶ Es un factor de mal pronóstico tanto en pacientes con ganglios linfáticos negativos como positivos, aunque esto podría cambiar cuando se tengan los datos del beneficio de la terapia con trastuzumab. El trastuzumab en régimen de terapia adyuvante ha mostrado una mejora significativa en el pronóstico de las pacientes al comparar la combinación de quimioterapia con trastuzumab frente a los tratamientos con quimioterapia sola. Basados en estos datos, se les da trastuzumab como terapia estándar a todas las pacientes con tumores HER2 positivos de más de 1 cm.²⁴

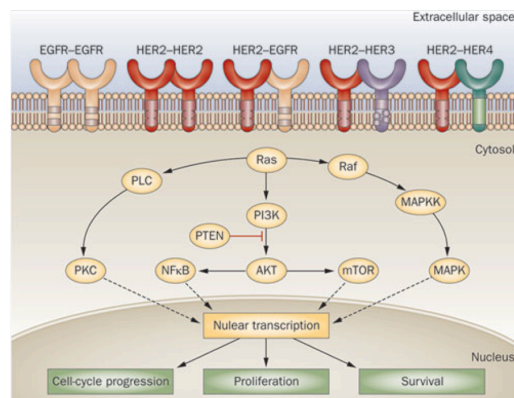


Figura I6: Principales vías de señales reguladas por los cuatro miembros de la familia HER, EGFR (HER1), HER2, HER3 y HER4. Ilustración tomada de Fornaro et al. 2011.²⁵

1.3.4 Tests genéticos de predicción

Existen distintos ensayos genómicos disponibles comercialmente para estudiar el riesgo de recurrencia en los tumores de mama en estadio temprano.⁶ Estos ensayos proporcionan, en general, un estudio del riesgo global de recurrencia proporcionando información pronóstica que puede ayudar a guiar las opciones de tratamiento. De esta forma pueden identificar grupos de pacientes que se beneficiarán de la quimioterapia y grupos de pacientes en los que se podría obviar porque no obtendrían un beneficio significativo.²⁶

Oncotype DX

El test Oncotype DX es un ensayo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que puede llevarse a cabo sobre secciones de tejido incluidas en parafina. Se basa en el análisis de expresión de 21 genes y proporciona una puntuación sobre la probabilidad de recurrencia o “recurrence score (RS)” que se correlaciona con el pronóstico del tumor. Se utiliza en tumores positivos para ER con o sin ganglios positivos y ofrece información sobre el posible beneficio de la quimioterapia en pacientes con riesgo de recurrencia. Una puntuación de <18 se define como bajo riesgo y un RS de >31 se define como alto riesgo de recurrencia.

MAMMAPRINT

Este test estudia el perfil de expresión de un grupo de 70 genes relacionados con la capacidad metastática de los tumores, independientemente del tipo tumoral. Este test clasifica los pacientes en bajo riesgo y alto riesgo de metástasis distantes por lo que es importante en la toma de decisiones en cuanto al tratamiento a seguir.

PAM50

Este test mide la expresión de 50 genes y clasifica los tumores en los subtipos intrínsecos luminal A y B, HER2 y basal-like, además de proporcionar información sobre la proliferación, la expresión de genes luminales y HER2.

1.4 Tipos de cáncer de mama

La gran heterogeneidad del cáncer de mama, tanto genética como clínica, ha llevado al desarrollo de varias clasificaciones con el objetivo de identificar el pronóstico de cada paciente y poder aplicar el tratamiento más adecuado en cada caso.

1.4.1 Clasificación histológica

Desde el punto de vista histológico, el cáncer de mama puede dividirse en carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo o infiltrante. A su vez, el carcinoma *in situ* se puede dividir en ductal y lobulillar según se de en los conductos que transportan la leche o ductos, o en los lóbulos donde se encuentran las glándulas secretoras de leche.

El carcinoma ductal *in situ* (DCIS) es mucho más común que el carcinoma lobulillar *in situ* (LCIS). Tradicionalmente, el DCIS se ha subdividido en función de sus características en Comedo, Cribiforme, Micropapilar, Papilar y Sólido.²⁷ De igual manera, los carcinomas invasivos se pueden clasificar histológicamente en Ductal infiltrante, Lobulillar invasivo, Ductal/Lobular, Mucinoso, Tubular, Medular y Papilar. El carcinoma ductal infiltrante (IDC) es el más común englobando el 70-80 % de todos los tumores invasivos.²⁷ A su vez, el IDC se

puede clasificar en función del grado de diferenciación en bien diferenciado o grado 1, moderadamente diferenciado o grado 2 y pobremente diferenciado o grado 3.

1.4.2 Clasificación molecular

La evaluación de los factores pronóstico no siempre proporciona información sobre la actividad funcional de los receptores de hormonas (ER, PR) o de factores de crecimiento (HER2) ya que pueden haber otras vías de señalización afectando al crecimiento del tumor y a la eficacia del tratamiento. El análisis de perfiles de expresión génica ha permitido el análisis de miles de genes y ha dado lugar a una nueva clasificación a nivel molecular del cáncer de mama. Esta nueva clasificación subdivide los tumores de mama en distintos subtipos con diferencias pronósticas, diferencias en la supervivencia y en la supervivencia libre de enfermedad. *Perou y col*²⁸ analizaron los patrones de expresión génica en el tejido normal y el tejido tumoral de 65 muestras procedentes de 42 pacientes, y seleccionaron 496 genes diferencialmente expresados entre los tipos tumorales dando lugar a cinco subtipos intrínsecos de cáncer de mama. Posteriormente, *Sorlie y col*²⁹ estudiaron si los subtipos intrínsecos de *Perou* tenían relevancia clínica y para ello investigaron los perfiles de expresión génica en 78 pacientes. Los autores vieron que los distintos subtipos presentaban diferencias en cuanto a la supervivencia global, siendo los tumores HER2 y basal-like los que presentaban los tiempos de supervivencia más cortos. El grupo de *Sorlie* subdividió el subtipo luminal en tres subtipos A, B y C, y otros grupos han subdividido el subtipo basal pero desde el punto de vista clínico aún no se tienen en cuenta.

Luminal A

El subtipo Luminal A representa el 50-60 % de todos los tipos de cáncer de mama, presentando bajo grado histológico, bajo grado de pleomorfismo nuclear y baja actividad mitótica. El subtipo luminal incluiría tipos histológicos especiales como el tubular, el invasivo cribiforme, mucinoso y lobular. Los tumores Luminal A se caracterizan por tener altos niveles de ER y bajos niveles de genes relacionados con la proliferación, expresan citoqueratinas luminales como la citoqueratina 8 y 18 y otros marcadores luminales, y genes asociados al ER como *LIV1* (*zinc transporter ZIP6* o *SLC39A6*; *solute carrier family 39 zinc transporter, member 6*), *FOXA1* (*hepatocyte nuclear factor 3 alpha*), *XBP1* (*X-box binding protein 1*), *GATA3* (*GATA binding protein 3*), *BCL2* (*B cell lymphoma 2*), *erbB3* y *erbB4*.³⁰ Se identifican por inmunohistoquímica como ER+ y/o PR+, HER2- y bajo Ki67, teniendo buen pronóstico con la tasa más baja de recaídas.³¹ Las recidivas suelen darse en hueso, habiendo menos de un 10 % de pacientes con metástasis en hígado, pulmón y sistema nervioso central.³²

El tratamiento de los tumores Luminal A suele ser terapia hormonal y tienen una tasa de supervivencia global a los 10 años del 95 % para los tumores en estadio 1, de un 81 % para los tumores en estadio 2, bajaría a un 54 % en estadio 3 y, de sólo un 17 % en el caso de enfermedad metastática.³³

Luminal B

El subtipo luminal B comprende del 15 al 20 % de los tumores de mama y tiene un fenotipo más agresivo que el luminal A, con alto grado histológico, alto índice de proliferación y peor pronóstico. Este tipo de tumores tienen un alta tasa de recurrencia y tasas de supervivencia más bajas después de las recaídas, al compararlo con el subtipo luminal A ³⁴. La principal diferencia estaría en un aumento en la expresión de genes relacionados con la proliferación como *v-MIB* (*avian myeloblastosis viral oncogene homolog*), *GGH* (*gamma glutamyl hydrolase*), *LAPTMB4* (*lysosome-associated transmembrane protein 4-beta*), *NSEP1* (*nuclease sensitive element binding protein 1*) y *CCNE1* (*cyclin E1*). Además, proteínas de rutas de señalización implicadas en proliferación y supervivencia como *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*), *HER1* (*human epidermal growth factor receptor 1*), *PI3K* (*phosphoinositide 3 kinase*) y *Src* (*sarcoma proto-oncogene*) podrían contribuir al peor pronóstico del subtipo luminal B.³⁵ Los tumores luminal B se definen histopatológicamente como:³¹

Luminal B-like (HER2-): ER+, HER2 -, y Ki67 alto o PR negativo o bajo, o riesgo de recurrencia alto en un ensayo de expresión génica.

Luminal B-like (HER2+): ER+, HER2 sobreexpresado o amplificado, cualquier índice de proliferación, con o sin expresión de PR.

La supervivencia global en los tumores luminal B no tratados es similar a la de los tumores basales o HER2 positivos y presentan peor respuesta a la terapia hormonal que los luminal A.³⁶

HER2+

El subtipo HER2+ comprende un 15-20 % de los tumores de mama y está caracterizado por la expresión del oncogén HER2 y genes relacionados con la vía de señalización HER2.³⁷ Son tumores con alta tasa de proliferación, el 75 % son de alto grado histológico y pleomorfismo nuclear, y más del 40 % tienen mutaciones en p53.³⁸ Casi la mitad expresan ER pero generalmente lo hacen a bajos niveles.

Desde el punto de vista histopatológico se definen como HER2 positivos (no luminales), HER2 sobreexpresado o amplificado, y negativos para ER y PR.³¹ Suelen metastatizar a cerebro y órganos viscerales teniendo tradicionalmente mal pronóstico,³⁹ aunque las terapias anti-HER2 posiblemente mejoren este dato.³² Teniendo en cuenta estas terapias,

este subtipo tumoral tendría una supervivencia global estimada a los 10 años del 95 % en estadio 1, del 86 % en estadio 2, del 75 % en estadio 3 y del 15 % en el caso de diseminación metastática.³³

Basal o Triple Negativo

El subtipo basal representa un 10 % aproximadamente de los subtipos de mama y está asociado a mal pronóstico. Los tumores basales son de alto índice mitótico, tienen un alto grado histológico y pleomorfismo nuclear, presentan poca formación de túbulos y tienen infiltrado linfocítico.⁴⁰ La mayoría son tumores ductales infiltrantes con mal pronóstico y alta tasa de metástasis a pulmón y cerebro.³²

Los tumores basales suelen expresar citoqueratinas basales como la citoqueratina 5, 14, 17 y laminina. Sobreexpresan caderina P, fascina, caveolinas y EGFR (epidermal growth factor receptor).⁴¹ No expresan receptores hormonales ni HER2 por lo que se denominan triple negativos. Presentan mutaciones en p53 y retinoblastoma por lo que tienen gran inestabilidad genómica. También presentan una expresión anormal de integrinas que podría contribuir a su comportamiento agresivo y progresión. Algunos genes relacionados con el subtipo basal se han implicado en proliferación, supervivencia, migración e invasión. Comparten otras vías desreguladas en otros tipos de cáncer como MAPK, PI3K, Akt y NF- κ B. También se ha observado acumulación de beta-catenina por lo que se está estudiando como posible marcador y diana terapéutica.

El subtipo basal comprende el 75 % de los tumores relacionados con mutaciones en el gen BRCA1 (breast cancer 1) y serían susceptibles de terapia con inhibidores de PARP, debido a los defectos en sus mecanismos de reparación del DNA. Es importante clarificar que los términos triple negativo y basal no son completamente sinónimos aunque hay un solapamiento del 80 %. El término basal se refiere a una serie de características obtenidas por perfiles de expresión génica y el término triple negativo se refiere a la ausencia de receptores hormonales y HER2 desde el punto de vista inmunohistoquímico.

El subtipo basal ha sido subclasificado a su vez en varios subtipos con diferencias pronósticas, pero estas clasificaciones todavía no se tienen en cuenta desde el punto de vista clínico para estratificar a las pacientes ni para variar los tratamientos. Pietenpol y *col.* identificaron 6 subtipos dentro del grupo de tumores triple negativo analizando 21 bases de datos de cáncer de mama:⁴² 2 basal-like (BL1 y BL2), 1 inmunomodulador (IM), 1 mesenquimal (M), 1 tipo Luminal Androgen Receptor (LAR) y 1 mesenquimal-like (MSL) o claudin-low,⁴² con un pronóstico intermedio entre los subtipos basal y luminal.⁴³ El tratamiento farmacológico de líneas celulares de cada subtipo permitió establecer susceptibilidades a drogas contra rutas de señalización determinadas como por ejemplo, cisplatino para los subtipos BL1 y BL2 o inhibidores de PI3K/mTOR en M y MSL.

Los tumores triple negativos tienen una supervivencia global a los 10 años del 90 % en estadio 1, del 70 % en estadio 2, baja a un 37 % para los estadio 3 y es de solo un 11 % en los tumores metastáticos.³³

Normal-like

Estos tumores constituyen aproximadamente el 5-10 % y están poco caracterizados. Se agrupan con los fibroadenomas y el tejido normal en la clasificación de subtipos intrínsecos de *Perou*. Se cree que pudieran ser el resultado de un artefacto por contaminación con tejido normal y no se tiene en cuenta desde el punto de vista clínico.

Las características histopatológicas de los distintos subtipos intrínsecos estarían resumidas en la siguiente tabla:

Tabla I2: Definición de los subtipos intrínsecos en cáncer de mama. Conferencia de St Gallen, 2013 ³¹.

Subtipo intrínseco	Definición clinico-patológica
Luminal A	<p>“Luminal A-like” son todos los tumores con:</p> <p>ER y PR positivo</p> <p>HER2 negativo</p> <p>Ki67 bajo o riesgo de recurrencia bajo en test genético si está disponible</p>
Luminal B	<p>“Luminal B-like (HER2 negativo):</p> <p>ER positivo</p> <p>HER2 negativo</p> <p>Y al menos una de las siguientes,</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ki67 alto - PR negativo o bajo - riesgo de recurrencia alto en test genético <p>“Luminal B-like (HER2 positivo):</p> <p>ER positivo</p> <p>HER2 sobreexpresado o amplificado</p> <p>Cualquier Ki67 y cualquier PR</p>
HER2	<p>HER2 positivo (no luminal)</p> <p>HER2 sobreexpresado o amplificado</p> <p>ER y PR negativos</p>
Basal-like	<p>Triple negativo (ductal)</p> <p>ER y PR negativos</p> <p>HER2 negativo</p>

ER: receptor de estrógenos, PR: receptor de progesterona, HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

1.5 Tratamientos en cáncer de mama

En la conferencia internacional de St Gallen del pasado año 2013, se revisaron aspectos básicos de la terapia local y regional del cáncer de mama en estadio temprano.³¹ Existe una tendencia a disminuir la cirugía extensiva de la axila y a disminuir la duración de la radioterapia. Se redefinió la clasificación y el tratamiento de los tumores luminales en ausencia de sobreexpresión o amplificación del oncogén HER2 y se mantuvieron las recomendaciones de la anterior conferencia de 2011, para la terapia sistémica adyuvante en los tumores HER2 y triple negativo, aunque solo la duración del tratamiento con trastuzumab obtuvo el acuerdo mayoritario de todos los expertos.

1.5.1 Cirugía del tumor primario

En las últimas décadas se ha evolucionado a una cirugía más conservadora y a la biopsia del ganglio centinela siempre que sea posible, frente a la extracción de toda la cadena ganglionar. El objetivo de la cirugía es eliminar cualquier masa tumoral detectada en la mama o los ganglios linfáticos regionales. El riesgo de recidiva locorregional está relacionado con la agresividad del tumor y esto se ve reflejado en el subtipo intrínseco del tumor. En este sentido, los últimos estudios no muestran evidencias de que una cirugía más agresiva minimice el riesgo de recaída,⁴⁴ aunque la terapia sistémica descende la tasa de recurrencia locorregional.⁴⁵ En los casos en los que se opte por cirugía conservadora, el panel de expertos de St Gallen concluyó que, las contraindicaciones serían márgenes positivos detectados por histopatología ⁴⁶ y la incapacidad de la paciente de recibir radioterapia.⁴⁷

En cuanto a la cirugía de la axila, se presentaron nuevos datos sobre el papel y la necesidad de la disección axilar completa, después de un diagnóstico positivo del ganglio centinela. El ensayo IBCSG 23-01 no encontró beneficio en la disección axilar de pacientes con micrometástasis en uno o más ganglios centinela ⁴⁸ y hubo un creciente consenso en omitir la cirugía de la axila en otros pacientes similares.

1.5.2 Radioterapia

La terapia con radiación es una forma bien establecida de tratamiento en cáncer ⁴⁹, aunque sus efectos no son específicos de las células tumorales dañando también el tejido que rodea el tumor.⁵⁰ Se intenta localizar la radiación en el foco tumoral y optimizar la dosis para matar preferentemente a las células cancerosas sin exponer las células normales. La radiación

puede dañar directamente las estructuras atómicas de los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, además de producir un daño indirecto mediante la exposición a radicales libres producidos en la radiolisis del agua.⁵¹ Ambos efectos producirán roturas en el DNA que llevarán a la acumulación de daño génico y posterior muerte celular. Se estima que 1 Gy puede producir entre 20 y 40 roturas de doble hebra (DSBs)⁵² por célula, y que estas roturas llevarían a la muerte celular por apoptosis, o catástrofe mitótica en aquellas células con mutaciones en la maquinaria apoptótica.

La cirugía del tumor primario no elimina por completo los depósitos de células tumorales que puedan quedar en la mama, la pared torácica o los ganglios linfáticos y, son estos remanentes de células tumorales los responsables de las recidivas locorregionales y metástasis distantes. En este sentido, la radioterapia adyuvante o postcirugía reduce el riesgo de recurrencia local y mejora la supervivencia como muestran los resultados del estudio EBCTCG.⁵³ Por otra parte, varios ensayos clínicos presentados en la última conferencia de St Gallen mostraron evidencias que apoyan la radioterapia hipofraccionada en muchos pacientes.⁵⁴ Estos ciclos cortos de radiación en mama completa tendrían ventajas en términos de conveniencia para el paciente y costes.⁵⁵

Otros ensayos han demostrado seguridad y eficacia en determinadas formas de irradiación parcial en pacientes seleccionados. Las principales cuestiones serían la definición de un grupo susceptible y los niveles de variabilidad entre varias técnicas intraoperativas o postoperativas parciales de mama.⁵⁶ Los ensayos ASTRO⁵⁷ y ESTRO⁵⁸ proporcionan guías de actuación similares basadas en factores como la edad, estatus en los genes BRCA 1/2, tamaño tumoral, márgenes, ER, histología, ganglios y terapia neoadyuvante. Un gran número de ensayos clínicos sobre irradiación parcial estarían a la espera de publicarse. Finalmente, la re-irradiación parcial de la mama puede considerarse después de la recurrencia como una alternativa a la mastectomía en algunos casos, aunque todavía no se ha establecido la eficacia y seguridad de esta aproximación.⁶²

1.5.3 Terapias dirigidas

Los tumores que expresan receptores hormonales y/o receptores para factores de crecimiento como HER2, pueden usar hormonas como el estrógeno o factores de crecimiento para activar vías de señalización que les permitan proliferar y sobrevivir. Por ello son susceptibles de ser tratados con terapias dirigidas frente a esos receptores y sus vías de señalización asociadas.⁶⁰

Terapia hormonal

En el caso de los tumores positivos para receptores hormonales, habría tres tipos de terapias hormonales.

- Modificadores selectivos de receptores estrogénicos (SERMs), como el tamoxifeno que se une directamente al receptor de estrógeno y disminuyen su actividad transcripcional. En esta categoría se incluyen compuestos relacionados como el raloxifeno, toremifeno y arzoxifeno.⁶¹
- “Downreguladores” selectivos de receptores estrogénicos (SERDs), como el fulvestrant que se une al receptor de estrógeno e induce su degradación.
- Inhibidores de la aromatasa (AIs), como el letrozol, anastrozol y exemestano que reducen la producción de estrógeno inhibiendo la enzima aromatasa en los tejidos periféricos y en el propio tumor. Los AIs bloquean la conversión de andrógenos adrenales en estrógeno disminuyendo los niveles de estrógeno circulante.

Tanto el estradiol como el tamoxifeno se unen al receptor de estrógenos e inducen su dimerización pero el cambio conformacional que produce el estrógeno es distinto del que produce el tamoxifeno, llevando este último a una transcripción menos eficiente de la mayoría de los genes dependientes de estrógenos. En cambio la eliminación del estrógeno por completo con los inhibidores de la aromatasa, lleva a una ausencia total de la transcripción de estos genes. El fulvestrant en cambio, es un inhibidor competitivo que se une al receptor de estrógenos con una afinidad muy superior al tamoxifeno e inhibe su dimerización, bloqueando la localización nuclear e inhibiendo la transcripción. Además el complejo fulvestrant-ER induce la degradación del receptor llevando a la inhibición de la señalización a través del ER.⁶²

Desafortunadamente, la mayoría de las pacientes desarrollará resistencias a la terapia endocrina ⁶³ durante el tratamiento, sobretodo aquellas con enfermedad avanzada, y una proporción de pacientes tendría ya una resistencia primaria a la terapia hormonal ⁶⁴ en el momento del diagnóstico.

Terapia anti-HER2

Las terapias dirigidas frente al receptor HER2 van encaminadas a inhibir esta vía de señalización, cuya sobreactivación implica la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular, la supervivencia, la angiogénesis, invasión y metástasis.⁶⁵ Los tejidos normales tienen una concentración baja de este receptor en la membrana y, en cambio está sobreexpresado en un 15-20 % aproximadamente de los tumores de mama, de ovario y algunos cánceres gástricos. Esta expresión diferencial hace que las terapias dirigidas frente al receptor sean generalmente eficaces y bien toleradas por los pacientes.³⁷

El trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce el dominio externo del receptor HER2 en la membrana plasmática y bloquea la señalización “downstream” que activa el receptor. Lapatinib funciona de una manera similar inhibiendo la señalización HER2, pero inhibe la actividad tirosin quinasa de EGFR1 (HER1) y HER2, y es útil cuando

se ha perdido el dominio extracelular sobre el que actúa el trastuzumab. Otros fármacos han sido desarrollados para interferir con la señalización de HER2, ya sea inhibiendo directamente al receptor, su heterodimerización con otros receptores, o su actividad tirosin quinasa.⁶⁵

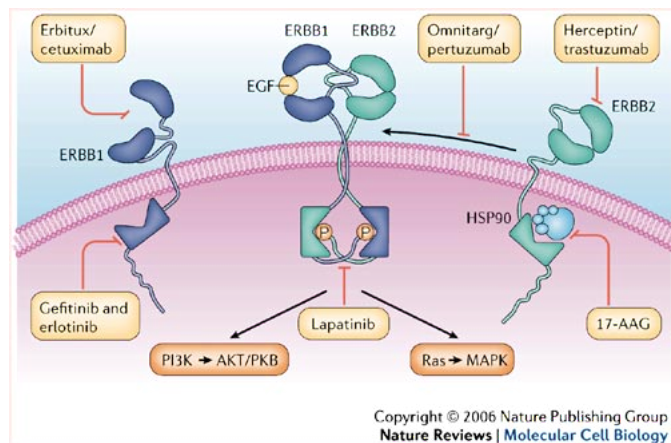


Figura 17: Forma de actuación de distintos fármacos anti-HER2. Tomado de *Citri y Yarden (2006)*.⁶⁵

1.5.4 Terapia citotóxica. Quimioterapia.

Los agentes citotóxicos usados en quimioterapia pueden dividirse en varios grupos en función de su estructura química, origen y mecanismo de acción.⁶⁶

Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes dañan el DNA independientemente de la fase del ciclo celular en que se encuentren las células y hay distintas clases:

Mostazas nitrogenadas: ciclofosfamida (Cytoxan®), clorambucilo, melfalán

Nitrosureas: carmustina, lomustina y estreptocina

Alquilsulfonatos: busulfán

Triazinas: dacarbazina y temozolamida (Temodar®)

Complejos de platino

De acción similar a los agentes alquilantes, inhiben la replicación y la transcripción siendo más efectivos en la fase S del ciclo celular. Destacan el cisplatino, carboplatino y oxalapatino.

Antimetabolitos

Son análogos estructurales de metabolitos celulares y actúan en la fase S del ciclo celular. Interfieren con la síntesis de RNA y DNA disminuyendo la biodisponibilidad de precursores de nucleótidos de purina y pirimidina. Ejemplos de este tipo de compuestos incluyen el 5-fluoracilo, 6-mercaptapurina, capecitabina (Xeloda®), cladribina, clofarabina, citarabina (Ara-C®), floxuridina, fludarabina, gemcitabina (Gemzar®), hidroxurea, metrotexato, pemetrexed (Alimta®), pentostatina, tioguanina

Antibióticos antitumorales

En el grupo de las *antraciclinas*, que se intercalan en el DNA e interfieren con enzimas implicadas en la replicación del DNA, destacarían la daunorrubicina, doxorubicina (Adriamycin®), epirubicina, idarrubicina y mitoxantrona. *Otros antibióticos serían* actinomicina D, bleomicina, mitomicina C

Inhibidores de la topoisomerasa

Interfieren con las topoisomerasas que ayudan a separar las hebras de DNA durante la replicación. Incluyen los *inhibidores de la topoisomerasa I*, topotecan e irinotecan (CPT-11), los *inhibidores de la topoisomerasa II*: etopósido (VP-16) y tenipósido, y la mitoxantrona.

Inhibidores mitóticos

Los inhibidores mitóticos suelen ser alcaloides de la vinca y derivados del tejo. Los alcaloides de la vinca impiden la polimerización de los microtúbulos y los desestabilizan. En cambio los taxanos, compuestos derivados del tejo, promueven la polimerización de los microtúbulos estabilizándolos. Estos agentes funcionan mejor durante la fase S, aunque pueden causar daño en todas las fases del ciclo.

Taxanos: paclitaxel (Taxol®) y docetaxel (Taxotere®)

Epotilonas: ixabepilona (Ixempra®)

Eribulina: análogo sintético de la halicondrina B, una sustancia derivada de una especie de esponja que inhibe la polimerización de los microtúbulos. (Halaven®)

Alcaloides de la vinca: son derivados del arbusto Vinca rosea e incluyen vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®)

Estramustine (Emcyt®)

Otros agentes como la L-asparagina, que disminuye el aporte de L-asparagina a las células tumorales incapaces de sintetizarla y los inhibidores del proteosoma como el bortezomib (Velcade®)

1.5.5 Quimioterapia en cáncer de mama

Los agentes citotóxicos de elección en el tratamiento del cáncer de mama han sido taxanos y antraciclinas combinados con otros compuestos, y combinaciones de estos. Algunas de las combinaciones de fármacos más frecuentes han sido:⁶⁷ CAF (5-fluoracilo, doxorubicina, ciclofosfamida); CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluoracilo); TAC (docetaxel, doxorubicina, ciclofosfamida); TC (docetaxel, ciclofosfamida); AC-taxol (doxorubicina y ciclofosfamida más paclitaxel).

El grupo de colaboración en cáncer de mama EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) se estableció en 1985 para coordinar los meta-análisis de todos los ensayos clínicos con tratamientos adyuvantes. En la conferencia de expertos de St Gallen 2013 se presentaron los resultados de varios estudios del EBCTCG y se vio:⁶⁸

Mayor eficacia de la quimioterapia adyuvante frente a la no quimioterapia

Superioridad en la eficacia de las antraciclinas frente al CMF

Superioridad de los taxanos frente a las antraciclinas

Se encontró un beneficio similar entre las antraciclinas y las combinaciones antraciclinas-taxanos en cuanto a la reducción de la mortalidad, independientemente de la edad, el estadio, el grado histopatológico y el estatus ER.⁶⁹

1.5.6 Inmunoterapia

La inmunoterapia utiliza el sistema inmune del paciente para atacar las células tumorales. Algunos estudios preclínicos y clínicos sugieren que este tipo de tratamientos podrían mejorar el pronóstico de las pacientes con cáncer de mama.⁷⁰

Vacunas terapéuticas

Las vacunas antitumorales están diseñadas para inducir una respuesta inmune contra antígenos específicos del tumor o antígenos asociados a tumor.⁷¹ Existen varios ensayos clínicos en marcha al respecto:

NeuVax (nelepepimut-S o E75):⁷² ensayo clínico fase 3 (PRESENT), cuyo objetivo sería prevenir la recurrencia en pacientes con niveles intermedios o bajos de HER2 después de la cirugía y un riesgo alto de recurrencia.

GVAX:⁷³ consistiría en una vacuna terapéutica hecha con líneas de cáncer de mama irradiadas y modificadas genéticamente para expresar GM-CSF. Estaría siendo testada en un ensayo clínico fase 2 con pacientes de estadio 4 que no sobre-expresan HER2.⁷⁴

Vacuna con el péptido HER2 y trastuzumab en pacientes con estadio 4 y tumores HER2 positivo.⁷⁵

Vacunas peptídicas E39 ⁷⁶ y J65 en pacientes con cáncer de mama que han sido tratados previamente y no presentan evidencias de enfermedad.⁷⁴

Inhibidores de “checkpoint” o puntos de bloqueo

Otra herramienta sería bloquear las vías de señalización que suprimen la respuesta inmune contra el tumor.⁷⁷ Algunos inhibidores de estos puntos de inmunosupresión se estarían ensayando en distintos estudios clínicos.

- a. Combinación de quimioterapia con un inhibidor de la enzima indoleamin 2,3-dioxigenasa, IDO (indoximod) en cáncer de mama metastático.⁷⁸ Esta enzima induce inmunosupresión por parte de las células tumorales.
- b. Anticuerpo agonista de OX40 en pacientes con tumores en estadio 4 que han progresado con terapia hormonal y quimioterapia. OX-40 es una molécula co-estimuladora expresada en las células T que aumenta su supervivencia y sus funciones antitumorales.⁷⁹
- c. Un anti-PD-L1 (ligando de la proteína de muerte celular programada 1) está siendo testado en distintos ensayos clínicos con pacientes con cáncer de mama avanzado, solo y en combinación con otros anticuerpos frente a proteínas inmunosupresoras como anti-CTLA4 (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico) o ipilimumab.⁷⁴ Tanto CTLA4 como PD1 actúan inhibiendo la actividad citotóxica de los linfocitos T.⁸⁰

Terapia con células T

La transferencia de células T sería otro tipo de inmunoterapia en la que las células T extraídas del propio paciente, se modifican genética o químicamente para aumentar su actividad y se re-introducen en el paciente con el objetivo de inducir una respuesta inmune frente al tumor.⁸¹ Varios estudios con estas técnicas que están llevándose a cabo incluyen:⁷⁴

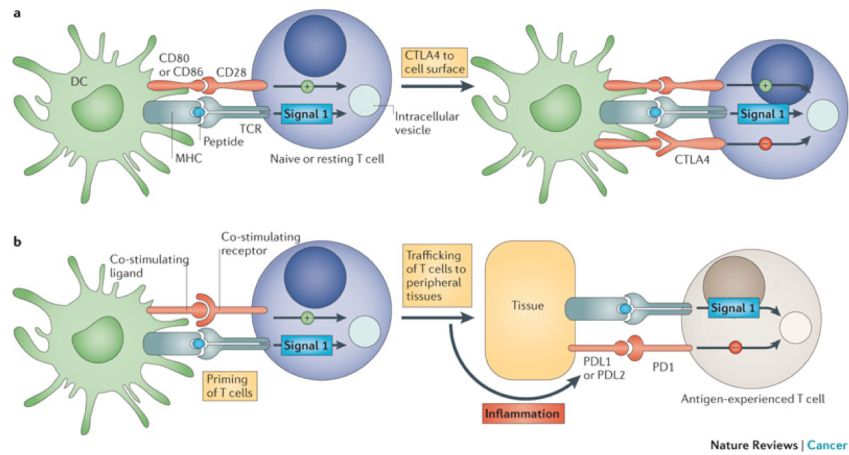


Figura I8: Los “checkpoints” o puntos de control de la respuesta inmune regulan la evolución de la respuesta inmunitaria. El punto de control por CTLA4 se induce en las células T durante la respuesta inicial al antígeno, disminuyendo su actividad. CTLA4 funciona como una señal inhibitoria que mantiene un nivel constante de activación de linfocitos T. Por el contrario, la función de PD1 es regular la respuesta inflamatoria de los linfocitos T en los tejidos, inhibiendo la actividad de estos en respuesta a señales inhibitorias. Ilustración tomada de *Pardoll (2012)* ⁸⁰.

- Células T activadas frente a HER2 en pacientes con cáncer de mama HER2 positivo y metastático.
- Ensayo con células T frente a cMet en tumores metastáticos refractarios a la terapia estandar o tumores operables triple negativos
- Estudio con células T activadas frente al antígeno carcinoembrionario (CEA) en pacientes con cáncer de mama metastático

Anticuerpos

También se están llevando a cabo varios estudios con anticuerpos monoclonales frente a distintos antígenos.⁷⁴ El ensayo CDX-011 (glembatumumab vedotin) utiliza el anticuerpo frente a la glicoproteína NMB, expresada en células tumorales triple negativas, en pacientes con cáncer de mama avanzado triple negativo.⁸² En el ensayo MGAH22 (margetuximab) se estudia un anticuerpo anti-HER2 en pacientes con tumores resistentes a otras terapias.⁷⁴

Limitaciones

Las principales limitaciones de las estrategias inmunes en el tratamiento del cáncer serían:

- toxicidades debidas a fenómenos de autoinmunidad, principalmente debido a la expresión compartida de antígenos diana con el resto de tejidos ⁸³
- dificultad en el mantenimiento de una respuesta potente y duradera en el tiempo ⁸⁴
- solapamiento de vías de señalización inmunosupresoras ⁸⁵

1.5.7 Efectos adversos de los tratamientos

Los efectos secundarios, a corto plazo, más comunes de los tratamientos en cáncer de mama serían anemia, fatiga, pérdida de cabello, alteraciones gastrointestinales y neuropatías.⁸⁶ A largo plazo se han descrito toxicidades derivadas de los diferentes agentes citotóxicos, principalmente en los tratamientos con antraciclinas y agentes alquilantes. Entre los efectos adversos de este tipo destacan:

Toxicidad cardíaca

La cardiotoxicidad es uno de los mayores problemas derivados de la terapia sistémica con antraciclinas en los tratamientos adyuvantes.⁸⁷ La incidencia de la disfunción cardíaca inducida por el tratamiento con antraciclinas aumenta con la dosis administrada, tanto con doxorubicina como con epirubicina. Otros factores de riesgo serían la edad y la enfermedad cardíaca previa. También se ha encontrado toxicidad cardíaca debida al trastuzumab ya que los cardiomiocitos expresan el receptor HER2.⁸⁸

Alteraciones de la función cognitiva y neurotoxicidad

Las alteraciones principales de la función cognitiva incluirían problemas de concentración, problemas de memoria y de coordinación motora.⁸⁹

Tumores secundarios

Las leucemias y síndromes mielodisplásicos asociados con la terapia adyuvante son muy poco frecuentes pero tienen un mal pronóstico.⁹⁰ El periodo de latencia y las anormalidades citogenéticas parecen ser diferentes en función de si los tumores secundarios han sido generados por el tratamiento con doxorubicina o ciclofosfamida.⁹¹ Las leucemias asociadas a agentes alquilantes se presentan entre 5 y 7 años después del tratamiento. Los inhibidores de la topoisomerasa como las antraciclinas pueden dar lugar a leucemias secundarias entre 6 meses y 5 años después del tratamiento.

2. Problemática en cáncer de mama. Resistencias y metástasis

Los avances en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama han conseguido una mejora sustancial en la supervivencia y la calidad de vida de las pacientes. Sin embargo, muchas de ellas desarrollarán distintos tipos de resistencias a la terapia que les llevarán a una progresión de la enfermedad y a la aparición de metástasis.

2.1 Resistencias a la terapia

El desarrollo de resistencias a la terapia es uno de los principales problemas en el tratamiento del cáncer de mama. Aproximadamente el 30% de las pacientes diagnosticadas con cáncer de mama en estadio temprano progresarán a cáncer de mama metastático, para el cual las opciones de tratamiento son limitadas y las posibilidades de curación escasas. Los fenómenos de resistencia pueden darse en cualquier tipo de terapia, tanto en las terapias dirigidas como en los agentes citotóxicos empleados en quimioterapia.

2.1.1 Resistencia endocrina

Aproximadamente un 75% de los tumores de mama expresan en mayor o menor grado receptores de estrógenos y/o progesterona por lo que la terapia endocrina constituye el eje principal de tratamiento en estas pacientes. Sin embargo, la mayoría de pacientes desarrollará resistencias en el curso del tratamiento y en algunos casos, los tumores tendrán una resistencia primaria o *de novo* frente a los tratamientos anti-hormonales⁶³.

Existen distintos tipos de resistencias que están relacionados con las distintas vías de señalización activadas por el receptor de estrógeno.

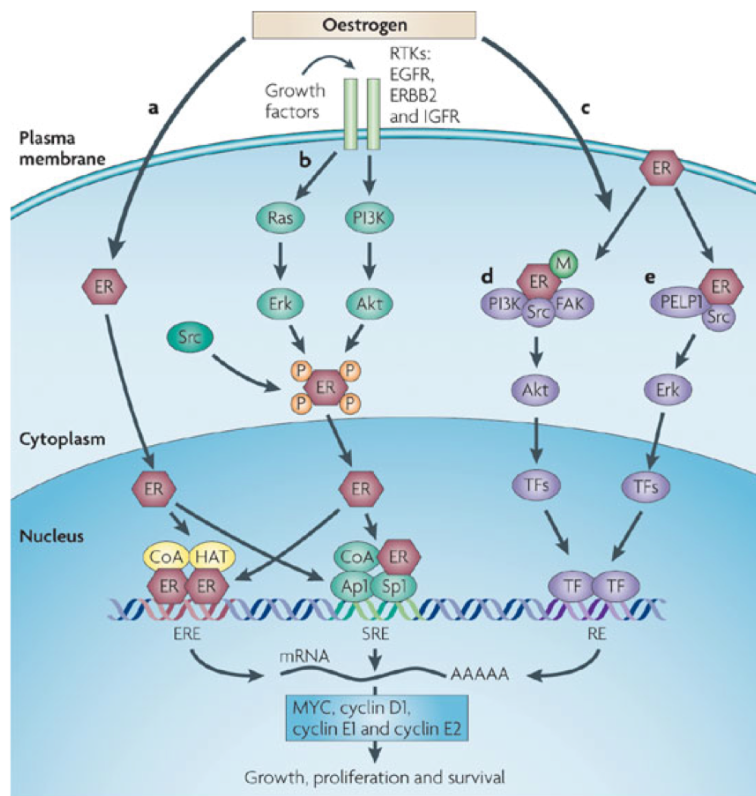
Vía clásica del ER

El estrógeno es una hormona esteoidea que difunde pasivamente a través de la membrana plasmática al interior celular, donde se une al receptor de estrógeno induciendo su dimerización. Una vez activado, el complejo receptor-estrógeno se une a regiones específicas del DNA conocidas como *elementos de respuesta a estrógeno (ERE)* que activan la transcripción de genes implicados en proliferación celular y supervivencia. A su vez, el receptor de estrógeno puede inhibir la expresión de genes pro-apoptóticos y genes implicados en la inhibición del ciclo celular. La actividad transcripcional del ER puede ser regulada por co-activadores que se unen formando complejos como *SRC1 (steroid receptor coactivator-1)* y *SRC2 (steroid receptor coactivator-2)*.⁹² El cambio conformacional que

produciría la unión del tamoxifeno al receptor de estrógeno, llevaría a la unión preferentemente de co-represores que inhibirían la actividad transcripcional provocando efectos antiproliferativos y proapoptóticos.

Vía no canónica del ER

Además de la vía clásica, el ER puede regular la expresión génica a través de su unión a regiones promotoras sin secuencias *ERE*, interactuando con factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B.⁹³



Nature Reviews | Cancer

Figura 19: Vías de señalización a través de las cuales, el receptor de estrógeno regula la transcripción génica. (a) En la vía clásica, el ER unido a su ligando activa la expresión génica, tanto uniéndose directamente en su forma dimérica a las regiones ERE (elementos de respuesta a estrógenos) en complejos con coactivadores e histonas, como a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción que facilitan su unión a regiones SREs (elementos de respuesta a suero). (b) En segundo lugar, ER sería activado por la señalización downstream de receptores tirosin quinasa como EGFR, HER2 e IGFR. La fosforilación del ER por las quinasas ERK y AKT activarían el ER de forma independiente de ligando. (c) En tercer lugar, el ER que puede estar situado en la membrana celular o en el citoplasma, podría activar vías de señalización sin implicar su unión al DNA, que llevarían a la expresión de factores de transcripción (d) y (e). Ilustración tomada de *Musgrove y Sutherland (2009)*.⁹⁴

Actividades no nucleares del ER

La mayoría del ER se localiza en el núcleo pero también puede hallarse en el citoplasma y en la membrana plasmática donde interactúa con receptores tirosin quinasa de factores de crecimiento como EGFR, HER2 o IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor). De esta manera existiría una comunicación entre distintas vías de señalización que resultarían en un aumento de la proliferación y la expresión de proteínas anti-apoptóticas.⁹⁴

La comunicación entre distintas vías de señalización en una misma célula como las vías de respuesta a factores de crecimiento y las rutas activadas por hormonas, permitiría vías de escape a los bloqueos puntuales realizados con las terapias endocrinas. De esta forma las células tumorales tendrían distintas opciones de saltarse estos bloqueos y activar rutas de proliferación alternativas.

La sobreexpresión de receptores tirosin quinasa como HER2 por ejemplo, conferiría resistencia de novo a las terapias antiestrogénicas ya que podría fosforilar directamente al ER y sus co-reguladores, induciendo la expresión génica independiente de ligando aún en presencia de reguladores negativos como el tamoxifeno.⁹⁵ Distintos estudios han visto como las pacientes con sobre-expresión de HER2 no se benefician de la terapia endocrina⁹⁶ y otros estudios han mostrado que la privación de estrógenos induciría la transcripción de receptores como EGFR, HER2 e IGF-1R.⁹⁷ Además la vía de señalización PI3K-Akt-mTOR tendría un papel muy importante en los mecanismos de resistencia endocrina, siendo su desregulación uno de los factores clave en la activación de vías de proliferación y supervivencia.⁹⁸

Para superar todos estos mecanismos de resistencia se están desarrollando nuevas estrategias que tienden a la combinación de distintos fármacos. El objetivo sería inhibir las vías de señalización redundantes y superar los mecanismos de compensación en las células tumorales. Los ensayos clínicos encaminados a superar los mecanismos de resistencia se basan en :

Combinación de inhibidores de ER y receptores tirosin quinasa

Aproximadamente el 50% de los tumores HER2 positivos co-expresan ER y esto estaría asociado a resistencia frente a tamoxifeno y Als. Se han realizado varios ensayos clínicos combinando la inhibición de ambas vías como son el ensayo "TanDEM" (anastrozol frente a la combinación de anastrozol más trastuzumab)⁹⁹, el estudio "eLEcTRA" (letrozol frente a la combinación de letrozol más trastuzumab)¹⁰⁰ y el estudio "EGF30008" (letrozol más lapatinib frente a letrozol)¹⁰¹.

Los tres estudios sugieren que la combinación de inhibidores de HER2 y AI tienen un beneficio sobre la supervivencia libre de progresión frente a la terapia endocrina pero no se han visto mejoras en la supervivencia global ¹⁰².

Combinación de inhibidores de ER y EGFR

La combinación de terapia endocrina con el inhibidor de EGFR gefitinib ha resultado en un beneficio respecto de la supervivencia libre de progresión en pacientes sensibles a tamoxifeno. ¹⁰³

Inhibición combinada del ER y la vía PI3K-Akt-mTOR: Everolimus, Temsirolimus, inhibidores de PI3K

Everolimus es un inhibidor de mTOR y se ha estudiado en combinación con tamoxifeno en el ensayo clínico "TAMRAD" con un beneficio para los pacientes con resistencia adquirida mayor que aquellos con resistencia primaria a los Als. ¹⁰⁴ *Baselga y col* llevaron a cabo el estudio "BOLERO-2" en pacientes que habían progresado con terapia de Als y ensayaron la eficacia de la combinación entre exemestano y everolimus frente a exemestano. Este estudio mostró un beneficio de la combinación de fármacos en cuanto a supervivencia libre de progresión y respuesta clínica entre otros. ¹⁰⁵ Sin embargo no se obtuvo un beneficio en la supervivencia global. ¹⁰⁶

Ensayos clínicos combinando otro inhibidor de mTOR (Temsirolimus) con terapia endocrina no han mostrado beneficios ¹⁰⁷ y se están llevando a cabo distintos ensayos combinando inhibidores de PI3K con Als y trastuzumab. ¹⁰²

Combinación de terapias anti-ER

Los distintos estudios llevados a cabo combinando diferentes terapias anti-estrógenos no han mostrado beneficios en cuanto a supervivencia libre de progresión, supervivencia global o respuesta clínica. ¹⁰²

2.1.2 Resistencia anti-HER2

Como hemos visto, aproximadamente el 20-25% de los tumores de mama sobreexpresan el receptor HER2 y esto les confiere un fenotipo más agresivo que está asociado a un mal pronóstico. Al mismo tiempo, los tumores con sobre-expresión de HER2 también ofrecen la posibilidad de ser susceptibles de tratamientos dirigidos frente al receptor como trastuzumab y lapatinib. A pesar del beneficio clínico obtenido con las terapias dirigidas frente a HER2 ¹⁰⁸, parte de las pacientes sufrirá una progresión de la enfermedad y el desarrollo de

metastásis.¹⁰⁹ Estos datos sugieren que, en este grupo de pacientes, los tumores adquieren o poseen una resistencia intrínseca a la inhibición del receptor HER2.¹¹⁰

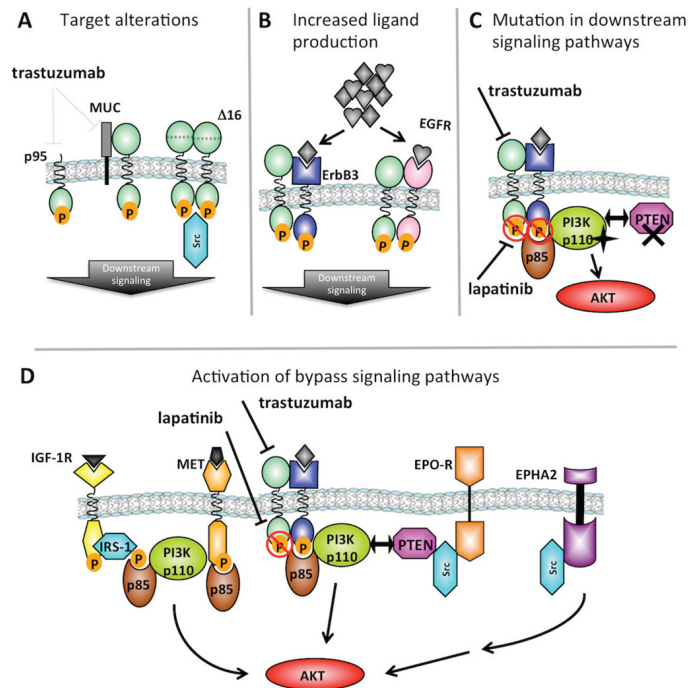


Figura 110: Mecanismos de resistencia frente a la inhibición de HER2. A: Alteraciones en el propio receptor que impiden la unión del trastuzumab como por ejemplo la expresión de isoformas alternativas o la expresión de mucinas que bloquean la unión del anticuerpo. B: Aumento de la producción del ligando permitiendo la señalización a través de otros miembros de la familia de receptores HER. C: Mutaciones que activan vías de señalización downstream como PI3KCA y mutaciones en PTEN o pérdida de expresión de la proteína. D: Señalización a través de vías alternativas como IGF-1R, MET, EphA2 o EPO-R que activan distintos efectores como PI3K-Akt directamente o a través de otras quinasas como Src. Ilustración tomada de Rexer y Arteaga (2012).¹¹¹

Los mecanismos de resistencia frente a la inhibición de HER2 implican alteraciones en el propio receptor, co-expresión o adquisición de vías alternativas de señalización, defectos en los mecanismos de regulación del ciclo celular o la apoptosis y factores que puedan modular la respuesta a la droga. Las evidencias de distintos estudios indican que las combinaciones de terapias anti-HER2 así como, combinaciones con terapias dirigidas a las vías alternativas de señalización pueden ser efectivas superando y previniendo estos mecanismos de resistencia.¹¹¹

2.1.3 Resistencia a la quimioterapia

El desarrollo de resistencias a la quimioterapia es un gran problema en el tratamiento del cáncer de mama, sobre todo en las pacientes con cáncer de mama metastático. Aunque la mayoría de agentes citotóxicos tendrán un efecto sobre el crecimiento del tumor, en la mayoría de los casos no son efectos a largo plazo y la enfermedad progresará. En general, los tratamientos se basan en antraciclinas y taxanos y las tasas de respuesta oscilan entre un 30 y 70% pero las respuestas son de corta duración y los tumores suelen progresar en un periodo de 6 a 10 meses.¹¹²

Las pacientes que han sido tratadas con antraciclinas o taxanos desarrollan resistencias a una o ambas drogas. A menudo, la exposición prolongada a un único agente quimioterápico lleva al desarrollo de resistencias múltiples a compuestos relacionados estructuralmente (MDR, multidrug resistance). En algunos casos, la resistencia MDR puede ocurrir sin exposición previa a la quimioterapia, siendo una resistencia primaria múltiple.

Una vez que el tumor ha desarrollado resistencia frente a los taxanos o las antraciclinas, existen pocas opciones de tratamiento. La mayoría de pacientes con enfermedad refractaria son tratadas con capecitabina como agente único o en combinación, con gemcitabina y vinorelbina.¹¹³ Aproximadamente el 75% de las pacientes no responderán y muchas se volverán resistentes. Las tasas de respuesta a estos agentes en los tumores resistentes a taxanos y antraciclinas oscila entre el 16 y el 25%, y la supervivencia es limitada.¹¹⁴

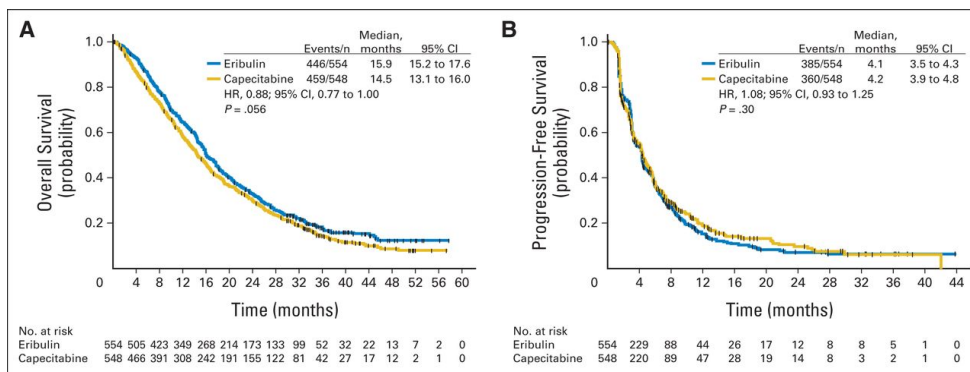


Figura I11: Curvas de supervivencia en un ensayo clínico fase 3 con pacientes de cáncer de mama metastático, previamente tratadas con antraciclinas y taxanos. Comparación de eribulina frente a capecitabina. Gráfico tomado de *Kaufman et al. (2015)*.¹¹⁴

La resistencia a la quimioterapia puede ocurrir a través de distintos mecanismos, incluyendo:

Alteraciones en el metabolismo de la droga

Enzimas como la ALDH1A1 y ALDH3A1 podrían catalizar la detoxificación de la ciclofosfamida y reducir la sensibilidad a este agente.¹¹⁵ Otras enzimas como la Glutathion S transferasa estaría implicada en la detoxificación de agentes alquilantes y cisplatino y la citocromo p450 estaría implicada en la resistencia a taxanos con polimorfismos asociados a una mayor actividad enzimática que reduciría la concentración de la droga en plasma.¹¹⁶

Modificación de la expresión de su diana

Los agentes dirigidos frente a los microtúbulos como los alcaloides de la vinca o los taxanos inhiben la división celular e inducen apoptosis.¹¹⁷ La expresión alterada de isotipos de tubulina β podría estar asociada con la resistencia primaria o adquirida a los agentes que se unen a la tubulina como el paclitaxel.¹¹⁸ Así la sobreexpresión de la tubulina β III estaría asociada a resistencia frente a los taxanos y a progresión de la enfermedad.¹¹⁹

Alteración de los mecanismos de reparación del daño en el DNA

La pérdida de función de proteínas de reparación del DNA como MSH2 y MLH1 resultaría en resistencia a los inhibidores de la topoisomerasa II como la epirubicina, doxorubicina y mitoxantrona.¹²⁰

Cambios en rutas de señalización apoptóticas

Las mutaciones en p53 son un factor de mal pronóstico para la supervivencia en pacientes con enfermedad avanzada y tratadas con ciclofosfamida, metotrexato y fluoracilo, prediciendo resistencia a la terapia y progresión.¹²¹

Expresión de proteínas transportadoras de la droga al exterior celular como P-gp, MRP1 o BCRP

El tratamiento con agentes quimioterápicos podría aumentar la expresión de la proteína P-gp¹²² y este incremento estaría asociado con fallo de la terapia, correlacionándose con un peor pronóstico.¹²³ La proteína MRP1 pertenece a la familia de transportadores de drogas ABC que incluye 7 miembros (MRP1 a MRP7).¹²⁴ MRP1 media la resistencia a agentes como los alcaloides de la vinca, antraciclinas y metotrexato. Algunos estudios correlacionan la expresión de MRP1 con una peor tasa de supervivencia.¹²⁵ Otra proteína transportadora de la familia ABC es la BCRP (breast cancer resistant protein) y estaría implicada en la resistencia a mitoxantrona, antraciclinas, metotrexato e inhibidores de la topoisomerasa I.¹²⁶

Las estrategias para superar las resistencias a la quimioterapia pasan por nuevas combinaciones de drogas y terapias dirigidas en su caso:

- Taxanos más tercera generación de agentes citotóxicos (capecitabina y gemcitabina)¹²⁷
- Combinaciones de agentes citotóxicos de tercera generación: ixabepilona¹²⁸, vinorelbina, gemcitabina, eribulina¹²⁹
- Quimioterapia más combinaciones de terapias dirigidas: combinaciones con trastuzumab, lapatinib más capecitabina,¹³⁰ bevacizumab más capecitabina¹²⁹
- Combinaciones de terapias dirigidas¹²⁹

Tabla 13: Datos de pacientes con cáncer de mama triple negativo metastático. Modificada de André y Zielinski (2012).¹³¹

Agente	Ensayo	Tratamiento	Resultados
Ixabepilona	III	+ capecitabina	PFS 1,7 versus 4,2 meses para la combinación
Bevacizumab	III(ECOG2100, AVADO, RIBBON)	+ quimioterapia	PFS 5,4 versus 8,1 meses para la combinación OS 17,5 versus 18,9 meses para la adición de bevacizumab
Eribulina	III(EMBRACE)	+ TPC	OS 10,6 versus 13,1 meses para la combinación

PFS: supervivencia libre de progresión (progression free survival), OS: supervivencia global (overall survival), TPC: tratamiento clínico de elección (Treatment of physician's choice).

Desafortunadamente las nuevas combinaciones obtienen resultados muy limitados a la ganancia de unos meses en la duración de la respuesta, sin un efecto satisfactorio sobre la supervivencia global y estos resultados se agudizan cuando se trata de tumores triple negativos por la imposibilidad de combinar la quimioterapia con terapia dirigida.¹³²

2.1 Metástasis en cáncer de mama

2.1.1 Metástasis: definición y generalidades

El término “metástasis” fué acuñado en 1829 por Jean Claude Recamier ¹³³ y se define como un proceso multietapa en el que, células tumorales en el tumor primario adquieren una serie de características o propiedades, que les permiten diseminarse a sitios distantes en el organismo y formar tumores secundarios. ¹³⁴

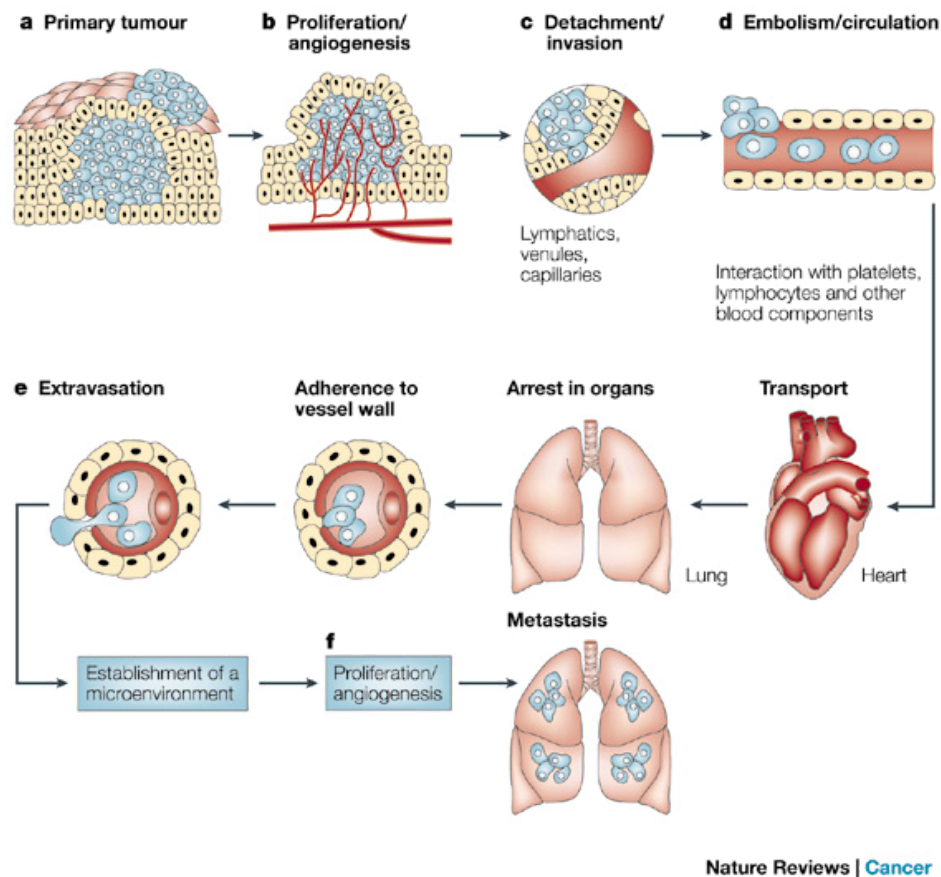


Figura I12: Representación de los pasos sucesivos en el crecimiento del tumor primario y posterior diseminación metastásica. Inicialmente el crecimiento tumoral ocurre gracias a los nutrientes obtenidos por difusión pasiva (a), para después iniciar procesos de angiogénesis cuando los tumores exceden los 2 mm de diámetro (b). Después ocurre la invasión local del estroma (c) y la invasión del endotelio vascular de pequeños vasos sanguíneos o linfáticos (d). Algunas células o grupos de células se sueltan de la pared del vaso y son arrastradas por la circulación siendo destruidas en su mayoría. Las células que sobreviven al transporte son atrapadas en redes de capilares donde se vuelven a adherir a las células endoteliales o a la membrana basal subendotelial que podría estar expuesta. Después las células

extravasas (e) y proliferan en el parénquima del órgano completando el proceso metastático (f). Ilustración tomada de Fidler (2003) ¹³⁴.

La metástasis es un proceso asociado a los tumores invasivos o malignos caracterizados por carecer de una cápsula que los confine, tener una alta tasa de crecimiento, anomalías morfológicas que los diferencian de sus tejidos de origen y capacidad para invadir tejidos. Por el contrario, los tumores benignos están rodeados de una cápsula de tejido conectivo, tienen un crecimiento lento y no invasivo, y son similares morfológicamente a sus tejidos de origen. ¹³⁵

La diseminación metastática es la responsable de más del 90% de las muertes asociadas al cáncer. ¹³⁶ A pesar de los avances en el diagnóstico, aproximadamente entre un 5 y un 10% de las pacientes tendrán metástasis ya en ese momento. Un 30% de las pacientes diagnosticadas con tumores en estadio temprano y ganglios negativos, y un 70% de las pacientes con ganglios positivos progresarán y desarrollarán metástasis a lo largo del tratamiento. Para este tipo de pacientes el pronóstico es pobre con una supervivencia a los 5 años en torno al 20%. ¹³⁷ Por tanto, el cáncer de mama metastático sigue siendo mayoritariamente incurable con tratamientos paliativos encaminados a mejorar la calidad de vida, aliviar los síntomas, prolongar la supervivencia y retrasar la progresión de la enfermedad. ¹³⁷

2.1.2 Progresos en la investigación sobre el proceso metastático

En las siguientes ilustraciones se recogen los hitos más importantes en la investigación de la metástasis desde que se describió el término hasta la actualidad.

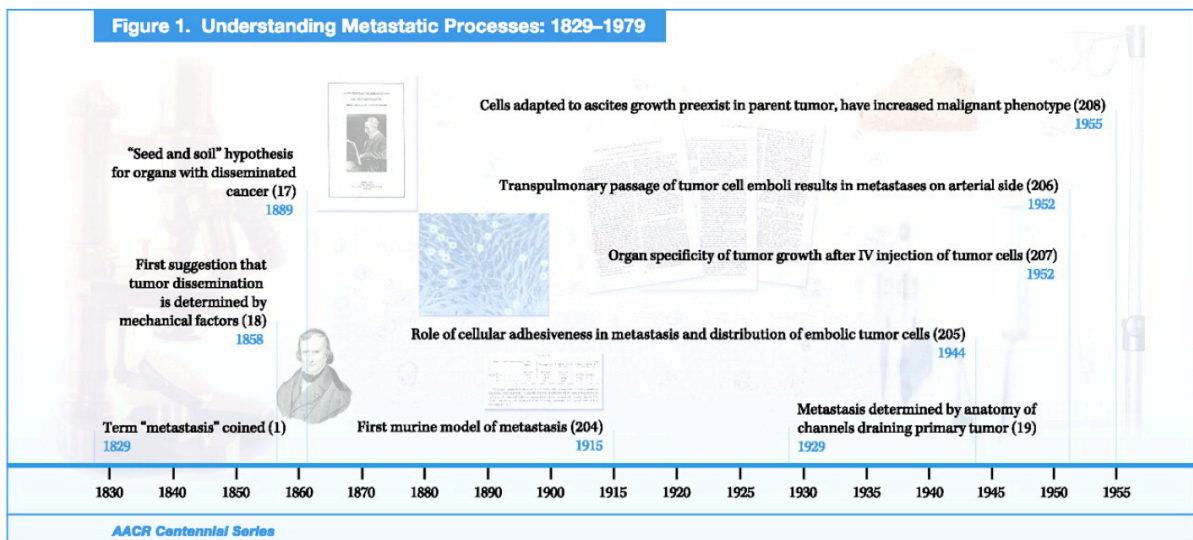
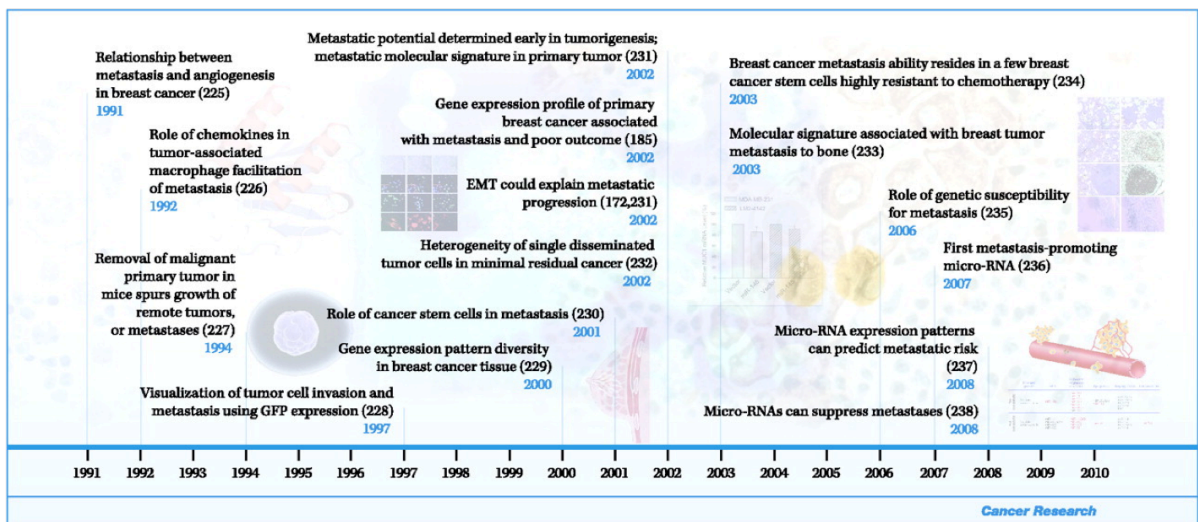
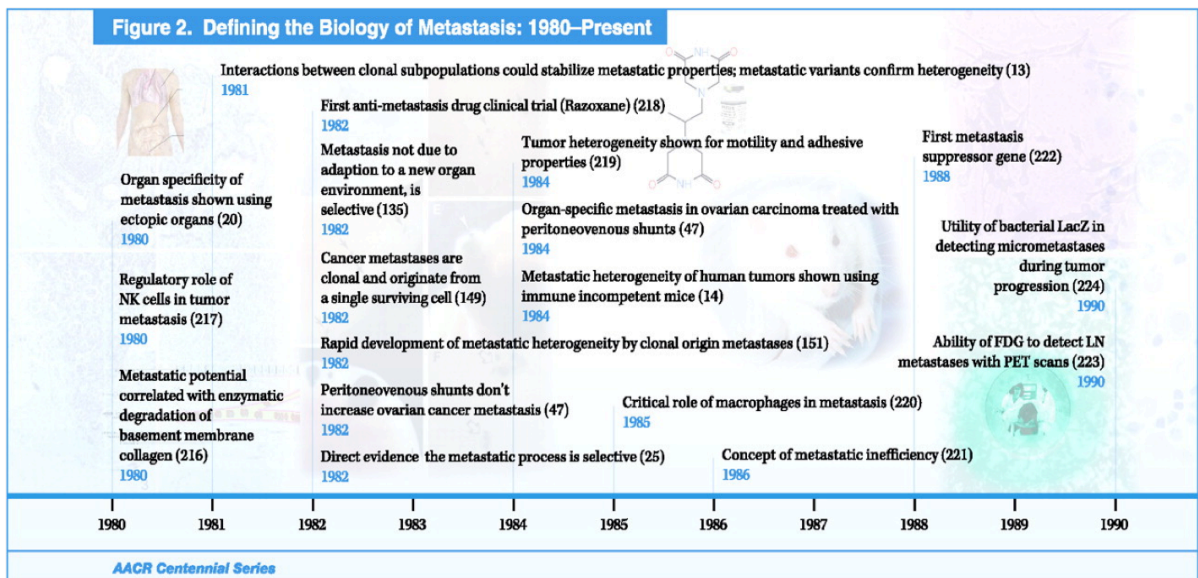
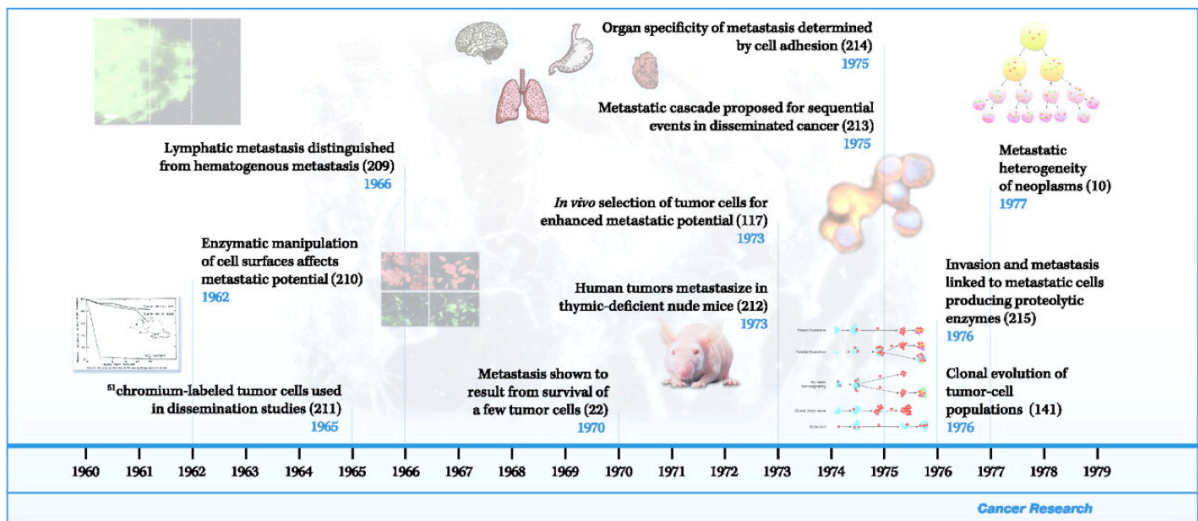


Figura I13: Eventos seleccionados en la historia de la investigación sobre la metástasis tumoral (parte 1). Ilustración tomada de Talmadge y Fidler (2010). ¹³⁵



Figuras I14, I15 y I16: Eventos seleccionados en la historia de la investigación sobre la metástasis tumoral (parte 2, 3 y 4). Ilustraciones tomadas de *Talmadge y Fidler (2010)*.¹³⁵

2.1.3 Cascada metastática

Como hemos visto, el proceso metastático consistiría en una serie de fases denominadas colectivamente cascada metastática, mediante los cuales una célula tumoral consigue abandonar el tumor primario y viajar a través del sistema circulatorio o linfático a sitios distantes en el organismo, en los que formará nuevos tumores secundarios.

La cascada metastática incluiría los siguientes pasos ¹³⁸:

1. Invasión de la matriz extracelular (ECM) y las capas de células estromales que rodean el tumor
2. Intravasación en los vasos sanguíneos o linfáticos
3. Supervivencia y transporte a través del torrente circulatorio
4. Adhesión al epitelio vascular en sitios distantes
5. Extravasación a través del endotelio vascular
6. Supervivencia en el nuevo microambiente para formar micrometástasis
7. Reiniciación de la proliferación para formar nuevos tumores secundarios
8. Colonización metastática

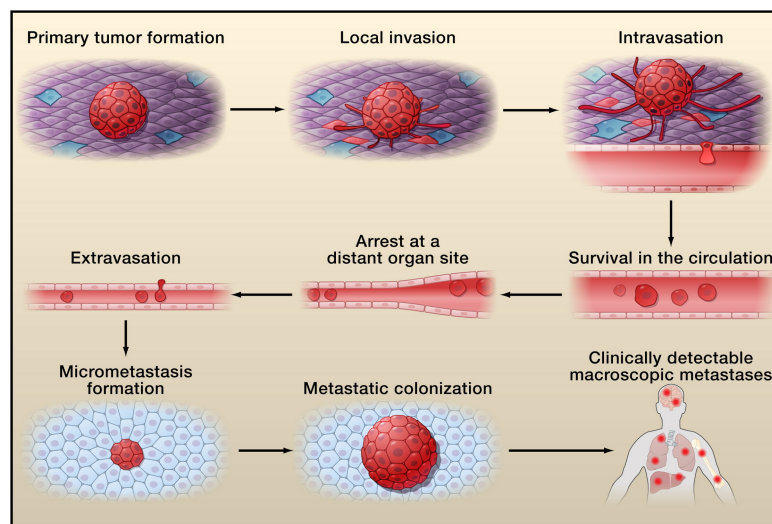


Figura I17: Representación de los distintos pasos en la cascada metastática. Ilustración tomada de *Valastyan y Weinberg (2011)*.¹³⁹

Invasión local

La invasión local implica la entrada de células tumorales en el estroma que rodea el tumor y los tejidos adyacentes. Para ello las células tumorales tienen que romper la membrana basal

y remodelar la matriz extracelular que les rodea para abrirse paso a través de ella. Este proceso implica.¹⁴⁰

- Adhesión a la membrana basal, disgregación de la misma por métodos proteolíticos y mecánicos y posterior migración a través de ella hasta el estroma intersticial, formado mayoritariamente por matriz extracelular, células estromales y fibroblastos. En este sentido se ha descrito que las células de carcinoma invasor de mama presentan una capacidad de adhesión a la laminina, componente fundamental de la membrana basal, 50 veces superior a la de las neoplasias benignas.¹⁴¹
- Adhesión de la célula tumoral a los componentes de la matriz extracelular y degradación de los componentes de la matriz extracelular por enzimas proteolíticos, activadores del plasminógeno, colagenasas, proteoglicanasas y catepsinas.
- Locomoción a través de la matriz extracelular modificada.

Las células tumorales pueden migrar a través de dos mecanismos fundamentales, migración colectiva y migración individual. Ambos programas de locomoción son necesarios y pueden intercambiarse en función de las señales del microambiente.¹⁴² A su vez, las células individuales pueden migrar de forma mesenquimal o ameboide.

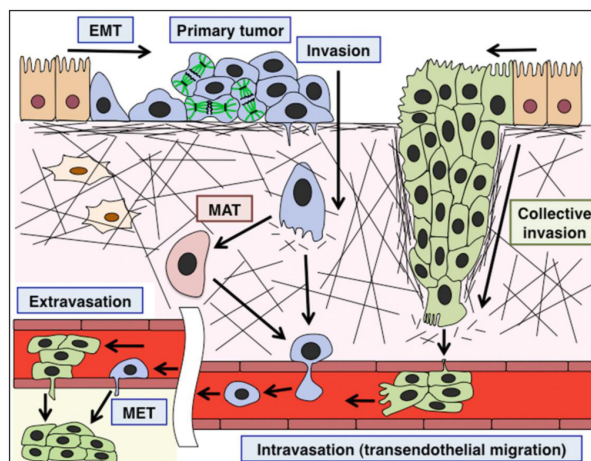


Figura I18: Invasión mediada por transición epitelio-mesénquima (EMT) e invasión colectiva durante la metástasis tumoral. Células epiteliales normales (células naranjas) sufren EMT y forman un tumor primario (células azules). Un grupo de células tumorales primarias invaden y migran hasta un vaso sanguíneo como hebras multicelulares (células verdes) o como células aisladas (células azules y rosa). Después de migrar a través del endotelio vascular en un sitio distante, las células que habían sufrido EMT, sufren el proceso inverso, transición mesénquima-epitelial (MET), para formar un tumor secundario. Durante la migración, pueden ocurrir procesos de transición mesenquimal-ameboide (MAT) e intercambiarse los programas de locomoción. Ilustración tomada de *Kawauchi (2012)*¹⁴³.

Durante la migración colectiva, las células mantienen sus uniones intercelulares a través de la caderina E principalmente, formando unidades multicelulares cohesivas y existe una distribución de funciones en la que las células del polo delantero expresan los programas genéticos que les permiten traccionar y avanzar. En cambio, la migración individual implica la activación de un programa de transición epitelio-mesénquima que les permite separarse de sus células vecinas y migrar en solitario. La migración mesénquimal es dependiente de integrinas, proteasas y fibras de estrés, mientras que la migración ameboide es independiente de integrinas y dependiente de la señalización Rho/ROCK.

Intravasación

La migración transendotelial o intravasación implica la entrada de las células tumorales a la circulación. Aunque se da una diseminación vía linfática, la metástasis vía circulación hematológica representa el mecanismo principal de diseminación.¹³⁶ Las células tumorales deben adherirse y degradar la membrana basal subendotelial para atravesar las paredes de los vasos sanguíneos. Este proceso se facilita gracias a la angiogénesis tumoral, ya que los nuevos vasos que se forman en este proceso mantienen uniones débiles entre las células endoteliales y están en constante reconfiguración.¹⁴⁴

En cáncer de mama, se ha visto que la señalización a través de TGF β aumenta la intravasación, facilitando la migración mesenquimal¹⁴⁵ y, los macrófagos asociados a tumor (TAMs) colaboran con la secreción de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor estimulador de colonias 1 (CSF-1).¹⁴⁶

Supervivencia en la circulación

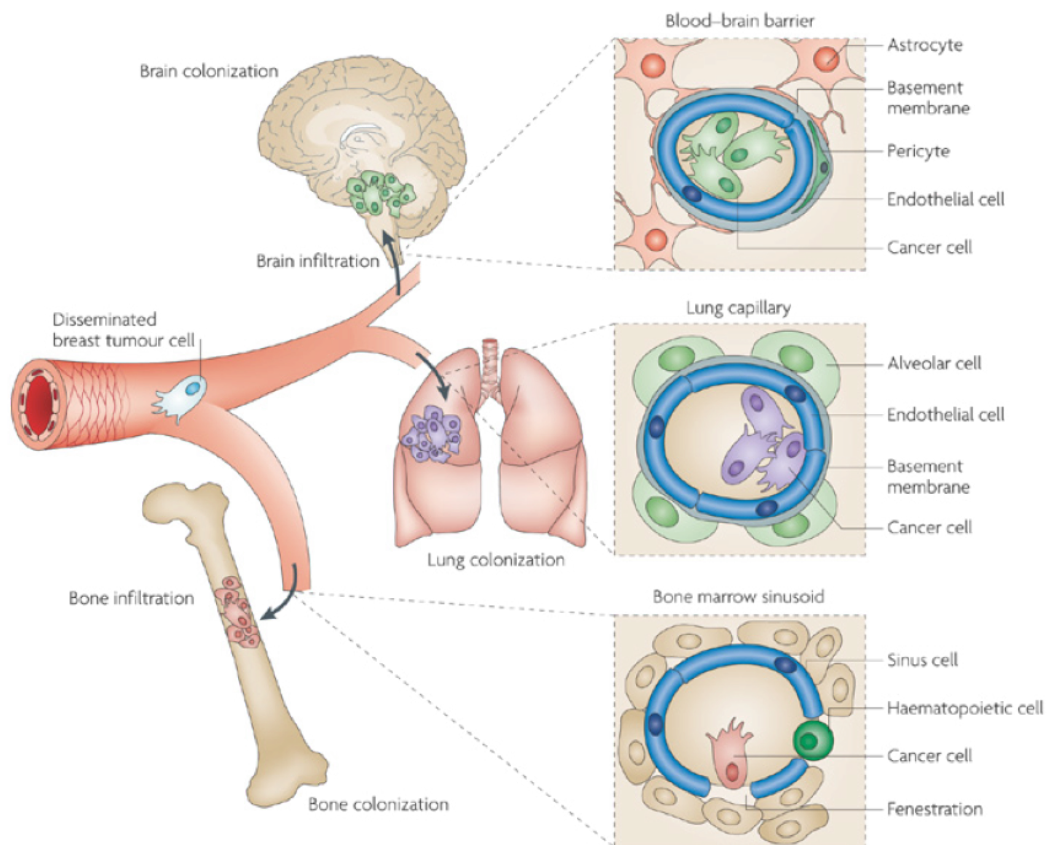
Las células tumorales deben superar una serie de factores de estrés una vez han entrado en la circulación como la falta de adhesión al sustrato. Algunas estimaciones en pacientes de cáncer de mama, apuntan a que el tiempo que pasan las células en circulación podría ser de varias horas.¹⁴⁷ Dado el diámetro de las células de carcinoma (20-30 μm) y el diámetro de la mayoría de capilares (8 μm), la gran mayoría acabaría atrapada en los lechos capilares de los primeros órganos a los que llegan. Esto supondría un espacio de tiempo de minutos desde la intravasación, que les permitiría salvar los posibles mecanismos de muerte inducida por falta de anclaje o anoikis.¹³⁹

Además de la falta de anclaje, las células tumorales deben resistir la presión hemodinámica y el ataque de las células del sistema inmunitario como las “natural killers” (células NK). Para ello, las células tumorales forman agregados con otras células sanguíneas como las

plaquetas y esto les permite sobrevivir en la circulación hasta que se adhieren otra vez al endotelio vascular en tejidos distantes.¹⁴⁸

Adhesión al endotelio vascular en órganos distantes

Después de sobrevivir en la circulación sanguínea, las células tumorales se adhieren al endotelio vascular para migrar a través de él y establecer nuevas metástasis. Una de las cuestiones a resolver sería por qué las células se detienen en unos órganos y no en otros. Existe un patrón de diseminación en función del tipo tumoral mediante el cual, cada tumor metastatiza a determinados órganos y no a otros. El cáncer de mama tiende a propagarse a huesos, pulmones, hígado y cerebro, siendo los dos primeros los órganos más frecuentemente afectados. Las metástasis del cáncer de pulmón tienden a ocurrir en cerebro, huesos y pulmón contralateral. Por el contrario, el cáncer de próstata tiende a metastatizar en huesos y el sarcoma en pulmón.¹⁴⁹



Nature Reviews | Cancer

Figura I19: Potenciales barreras a la metástasis en diferentes órganos diana. Las células de cáncer de mama extravasan a los distintos órganos en función de si tiene o no, las características que permiten superar las distintas barreras endoteliales. La estructura fenestrada de los sinusoides en la médula ósea es más permisiva que la estructura contigua en los capilares pulmonares. Los capilares en el cerebro son más difíciles de penetrar debido a la estructura única de la barrera hematoencefálica. La infiltración de

las células tumorales a través de estas barreras, selecciona aquellas células que expresan las funciones necesarias para la extravasación. Ilustración tomada de *Nguyen et al. (2009)*.¹⁴⁹

Stephen Paget concluyó ya en 1889, que el microambiente local de determinados órganos debía ser favorable a la diseminación de las células tumorales y elaboró la teoría de la semilla y el terreno, “the seed and soil hypothesis”.¹³⁴ En esta teoría, la célula tumoral sería la semilla y el nuevo microambiente que se encontraría al metastatizar, sería el terreno. Este nuevo terreno debería ser favorable para la proliferación de la célula metastática. Ese microambiente del órgano diana sería pues determinante, en la supervivencia de las células que han llegado hasta él. En este sentido, se ha visto que la expresión del receptor tipo 4 de citocina C-X-C (CXCR4) en las células de cáncer de mama, es muy importante para la metástasis en órganos ricos en el factor derivado de célula estromal 1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1), también conocido como citocina 12 C-X-C (CXCL-12), como serían los pulmones.¹⁵⁰ Además, habría un número de genes determinados que facilitarían la colonización metastática de las células de cáncer de mama en hueso¹⁵¹, pulmón¹⁵², cerebro¹⁵³ e hígado.¹⁵⁴

Por otra parte, el patrón de metastásis se vería afectado, no sólo por un microambiente adecuado sino también, por cuestiones anatómicas. La acumulación de las células metastáticas en un órgano dado debido a los patrones de circulación y a restricciones físicas, podría crear un microambiente estromal adecuado para permitir el establecimiento de metástasis en dicho órgano.¹⁵⁵

Extravasación

Una vez adheridas a las células endoteliales o a la membrana basal subendotelial, las células tumorales tienen que ser capaces de atravesar esta barrera física y lo hacen secretando enzimas proteolíticas y factores que modifican la permeabilidad vascular. Las células de cáncer de mama secretan angiopoyetin-like-4 (Angptl4), epiregulin (EREG), ciclooxigenasa-2 (COX-2) y las metaloproteasas MMP-1 y MMP-2 para romper las uniones entre células endoteliales en los pulmones.¹⁵⁶ EREG es un ligando de los receptores EGFR y HER4, induciendo proliferación tras la unión al receptor mientras que, COX-2 induciría proliferación y angiogénesis a través de la formación de prostaglandinas. Por otro lado, la Angptl4 facilita la extravasación de las células de cáncer de mama en los pulmones pero, no puede hacerlo en el hueso ni tampoco puede facilitar la intravasación en los pulmones.

Esta especificidad pone de manifiesto la existencia de programas celulares determinados para llevar a cabo distintas fases metastáticas, en unos microambientes determinados y no en otros.¹⁵⁷

Por otra parte, las células de cáncer de mama reclutarían monocitos inflamatorios en las metástasis pulmonares donde secretarían factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF), promoviendo la extravasación.¹⁵⁸ VEGF, además de ser un factor angiogénico, aumenta la permeabilidad vascular y esto es debido a la destrucción de las uniones adherentes entre las células endoteliales, mediante fosforilación de las proteínas implicadas en estas uniones por quinasas de la familia Src.¹⁵⁹

Reiniciación de la proliferación

Para formar micrometástasis, las células extravasadas deben sobrevivir en el microambiente que encuentran en el nuevo órgano, que difiere del microambiente del tumor primario de dónde proceden en cuanto a la composición de la ECM, tipos de células estromales, etc. La gran mayoría de células permanecerán quiescentes hasta adquirir los programas celulares necesarios que les permitan proliferar en el nuevo ambiente. En cáncer de mama, la quiescencia se ha atribuido a la incapacidad de las células tumorales para activar la quinasa de adhesión focal (FAK)¹⁶⁰, la integrina b1 y la vía de Src.¹⁶¹

Colonización metastática

La capacidad de las células diseminadas para salir de la dormancia o la quiescencia y empezar a proliferar, podría depender de mecanismos para modificar el microambiente y transformarlo en uno más favorable. En este sentido, la activación de las células diseminadas dependería de la movilización de células derivadas de la médula ósea y su reclutamiento a los sitios metastáticos.¹⁶² En algunos casos, estos procesos podrían ser estimulados por señales liberadas por las células tumorales como la osteopontina (OPN) o SDF-1.¹⁶³

Otro factor que podría determinar la proliferación de micrometástasis es la capacidad de las células tumorales para activar mecanismos angiogénicos en el nuevo microambiente tumoral. Un fallo en estos mecanismos inclinaría la balanza proliferación/apoptosis hacia la muerte celular e impediría el crecimiento de las nuevas metastásis.¹⁶⁴ Por tanto, la inhibición de la angiogénesis en los sitios secundarios de metástasis podría ser una herramienta terapéutica para impedir la diseminación metastática. En este sentido, se ha visto que la angiopoyetina-2 (Angpt2) facilita la colonización metastática en cáncer de mama promoviendo la capacidad de las células mieloides derivadas de médula ósea (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs), que están infiltrando el tumor, para inducir angiogénesis tumoral.¹⁶⁵

2.1.4 Modelos animales

Existen distintos modelos in vivo para estudiar el proceso metastático y la elección de cada uno dependería de las preguntas que queramos responder con nuestro estudio y el tiempo del que dispongamos para realizarlo.

Como vemos en la figura 24, los modelos transgénicos (a) engloban el proceso completo desde el inicio del tumor primario al crecimiento de este y la aparición de metástasis espontánea. Proporcionan un estudio completo pero necesitan mucho tiempo, desarrollan múltiples tumores primarios y tienen una distribución limitada de las metástasis.

Los modelos ortotópicos (b) implican la inoculación de las células tumorales en el sitio de origen del tumor, en la glándula mamaria en este caso, y el seguimiento de su crecimiento y formación de metástasis espontánea. También necesita tiempo para generar las metástasis y se pierde la fase de inicio del tumor primario, pero se puede estudiar la cascada metastática entera aunque puede ser necesario extirpar el tumor primario.

Los modelos de metástasis experimental (c) se usan cuando la línea tumoral no metastatiza rápidamente o no se dispone del tiempo necesario para el desarrollo de metástasis y permite estudiar solamente la colonización metastática. Implica la inoculación directa de las células tumorales en la circulación y la vía de inoculación determina el patrón de colonización. Las células introducidas en el sistema venoso por la vena de la cola, se establecerán primero en los pulmones, y las células introducidas en el sistema arterial a través de la inyección en el ventrículo izquierdo del corazón, colonizarán distintos sitios incluido el hueso y cerebro. Las células introducidas en el bazo o la vena portahepática, colonizarán el hígado.

Finalmente, el crecimiento de las células tumorales en un órgano específico puede ser examinado por la inyección directa de las células tumorales en el órgano diana, aunque no se considerarían estudios de metástasis (d).

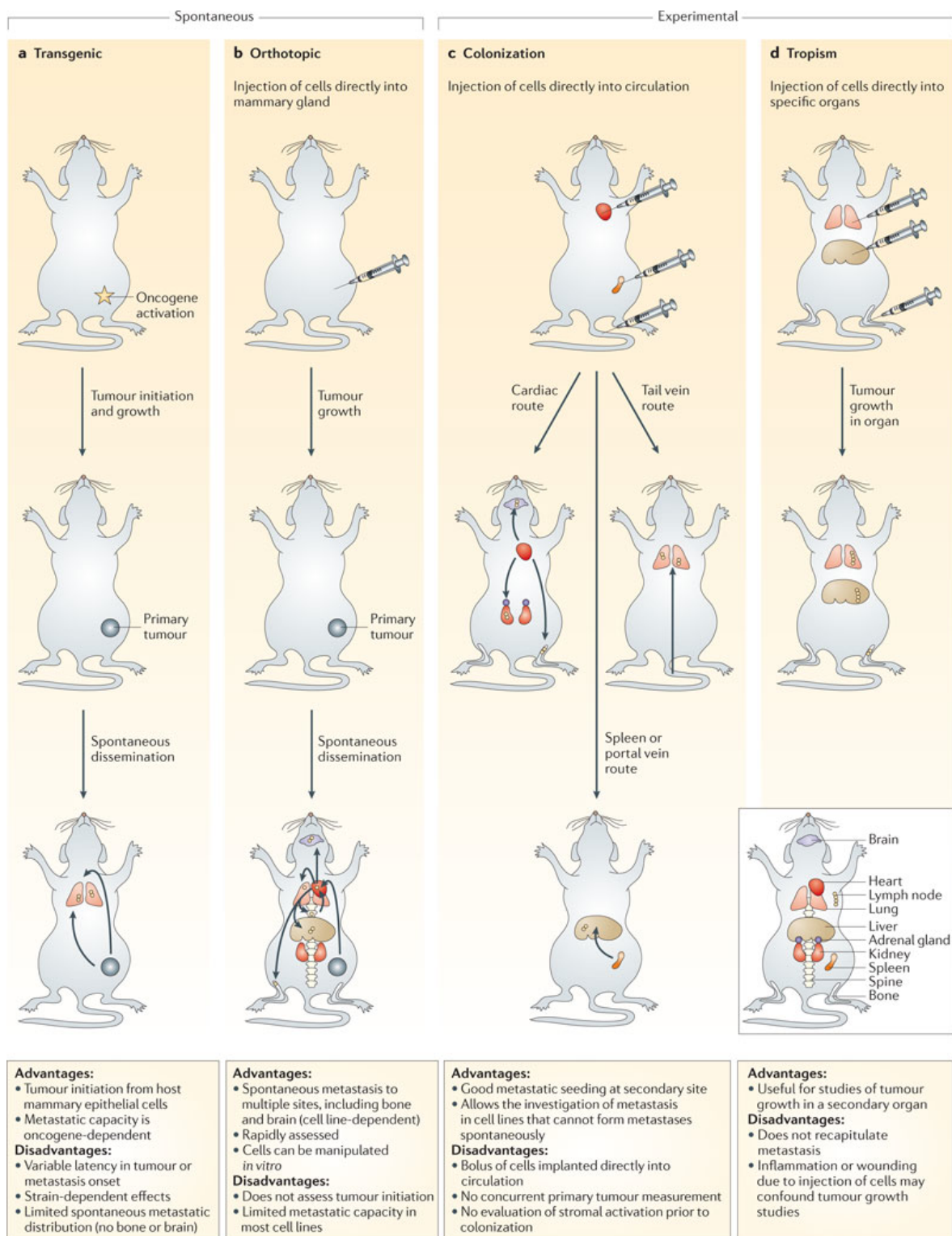


Figura I20: Representación de los distintos modelos en ratón para estudiar las fases de la cascada metastática. Ilustración tomada de *Eckhardt et al. (2012)*.¹⁶⁶

3. Muerte celular

3.1 Definición

La definición de muerte celular y la diferencia entre una célula viva y una célula muerta entraña dificultades y es motivo de debate. Así, el límite entre la alteración reversible de la homeostasis celular y una pérdida irreversible de las actividades celulares sería muy difícil de identificar. Para solucionar este hecho, el *Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD)* propone, en su último artículo del 2015, dos criterios para considerar una célula como muerta.¹⁶⁷

1. Permeabilización irreversible de la membrana plasmática
2. Fragmentación de la célula en cuerpos discretos, denominados comúnmente cuerpos apoptóticos

En su anterior edición de 2012, el *NCCD* proponía un tercer criterio incluyendo la fagocitosis de una célula por otra célula.¹⁶⁸ Sin embargo, varios estudios indican que el hecho de que una célula sea fagocitada por otra, no implica que ese fagosoma vaya a fusionarse con un lisosoma y a ser degradado. De hecho, se ha descrito la posterior liberación de células viables que habían sido previamente fagocitadas, en un proceso conocido como entosis.¹⁶⁹ Por tanto, identificaremos una célula como muerta solo bajo los dos anteriores criterios, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

La permeabilización de la membrana plasmática implica la rotura de ésta y la pérdida de la identidad celular, y puede detectarse por microscopía (inmunofluorescencia) o FACS ensayando la exclusión de colorantes vitales. La fragmentación en cuerpos apoptóticos implica la fragmentación de la célula incluido su núcleo, y puede detectarse por FACS cuantificando las células hipodiploides (fase del ciclo celular subG0/G1).

3.2 Tipos de muerte celular

La muerte celular puede dividirse en dos grandes tipos mutuamente exclusivos.¹⁶⁷

Muerte celular accidental (Accidental Cell Death, ACD)

La ACD estaría causada por agentes físicos como temperaturas elevadas o altas presiones, agentes químicos como detergentes o grandes variaciones de pH, y daños mecánicos. Sería un tipo de muerte inmediato e insensible a intervenciones farmacológicas o genéticas de

cualquier tipo. Este tipo de muerte celular representaría la destrucción estructural de la célula sin implicar la mediación de ninguna maquinaria molecular específica.

Muerte celular regulada (Regulated Cell Death, RCD)

La RCD implica un mecanismo molecular codificado genéticamente y puede ser alterada por medio de intervenciones genéticas y farmacológicas. Además, la RCD ocurre de una manera retrasada en el tiempo y se inicia en el contexto de una respuesta adaptativa, aunque sin éxito, de intentar restaurar la homeostasis celular. Dependiendo del estímulo, las respuestas pueden implicar preferentemente a un orgánulo, como la respuesta de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, u operar a escala celular como en el caso de la macroautofagia, normalmente denominada autofagia. Así, mientras la ACD es un tipo de muerte completamente imposible de inhibir, la RCD puede modularse, al menos en parte, no solamente inhibiendo la transducción de señales letales sino también mejorando la capacidad de las células para inducir una respuesta adaptativa al estrés. Este tipo de muerte regulada, ocurre también en el contexto del desarrollo embrionario, las respuestas inmunitarias y la homeostasis de tejidos, y se denomina generalmente muerte celular programada (programmed cell death, PCD).

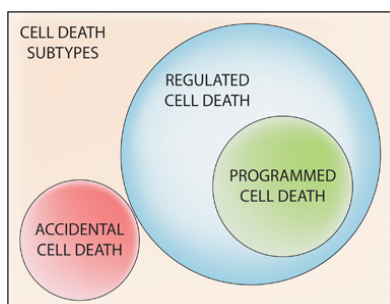


Figura I21: Representación esquemática de los tipos de muerte celular. Ilustración tomada de Galluzzi et al. (2015) ¹⁶⁷

En 2012, el NCCD propuso abandonar la descripción morfológica de la muerte celular por una nueva clasificación basada en parámetros bioquímicos cuantificables.¹⁶⁸ En esta clasificación bioquímica se identifican los principales eventos moleculares asociados con los subtipos de muerte celular específicos así como las intervenciones genéticas e inhibiciones químicas que pueden utilizarse para diferenciarlos *in vitro* e *in vivo* (tabla I4). Para clasificar el tipo de muerte celular, las intervenciones farmacológicas y genéticas se deberían considerar inhibitoras cuando verdaderamente reduzcan la incidencia de la muerte celular, y no solo cuando produzcan un cambio entre diferentes modalidades de muerte celular o cambios en su morfología.¹⁶⁸

Tabla I4: Clasificación funcional de los tipos de muerte celular regulada.

Tipos de RCD	Principales bioquímicas	características	Dependencia de caspasas	Intervenciones inhibitorias
Apoptosis extrínseca por receptores de muerte	Señalización receptores de muerte Activación de caspasa 8 o 10 Fragmentación de BID y MOMP Activación de caspasas 3, 6 y 7		+ +	Inhibición genética de caspasas 8 y 3 Administración de Z-VAD-fmk
Apoptosis extrínseca dependiente de receptores	Señalización por receptores Activación de PP2A y DAPK1 Activación de caspasa 9 Activación de caspasa 9, 6 y 7		+ +	Inhibición genética de caspasas 9 y 3 Inhibición genética de PP2A Administración de Z-VAD-fmk
Apoptosis intrínseca dependiente de caspasas	MOMP Disipación irreversible del $\Delta\Psi_m$ Liberación de proteínas IMS		+ +	Sobre-expresión de BCL-2 y Z-VAD-fmk
Apoptosis intrínseca independiente de caspasas	Inhibición de la cadena respiratoria		--	Sobre-expresión de BCL-2
Muerte celular autofágica	Lipidación de MAP1LC3 Degradación de SQSTM1		--	Inhibidores VPS34 Inhibición genética de AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 o BCN1
Necroptosis	Señalización por receptores de muerte Inhibición de caspasas Activación de RIP1 y/o RIP3		--	Administración de necrostatinas Inhibición genética de RIP1/RIP3
Parthanatos	Acumulación de PAR mediada por PARP-1 Disipación irreversible de $\Delta\Psi_m$ Depleción de ATP y NADH Unión de PAR a AIF y traslocación nuclear de AIF		--	Inhibición genética de AIF Inhibición genética o farmacológica de PARP-1
Catástrofe mitótica	Activación de caspasa-2 (en algunos casos) Activación de TP53 o TP73 (en algunos casos) Parada de ciclo celular		--	Inhibición genética de TP53 (en algunos casos) Inhibición farmacológica o genética de caspasa 2 (en algunos casos)

Abreviaturas: ATG, autofagia; $\Delta\Psi_m$, potencial de membrana mitocondrial; AMBRA1, Activating molecule in Beclin-1- regulated autophagy; BCN1, beclin 1; DAPK1, protein quinasa asociada a muerte celular; MAP1LC3, cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulos; MOMP, permeabilización de la membrana mitocondrial externa; PAR, poli-ADP ribosa; PARP1, polimerasa 1 de poli-ADP ribosa; PP2A, proteína fosfatasa 2A; SQSTM1, secuestrosoma 1; Z-VAD-fmk, N-benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone. Modificada de *Galluzzi et al. (2012)* ¹⁶⁸.

3.3 Aspectos morfológicos de la muerte celular

Las clasificaciones tradicionales de la muerte celular se basaban solamente en rasgos morfológicos debido a limitaciones técnicas. Así la primera clasificación de tipos de muerte celular diferenciaba entre:¹⁶⁷

1. Muerte celular tipo I o apoptosis, caracterizada por contracción citoplasmática, condensación de la cromatina y del núcleo, fragmentación nuclear, pequeñas evaginaciones citoplasmáticas a modo de burbujas o “blebs” (“blebbing”) y posterior disgregación en fragmentos denominados cuerpos apoptóticos
2. Muerte celular tipo II o autofagia, caracterizada por una extensa vacuolización del citoplasma
3. Muerte celular tipo III o necrosis, caracterizada por no exhibir características apoptóticas ni autofágicas

Esta clasificación morfológica es una simplificación y se considera no válida por varias razones. En primer lugar, la necrosis era considerada entonces como un tipo de muerte celular equivalente a la muerte celular accidental (ACD), mientras que la apoptosis se consideraba como el único tipo de muerte celular programado (Programmed Cell Death, PCD). Además la apoptosis se consideraba un tipo de muerte celular no inmunogénica. Ahora sabemos que la PCD no siempre se manifiesta con morfología apoptótica¹⁷⁰ y puede causar inflamación y respuestas inmunitarias.¹⁷¹ Por tanto, las observaciones morfológicas y los aspectos funcionales no necesariamente van unidos.

En segundo lugar, la definición morfológica de necrosis como una modalidad de muerte celular que no tiene las características apoptóticas ni autofágicas se ha reconsiderado. La necrosis puede manifestarse con un conjunto de características tradicionales como aumento del volumen celular (“swelling”) y de los orgánulos (oncosis), así como con alteraciones particulares como condensación de la cromatina en parches irregulares y dilatación de la membrana nuclear.¹⁷² Además la muerte celular regulada (RCD) puede manifestarse con características necróticas.

Por otra parte, el uso de muerte celular autofágica ha sido motivo de debate debido a que la definición del término se basa en características morfológicas y no funcionales. Por ello se recomienda su uso solamente en aquellos casos en los que la autofagia sea el mecanismo de muerte celular y no un mero proceso paralelo.¹⁶⁸

Además, muchas formas de RCD presentan rasgos apoptóticos y necróticos. De hecho, varias intervenciones farmacológicas y genéticas no consiguen inhibir la muerte celular, causando un cambio desde un tipo de muerte con morfología apoptótica a una mezcla de

aspecto apoptótico y necrótico.¹⁷³ Por tanto, las manifestaciones morfológicas de la muerte celular pueden ser fácilmente alteradas en ausencia de inhibición de la muerte propiamente dicha, por lo que no podemos basar en ellas una clasificación de los tipos de muerte celular.

Apoptosis

Desde el punto de vista bioquímico, la apoptosis se define como un tipo de RCD dependiente de caspasas. Otros eventos comúnmente asociados con la apoptosis como la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, serían menos universales y dependerían del contexto celular.¹⁶⁷ La apoptosis puede ser iniciada por estímulos intracelulares (apoptosis intrínseca) o extracelulares (apoptosis extrínseca). La apoptosis intrínseca implica la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP), resultando en la liberación del citocromo c en un proceso dependiente de ATP, el complejo APAF1 (apoptotic peptidase-activating factor 1), activación de las caspasas 9 y 3.

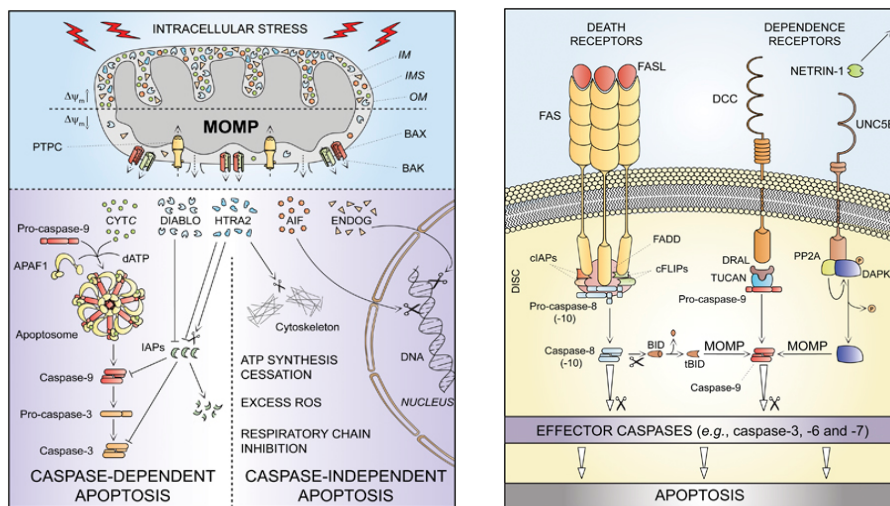


Figura I22: Representación de la apoptosis intrínseca y extrínseca. Representación de la apoptosis intrínseca (izquierda). En respuesta a múltiples señales de estrés intracelular como daño en el DNA o un aumento del calcio citosólico, se generan señales pro-supervivencia y señales pro-muerte que van a converger en la mitocondria. Cuando prevalezcan las señales letales, se permeabilizará la membrana mitocondrial desencadenando todo el proceso. Representación de la apoptosis extrínseca (derecha). La activación del receptor de muerte FAS recluta al complejo DISC, formado por la caspasa 8, FADD, cIAPs y c-FLIPs. Esta plataforma de proteínas controla la activación de la caspasa 8 y 10. Cuando las señales letales prevalecen sobre las señales de supervivencia ejercidas por cIAPs y cFLIPs, la caspasa 8 se activa e induce la activación de la caspasa 3 o estimula la permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) a través de la fragmentación de BID. A su vez, la apoptosis extrínseca puede iniciarse por otra vía que implica otros receptores y otra plataforma de proteínas que contiene a la caspasa 9 o la activación de la quinasa DAPK1. Esta última activaría caspasas efectoras o induciría MOMP. Ilustraciones tomadas de Galluzzi et al. (2012).¹⁶⁸

La apoptosis extrínseca implica la activación de las caspasa 8 y 3, y en algunos tipos celulares también se da MOMP. Se debe tener en cuenta que el Z-VAD-fmk y otros inhibidores similares inhiben otras proteasas, además de las caspasas, que también pueden ser responsables de la muerte celular como las calpaínas.¹⁷⁴ Además, varios estudios muestran que la acción de las caspasas podría no ser una señal indispensable para la muerte celular, sino un acelerador de la misma.¹⁶⁷

Necrosis y Necroptosis

La muerte celular necrótica o necrosis se caracteriza morfológicamente por ganancia de volumen en los orgánulos y el citoplasma, rápida ruptura de la membrana plasmática y pérdida del contenido intracelular. Puede ser regulada como la necroptosis o no regulada. Este tipo de muerte implica varios procesos como:¹⁶⁸

- alteraciones mitocondriales (producción de especies reactivas de oxígeno o ROS, MMP a menudo controlado por ciclofilina D),
- cambios lisosomales (ROS, permeabilización de la membrana lisosomal o LMP),
- cambios nucleares (hiperactivación de PARP),
- disminución de los niveles de ATP
- degradación de lípidos (por activación de fosfolipasas),
- aumento de la concentración de calcio citosólico que resulta en la activación de proteasas no caspasas (calpaínas y catepsinas) y
- liberación nuclear de HMGB1 (high-mobility group protein 1) y pérdida a través de la permeabilización citoplasmática

La necroptosis es un tipo de RCD activada por receptores de muerte que depende de MLKL y de la quinasa RIPK1 (en algunos casos) y RIPK3.¹⁶⁷ Las quinasas RIPK1 y RIPK3 regulan la activación de caspasas bajo algunas circunstancias, por lo que las cascadas de iniciación de la apoptosis y la necroptosis estarían estrechamente interconectadas. Las vías de señalización activadas en respuesta a receptores de muerte dependerían de la disponibilidad de caspasa 8, FADD y MLKL. En otros estudios, la necroptosis es inhibida activamente por el complejo formado por la caspasa 8, FADD y c-FLIP. Estos tres componentes forman parte de la apoptosis dependiente de caspasas, iniciada por receptores de muerte. Por otra parte, se ha reportado la activación de caspasas mediada por RIPK1 en respuesta a señalización por TNFR1. Por todo ello se debe tener precaución al evaluar el tipo de muerte basándose solamente en la inhibición con Nec-1.

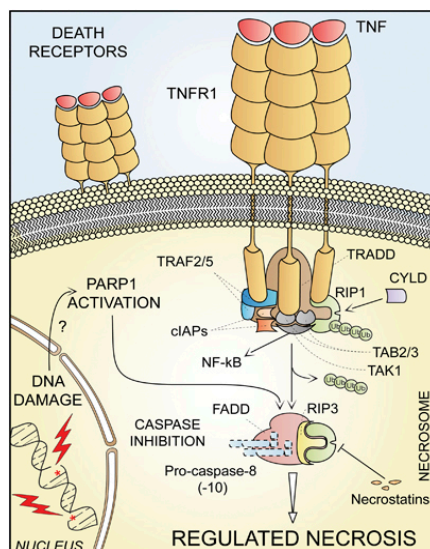


Figura I23: Representación de la necroptosis. La activación del receptor 1 de TNF (TNFR1) recluta TRADD, RIP1, cIAP1, TRAF2 y TRAF5. En el llamado complejo I, RIP1 se poliubiquitina por cIAPs, proporcionando un sitio para la unión de TAK1, TAB2 y TAB3, que liberan una señal pro-supervivencia activando NF-κB. En algunos casos, y en particular cuando la caspasa 8 está ausente o las caspasas están inhibidas, RIP1 se desubiquitina y activa a RIP3, activándose así la ejecución de la muerte celular necrótica. En algunos casos pero no en todos, se requiere la actividad quinasa de RIP1 y puede bloquearse con necrostatinas. Ilustración tomada de Galluzzi et al. (2012).¹⁶⁸

Muerte celular autofágica

La muerte celular autofágica es un tipo de RCD independiente de la acción de las caspasas que está asociada a la lipidiación de LC3 y la degradación de p62.¹⁶⁷ El NCCD recomienda usar este término solo para casos en los que se pueda inhibir la muerte celular, actuando al menos sobre dos componentes distintos de la maquinaria autofágica, tanto farmacológica como genéticamente.¹⁶⁸

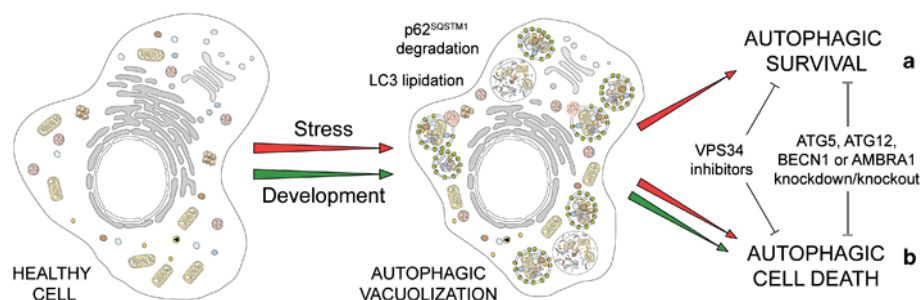
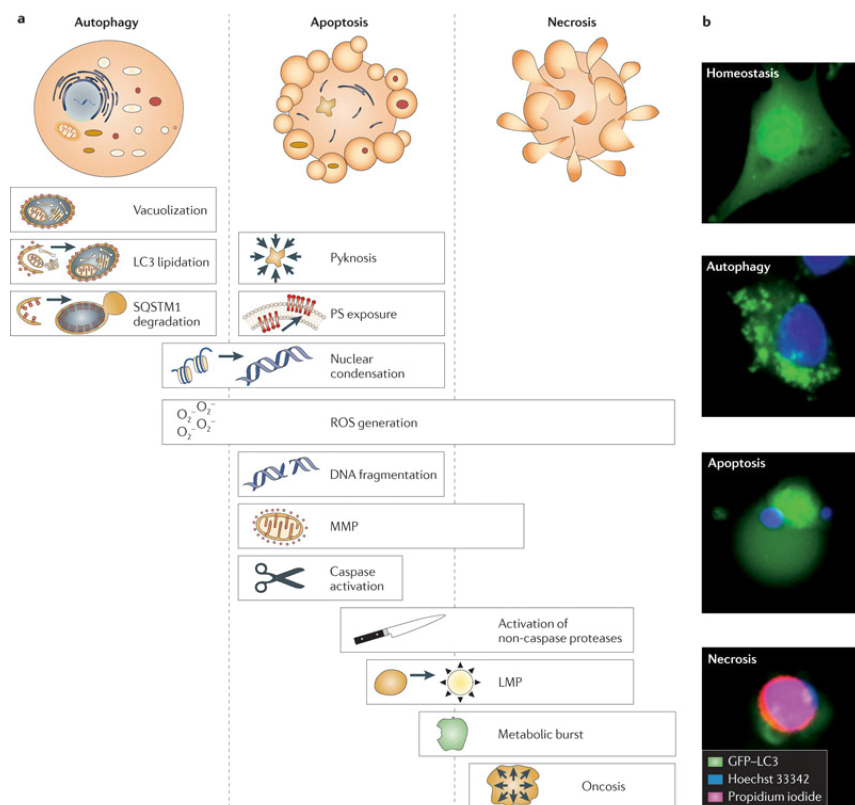


Figura I24: Representación de la muerte celular autofágica. En respuesta a estrés se puede activar la autofagia en la que orgánulos y porciones de citoplasma son secuestradas en vesículas con doble membrana denominados autofagosomas. Estos serán liberados en los lisosomas para su degradación. La autofagia inducida por estrés puede ejercer una función citoprotectiva y favorecer el re-establecimiento de la homeostasis celular, por lo que su inhibición farmacológica o genética acelerará la

muerte celular. Por el contrario, en el caso de la muerte autofágica, su inhibición bloqueará la muerte celular. Ilustración tomada de *Galluzzi et al. (2012)* ¹⁶⁸.

Mientras que la autofagia acompaña a un gran número de tipos de muerte celular, solamente contribuye a ella en un número reducido de casos, por lo que podemos hablar de muerte celular acompañada de autofagia y de muerte celular autofágica.

A modo de resumen, la siguiente figura describe las principales características moleculares que comparten y diferencian a los tres grandes tipos principales de muerte celular ¹⁷⁵.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura I25: Características moleculares de autofagia, apoptosis y necrosis. (a) La autofagia manifiesta la lipidación de LC3 y la degradación de SQSTM1. La apoptosis muestra MMP y activación de caspasas, con casos de activación de otras proteasas y casos de activación de caspasas sin MMP. La fragmentación de varios sustratos por las proteasas apoptóticas llevará a la condensación nuclear y fragmentación del DNA. En muchos casos se generará ROS y LMP, mientras que en algunos casos se expondrá la fosfatidilserina. La necrosis se manifestará con oncosis y compartiría con la apoptosis procesos como MMP, LMP, activación de proteasas no caspasas y generación de ROS. **(b)** Detección simultánea de varios parámetros: células transfectadas con GFP-LC3 y mantenidas en homeostasis o tratadas con rapamicina (un estímulo autofágico), o con estaurosporina (un inductor apoptótico) solo o junto con Z-VAD-fmk (inhibidor de caspasas que llevará a necrosis). Además las células se tiñen con el colorante

nuclear Hoeschst 33342 y el colorante de exclusión yoduro de propidio. Las células autofágicas, apoptóticas y necróticas manifiestan agregación de GFP-LC3, condensación nuclear e incorporación de yoduro de propidio, respectivamente. Ilustración tomada de *Kepp et al. (2011)*.¹⁷⁵

Finalmente se debería tener en cuenta también que, al igual que pasa con las características morfológicas, cada vez hay más evidencias que indican que la inhibición farmacológica o genética de procesos considerados como esenciales para la muerte celular, no evitan la muerte propiamente dicha. En su lugar, se altera la cinética y las manifestaciones bioquímicas de la misma. Así, en muchos casos la administración de Z-VAD-fmk inhibe la activación de las caspasas pero no inhibe la muerte celular. Estas y otras observaciones indican que las características bioquímicas de la muerte celular podrían ser alteradas sin llevar asociadas una protección celular eficiente.¹⁸⁷

4. Edelfosina y alquilfosfolípidos

La edelfosina es el prototipo de una familia de alquilfosfolípidos (APLs) conocidos como lípidos antitumorales (ATLs).

4.1 Origen y estructura

Los ATLs fueron sintetizados como análogos de la lisofosfatidilcolina a finales de los años 60, durante estudios realizados sobre la respuesta inmune en macrófagos.¹⁷⁶ El objetivo era estudiar el efecto que ejercía la lisofosfatidilcolina sobre la activación de éstos. Debido a la rápida metabolización de la lisofosfatidilcolina, se sintetizaron análogos más estables para permitir una activación más prolongada y poder estudiar mejor la activación que inducía. Pero la actividad antitumoral de los ATLs se describió en 1978 con estudios que mostraban una doble acción frente a las células cancerosas. Por una parte se estimulaba la acción de los macrófagos sobre las células tumorales y por otra parte, había una acción directa sobre estas células que causaba toxicidad. La primera síntesis de edelfosina se reportó en 1969 y su estructura resultó ser casi igual a la del factor activador de plaquetas (PAF), molécula que fue posteriormente descrita en 1979.¹⁷⁷

Así, desde el punto de vista químico, los APLs se dividen en dos clases¹⁷⁶:

- Los alquil-eter-fosfolípidos (AEPs), también denominados eter-lípidos antitumorales (AELs) o alquil-lisofosfolípidos (ALPs) como la edelfosina, cuya estructura contiene uniones éter en el anillo de glicerol
- Las alquil-fosfocolinas (APCs) que han perdido el anillo de glicerol, como la miltefosina (HPC)

La miltefosina es el único APL aprobado en clínica y se usa para metastásis cutáneas en cáncer de mama bajo el nombre de *Miltex®*.

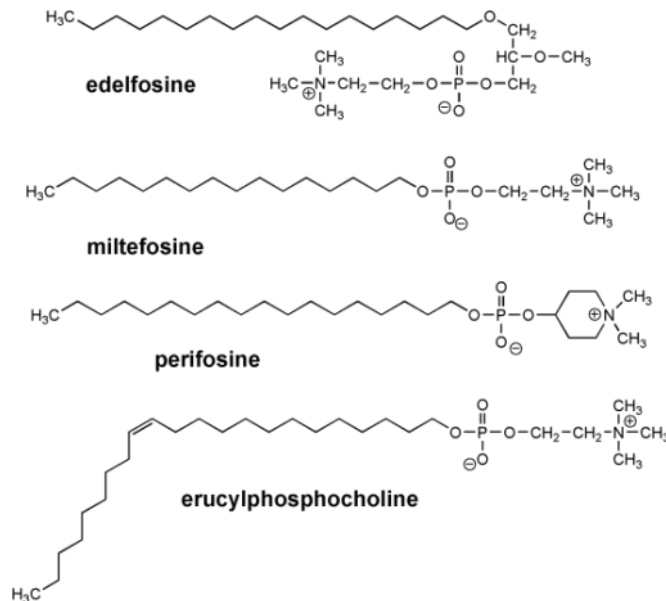


Figura I26: Estructura química de varios alquilfosfolípidos. Ilustración tomada de *Varela et al. (2012)*.¹⁷⁸

4.2 Mecanismo de acción y vías de señalización implicadas

Debido a su naturaleza lipídica, la edelfosina tiende a interactuar con las membranas biológicas alterando diversos procesos celulares e induciendo toxicidad.¹⁷⁹ En este sentido, la edelfosina se acumula en microdominios de membrana denominados rafts lipídicos o lipid rafts, compuestos por colesterol y fosfolípidos principalmente. Los lipid rafts reclutan y concentran distintas proteínas implicadas en la transducción de señales a modo de plataformas de señalización, y en ellas convergen vías de señalización de supervivencia, frecuentemente alteradas en cáncer,¹⁸⁰ pero también vías que median mecanismos de muerte celular.¹⁸¹ Así, la edelfosina actuaría sobre la membrana celular a diferencia de los agentes quimioterapéuticos tradicionales cuya diana es el DNA. A concentraciones elevadas, sin embargo, la edelfosina se asocia con otros lípidos ejerciendo una acción detergente sobre las membranas celulares.¹⁸²

Se ha descrito que la edelfosina actúa sobre el metabolismo lipídico inhibiendo la síntesis de fosfatidilcolina y la actividad de la enzima CCT (CTP:fosfolina citidiltransferasa).¹⁸³ La fosfatidilcolina es el lípido más abundante de la membrana plasmática y el sustrato para la síntesis de moléculas clave en la señalización celular como el diacilglicerol (DAG) y la ceramida.

Por otra parte, se ha visto en líneas celulares de cáncer de páncreas que la edelfosina se acumula en el retículo endoplásmico (RE) induciendo estrés de retículo y apoptosis, mediante su incorporación a la membrana del orgánulo y la desregulación del calcio acumulado en su interior.¹⁸⁴ Estos procesos implicarían la activación de caspasas, de la MAP quinasa JNK y la acción de la mitocondria. También se piensa que la inhibición de la CCT en el RE podría estar detrás del estrés inducido por la edelfosina.¹⁸⁵

La edelfosina actúa además sobre diversas vías de señalización que dependen de la membrana plasmática. En este sentido, se ha descrito que la edelfosina inhibe la proteína quinasa C (PKC)¹⁸⁶ cuya activación mediante análogos del diacilglicerol (DAG) lleva a la progresión tumoral.¹⁸⁷ Se ha visto también que la edelfosina inhibe la activación de la fosfolipasa C (PLC)¹⁸⁸ cuya actividad genera lípidos mensajeros como el DAG y el inositol-1,4,5-trifosfato. Al ser el DAG un activador de la PKC, se piensa que la inhibición de ésta podría estar causada en parte por la inhibición de la PLC. Además se ha descrito que la edelfosina inhibe la liberación de inositol-1,4,5-trifosfato¹⁸⁹, el cual induce la liberación del calcio intracelular.

Otra de las vías de señales afectadas por la edelfosina es la de la quinasa ERK1/2 implicada en supervivencia y proliferación, posiblemente debido a que la edelfosina inhibe la interacción Ras-Raf.¹⁹⁰ Otra vía implicada en supervivencia y proliferación sería la vía de AKT, cuya activación se ha descrito que es inhibida por la perifosina¹⁹¹, a través de su interferencia con la asociación de la proteína a la membrana plasmática y que sería crucial para su fosforilación. En este sentido, la perifosina es un inhibidor químico comercial de AKT utilizado en la terapia antitumoral.¹⁹² Asimismo, se ha descrito que la edelfosina también inhibe la fosforilación de AKT en distintos tumores hematológicos¹⁹³ y sólidos (datos no publicados). Además de AKT, el tratamiento con edelfosina inhibe la activación de mTOR, induciendo su desplazamiento de los lipid rafts junto a otras proteínas de supervivencia en tumores hematológicos¹⁹³(Figura 31). Como se ha visto anteriormente, tanto la vía de ERK como la de AKT, mantienen una señalización aberrante en distintos tipos tumorales y participan en los mecanismos de resistencia a las terapias antitumorales, a la vez que promueven la metástasis. Por tanto, su inhibición sería una estrategia terapéutica clave en el tratamiento del cáncer.

A diferencia de las rutas de ERK y AKT, la edelfosina activa otras vías MAP quinasas como la quinasa JNK, tanto en tumores sólidos ¹⁹⁴ como hematológicos ¹⁹³, cuya acción prolongada llevaría a la inducción de apoptosis. De esta forma, el tratamiento con edelfosina inhibiría vías de supervivencia y activaría vías de muerte celular en las células tumorales.

Se ha visto que la edelfosina activa la apoptosis a través del reclutamiento de distintas proteínas en los microdominios de membrana conocidos como lipid rafts. En este sentido, se ha descrito la movilización a estos dominios del receptor de muerte Fas sin necesidad de unión a su ligando ¹⁹⁵, y de las proteínas FADD, caspasa 8 y 10, llevando a la activación de la vía extrínseca de la apoptosis y la vía intrínseca gracias al reclutamiento de Bid que conectaría ambas vías a través de la mitocondria. ¹⁹⁶

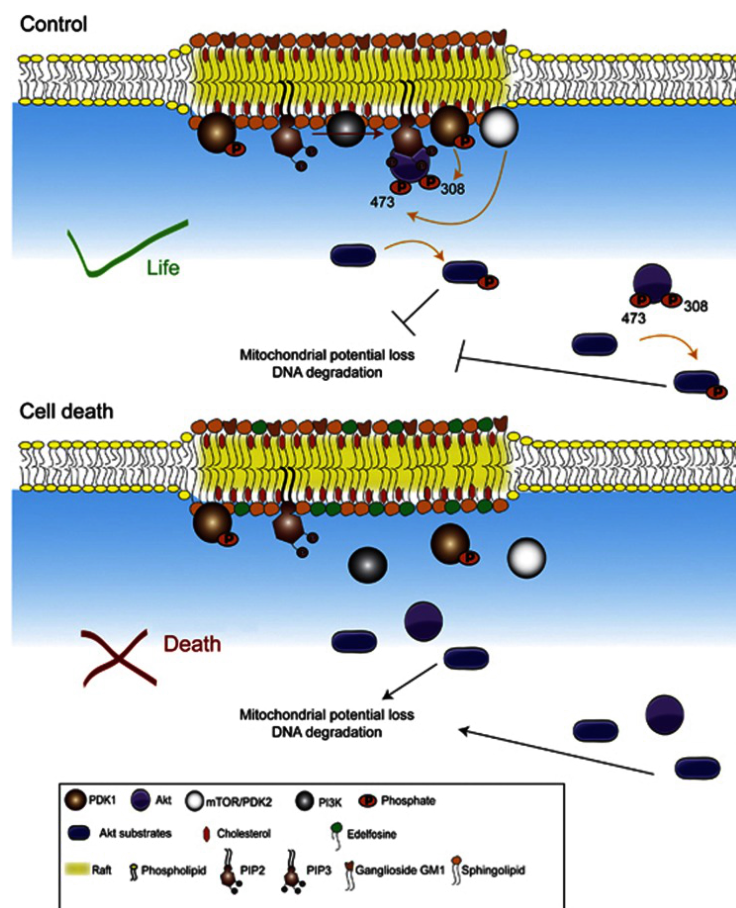


Figura I27: Modelo para la señalización en los lipid rafts mediada por Akt durante el tratamiento con edelfosina. La incorporación de la edelfosina a los lipid rafts provocaría el desplazamiento de Akt y las quinasas PI3K, PDK1 y mTOR fuera de los microdominios de membrana, inhibiéndose la fosforilación de Akt y sus sustratos lo que conllevaría la pérdida del potencial mitocondrial y la degradación del DNA. Ilustración tomada de *Reis-Sobreiro et al. (2013)*. ¹⁹³

4.3 Incorporación y selectividad

La incorporación de la edelfosina es un proceso clave que determina la selectividad frente a células tumorales y la sensibilidad o resistencia de las mismas.¹⁹⁷ En este sentido, se ha visto que la edelfosina induce apoptosis preferentemente en células tumorales sin afectar a las células normales, con alguna excepción. En experimentos con células humanas normales como las células de la médula ósea, conteniendo precursores hematopoyéticos normales, así como células maduras como linfocitos de sangre periférica y neutrófilos, no se vieron afectadas por el tratamiento con edelfosina. En estos mismos estudios, concentraciones iguales de edelfosina (alrededor de $6\mu\text{M}$) inducían apoptosis en las líneas tumorales THP, Jurkat, Colo 205, Calu 3, A431 y Colon C. Además en estudios con fibroblastos humanos 3T3 se observó que incorporaban edelfosina en cantidades mínimas y no sufrían apoptosis. Sin embargo, después de transformarlos con SV40, estos mismos fibroblastos incorporaban 4 veces más edelfosina y sufrían muerte celular. Estudios con concentraciones similares de edelfosina, usando la línea de fibroblastos de ratón L299, también describen la incapacidad para incorporar edelfosina en cultivo.¹⁹⁵ En otros estudios con concentraciones de edelfosina de 10 y $20\mu\text{M}$, hepatocitos normales humanos no sufrían apoptosis tras 24h de tratamiento, a diferencia de las células tumorales.¹⁹⁸ Estos resultados muestran la selectividad por la incorporación de la edelfosina en células malignas y no en las células normales. En este sentido, los estudios de biodistribución de la edelfosina en ensayos *in vivo* muestran también una clara acumulación en los tumores remarcando la incorporación selectiva por parte de las células tumorales.¹⁹⁹

Por tanto, hemos visto cómo la edelfosina se incorpora preferentemente en células tumorales y no en las células normales. Sin embargo, al microinyectar la edelfosina en células normales también se induce apoptosis en las mismas por lo que los efectos citotóxicos dependen de su incorporación en las células diana.¹⁹⁵ Por otra parte, existirían células tumorales que no incorporan edelfosina²⁰⁰ y por lo tanto, serían resistentes a su acción como la línea leucémica K562 y, excepciones de células normales que si la incorporan como los linfocitos T activados por mitógeno, que serían sensibles. Estas células sufren apoptosis cuando son tratadas con edelfosina, aunque en una medida menor que las células leucémicas, a diferencia de los linfocitos T no activados.²⁰¹ Esta incorporación diferencial no parece ser debida al estado proliferativo de las células activadas ya que otras células proliferativas como las células normales de la médula ósea no incorporan edelfosina a las mismas concentraciones.

Los lipid rafts de membrana tienen un papel fundamental en la incorporación de la edelfosina ya que su disrupción, con agentes que extraen el colesterol de las membranas,

inhiben la incorporación y la toxicidad por edelfosina. Algunos estudios con membranas modelo sugieren que los ATLS tienen una alta afinidad por el colesterol²⁰², que se concentra en los lipid rafts. En este sentido se ha especulado con que las células tumorales tendrían una composición lipídica distinta a sus homólogas no tumorales y esto podría explicar la selectividad en la incorporación de la edelfosina. En estudios con líneas celulares de cáncer de mama y de próstata se ha visto que éstas tienen más lipid rafts que sus homólogas normales y, son más sensibles a la muerte celular inducida por la eliminación del colesterol.²⁰³ Al mismo tiempo, varios estudios han mostrado que el colesterol se acumula en distintos tumores sólidos²⁰⁴ y otros han visto cómo el metabolismo del colesterol estaría desregulado en distintos tipos de cáncer, entre ellos en cáncer de mama.²⁰⁵

4.4 Lipid rafts en cáncer de mama

La incorporación de la edelfosina a los lipid rafts y el desplazamiento de proteínas de supervivencia podría ser de particular importancia en cáncer de mama, ya que las principales proteínas que median vías oncogénicas de supervivencia, migración y metastásis, necesitan su anclaje a los rafts lipídicos para su activación. Así, receptores y quinasas activarían la señalización aberrante en cáncer de mama desde estos microdominios. En este sentido, se sabe que la activación de la vía PI3K estaría implicada en los mecanismos de resistencia adquirida en cáncer de mama, por ejemplo en la resistencia a la apoptosis mediada por Fas. Para ello, la localización de Akt en los lipid rafts facilitaría su activación por PI3K, resultando en la inhibición de la apoptosis mediante la fosforilación e inactivación de proteínas proapoptóticas como Bad y procaspasa-9.²⁰⁶

Además de mecanismos de muerte celular alterados, la señalización desregulada por factores de crecimiento facilitaría la proliferación de los tumores de mama. En este sentido, los lipid rafts modulan la señalización de receptores de factores de crecimiento como la familia de receptores HER. Los receptores EGFR y HER2, cuya señalización promueve la proliferación oncogénica y media mecanismos de resistencia, están asociados a los lipid rafts y esta localización es crucial para llevar a cabo su señalización.²⁰⁷ La activación de quinasas downstream también dependería de su localización en los rafts lipídicos, como por ejemplo Ras que sería activada por EGFR. Otro receptor implicado en vías de señalización oncogénica y en mecanismos de resistencia, sería IGF-1R, cuya actividad también dependería de su reclutamiento a los microdominios de membrana.²⁰⁸

En los procesos de migración y metástasis en cáncer de mama, se ha visto que las quinasas de la familia Src (SFKs) integran la transducción de señales desde los receptores tirosin

quinasa como EGFR, IGF-1R y HER2, y transmiten la señal a sus dianas downstream PI3K/Akt, Ras y FAK. En este sentido, la actividad de SFKs estaría unida a su localización en los lipid rafts de membrana.²⁰⁹ Por otra parte, los rafts lipídicos serían imprescindibles en la formación de invadopodios en cáncer de mama²¹⁰ y el potencial invasivo se habría unido a proteínas localizadas en estos como MMP14, MMP2 y MMP9, estando las dos últimas localizadas en los rafts durante la migración de las células tumorales.²¹¹

Otras proteínas implicadas en la diseminación metastática en cáncer de mama serían CXCR4 y CD44 (HCAM, homing-associated cell adhesion molecule). El receptor CXCR4 implicado en proliferación y metástasis organo-específica, se localiza en los rafts, y su actividad se regula por CD24 mediante su reclutamiento o alejamiento de los microdominios.²¹² La proteína CD44 es un receptor del ácido hialurónico de la matriz extracelular y está implicado en la reorganización del citoesqueleto. Además CD44 es un correceptor de factores de crecimiento y, su actividad estaría unida también a los lipid rafts donde promovería la migración y la invasión metastática.²¹³ En este sentido, se ha visto que la edelfosina inhibe la adhesión de los neutrófilos al endotelio e impide su migración a concentraciones no tóxicas para las células, debido a una inhibición de la expresión de CD44 y Selectina-L y esto se traduce en un efecto antiinflamatorio en un modelo experimental de colitis.²¹⁴ Por otra parte, en estudios sobre angiogénesis se ha visto que la edelfosina induce también un descenso en la expresión de moléculas de adhesión como integrina $\beta 1$ y CD44 en las células endoteliales, así como en proteínas de unión intercelular²¹⁵ como veremos en un apartado posterior. Siguiendo con la regulación de CD44, se ha visto que los niveles de colesterol son importantes en su localización en los rafts ya que, al bajar la concentración del colesterol en estos se produce una redistribución de CD44 a porciones de la membrana no rafts, donde es degradado por la enzima ADAM10. Así la disminución del colesterol en los lipid rafts disminuye la actividad de CD44 y la migración.²¹⁶

4.5 Actividad antimetastática

La edelfosina inhibe la proliferación e induce apoptosis en las células tumorales pero también se han descrito efectos antimetastáticos y antiangiogénicos, procesos que serían clave en la diseminación de las células tumorales en el organismo. El mecanismo por el cual la edelfosina inhibe la proliferación no se conoce pero parece que impide la citocinesis y detiene el ciclo celular en fase G2/M, aunque también se ha descrito una parada de ciclo en fase G0/G1²¹⁷.

Se ha sugerido que la incorporación de la edelfosina a la membrana celular cambiaría la fluidez de ésta y afectaría a la expresión de glicolípidos y glicoproteínas en la superficie celular. A su vez se ha postulado que pequeños cambios del mismo tipo en la membrana de

las células normales impedirían su interacción con las células tumorales y esto causaría una inhibición de la invasión metastática.²¹⁸ En este sentido, se ha visto que la edelfosina inhibe la metastasis de células de cáncer de pulmón en modelos *in vivo* con ratones.²¹⁹ Algunos estudios sugieren que la reorganización de proteínas de membrana implicadas en la adhesión celular como la MUC1/episialina y las integrinas, podrían tener un papel en el efecto antimetastático inducido por edelfosina. Así varios estudios describen la capacidad de ATLs para prevenir la invasión *in vivo* y en matrices tridimensionales *in vitro*. En estudios con el modelo del embrión de pollo se ha visto que la edelfosina inhibe la invasión de células 12R1C1-RK (células de riñón de rata transfectadas con adenovirus tipo 12) y en menor medida, la invasión de células MO₄ (fibrosarcoma de ratón) o LLC-HG1 (carcinoma Lewis de pulmón de ratón).²¹⁹

Otros ensayos con matrices tridimensionales mostraron la inhibición de la invasión por células de la línea de glioma GaMG²²⁰ y, en estudios con membranas recubiertas de matrigel, la edelfosina inhibió la invasión de líneas celulares de rata, ratón y humanas.²²¹

En cambio, varios grupos describen la inducción de la invasión en líneas no invasivas. Asimismo se han reportado resultados contradictorios con sublíneas derivadas de la misma línea celular de cáncer de mama (MCF-7), en los que algunos estudios describen la inducción de un fenotipo invasivo en la línea MCF-7/6 y otros la inhibición de la conducta invasiva en la línea MCF-7/AZ.²²² Estos estudios con resultados contradictorios no han sido explicados aunque podrían ser debidos, posiblemente, al uso de distintas concentraciones de edelfosina y distintos modelos de estudio, así como al uso de condiciones experimentales diversas. En este sentido se necesitaría hacer estudios que implicasen distintas líneas celulares en un mismo modelo experimental y bajo las mismas condiciones para analizar a qué se deben estas diferencias si las hubiera, esto es, misma concentración de edelfosina y mismos tiempos de análisis para cada modelo experimental.

4.6 Acción antiangiogénica

En estudios con la línea HMEC-1 (línea microvascular de células endoteliales), se ha descrito que la edelfosina inhibe la formación de túbulos en un ensayo sobre la angiogénesis *in vitro*, y a concentraciones superiores a 43 nm. También se ha visto que a concentraciones de 32 nm, la edelfosina inhibía la expresión de moléculas de adhesión, como se comentó anteriormente, como la integrina β 1 (CD29) implicada en procesos de cicatrización, invasión tumoral y metástasis, y CD44 implicada en la transmigración de neutrófilos y la respuesta inflamatoria, además de promover la metástasis en determinados estadios y tipos de cáncer de mama como el triple negativo. En este estudio también se describió un descenso en las uniones intercelulares.²¹⁵

En células endoteliales bovinas, la edelfosina inhibió la migración en respuesta al agente angiogénico bFGF (factor básico de crecimiento fibroblástico) usando un ensayo en cámara de Boyden. Estos estudios se llevaron a cabo a concentraciones de 8-200 nm. Sin embargo, a concentraciones superiores se observó un aumento de la migración de las células endoteliales microvasculares. Tales efectos duales también se han descrito en inhibidores de la angiogénesis como la trombospondina, debido a su capacidad para estimular receptores con distintas afinidades, algunos de ellos inhibidores y otros activadores.²²³

En estudios *in vivo* con ratas, la edelfosina inhibió la neovascularización totalmente en 5 de los 9 animales; indujo una inhibición parcial en 3 de 9 y no causó ninguna inhibición en una de ellas.²²⁴

A diferencia de la edelfosina, se ha descrito que otros lípidos como el PAF que tendría una estructura similar, tendrían efectos proangiogénicos.²²⁵

Por último, cabe señalar que en los distintos estudios *in vivo* llevados a cabo por nuestro grupo se ha observado en todos los casos, que los tumores en los grupos de ratones tratados estaban pobremente vascularizados a diferencia de los tumores en los grupos control.¹⁹⁹

4.7 Estudios de toxicidad y ensayos clínicos

La edelfosina ha mostrado tener una baja toxicidad en distintos estudios con animales y ensayos con pacientes.¹⁷⁶

4.7.1 Estudios con pacientes

El primer ensayo clínico con edelfosina se llevó a cabo por el grupo de Berdel en 1982.²²⁶ Fué un estudio de fase 1 con 16 pacientes con tumores sólidos avanzados y leucemias, con metástasis y un mal estado general de salud, siendo 14 de ellos resistentes a los tratamientos previos. La edelfosina fué administrada de forma intravenosa (i.v.) en 11 pacientes y oralmente en los 5 restantes. La dosis i.v. fué de 15-20 mg/kg disuelta a una concentración de 5 mg/ml con un 20% de albúmina, con la que no se observaron efectos adversos. La máxima dosis tolerada fué de 50 mg/kg en inyección única con toxicidad limitada en el tracto gastrointestinal consistente en vómitos y diarrea. En dispensiones diarias, la máxima dosis tolerada fué de 20 mg/kg y generó toxicidad hepática y edema pulmonar de forma reversible, siendo la toxicidad limitante de dosis. Los resultados fueron pobres con dos remisiones parciales de 5 a 6 meses y una reducción de los blastos a menos

del 10% en una leucemia mieloide aguda. No se observaron toxicidades adicionales en los estudios post-mortem.

Después se hizo un estudio de fase 2 con 116 pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Non Small Cell Lung cancer, NSCL) y se obtuvieron resultados desalentadores.²²⁷ Las dosis fueron de 300 mg disueltos en leche durante 4 semanas y después se incrementó a 900 mg si era bien tolerada. De los 116 pacientes, se pudieron analizar 81 observándose 2 remisiones parciales. Permanecieron sin cambios 68 pacientes y 11 progresaron. Las toxicidades observadas fueron náuseas, vómitos y diarrea que no necesitaron tratamiento.

Por último, se trató a un paciente con AML resistente al tratamiento con daunomicina, citosin arabinósido y tioguanina, con un 93% de células leucémicas y en un estado general de salud muy comprometido.²²⁸ Las dosis fueron de 16 a 30 mg/kg/día de edelfosina i.v. disuelta en albúmina durante 11 días, reduciéndose las células leucémicas a un 64% y recuperándose la hematopoyesis normal con incremento de neutrófilos. A los 15 días se obtuvo un recuento de leucocitos de 6600/ μ l con un 51% de células leucémicas. Debido a estados febriles se interrumpió el tratamiento durante 1 mes, en el que el porcentaje de células leucémicas subió al 84% y después se le volvió a tratar, disminuyendo el porcentaje de blastos a un 62%. A pesar de haber empezado a recuperar la hematopoyesis normal, el paciente volvió a desarrollar temperaturas altas muriendo el 15 de julio de 1981.

4.7.2 Estudios de toxicidad con animales

La edelfosina muestra baja toxicidad sistémica en ratones y ratas independientemente de la vía de administración.²²⁹ Ratones inyectados diariamente durante 3 semanas a dosis de 0,05 mg/kg a 5 mg/kg de edelfosina diluida en PBS, y dosis de 25 mg/kg de edelfosina unida a proteínas del suero, no mostró valores patológicos en sangre, orina, embarazos, nacimientos y recién nacidos. En ratas y ratones, dosis únicas de 40 mg/kg fueron bien toleradas y la LD₅₀ para edelfosina fué de 250 mg/kg con alteraciones gastrointestinales como principal efecto tóxico.²³⁰ Cuando la edelfosina es administrada i.v. su principal efecto tóxico es la hemólisis debido a su actividad detergente. Este efecto disminuye con la dosis y cuando se administra unida a proteínas de suero como la albúmina. En estudios de toxicidad aguda, la LD₅₀ para una única dosis i.v. de edelfosina en ratones, ratas y cobayas fué de 40 a 55 mg/kg.²³⁰ Se observó irritación en los sitios de inyección intravenosa, intraperitoneal e intratumoral. La LD₅₀ puede ser más alta cuando la edelfosina se administra unida a proteínas de suero. Hubo un moderado incremento de la bilirrubina y la urea en sangre. En estudios con babuínos y mono verde, la LD₅₀ i.v. fué de 60 mg/kg con hemólisis y aumento de la urea en los animales supervivientes. Las observaciones postmortem mostraron un

aumento de tamaño en riñones con el resto de órganos como hígado, estómago, timo y bazo normales macroscópicamente. En estudios de toxicidad subaguda, se hicieron estudios con mono verde en los que 3 animales por grupo fueron inyectados 3 veces por semana con 1, 5 y 20 mg/kg durante tres semanas. Los análisis de sangre y orina no mostraron valores patológicos pero si se observó diarrea, vómitos y hemólisis en las dosis altas con un aumento de la bilirrubina y la urea en sangre, y un aumento de la hemoglobina, proteínas y glucosa en orina.

El tratamiento con edelfosina no indujo mielosupresión o toxicidad en la médula ósea in vivo, a diferencia de los fármacos antineoplásicos convencionales con una acción dirigida al DNA celular. En general, la edelfosina no produjo efectos sistémicos importantes y fue bien tolerada en los modelos animales así como en los estudios clínicos con pacientes. Por otra parte, no se observaron efectos mutagénicos ni citogenéticos después de los tratamientos.

Finalmente en cultivos de hepatocitos de rata la LC_{50} fue de 170 μ M por lo que a las concentraciones de uso no se observa hepatotoxicidad.²³¹

Capítulo 2:

OBJETIVOS

La edelfosina se acumula en rafts lipídicos alterando su composición e induciendo muerte celular en distintos tipos tumorales. Una de las consecuencias de su interacción con los rafts de membrana es el desplazamiento de proteínas de supervivencia implicadas en vías oncogénicas. Dada la importancia de estas vías y la señalización desde los rafts lipídicos en cáncer de mama, hipotetizamos que la edelfosina podría ser efectiva induciendo muerte celular en este tipo de cáncer. Para analizar esta hipótesis nos planteamos realizar un estudio con líneas celulares de cáncer de mama y ensayar el efecto del tratamiento con edelfosina. En este estudio nos fijamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de la edelfosina en líneas de cáncer de mama de distinto subtipo molecular y caracterizar, en su caso, la muerte celular inducida
2. Analizar el efecto de la edelfosina en el fenotipo metastático
3. Estudiar el efecto de la edelfosina sobre la metástasis *in vivo*

Capítulo 3:

MATERIAL Y

MÉTODOS

1. Cultivos Celulares

1.1 Líneas celulares

Las líneas utilizadas en este trabajo se especifican en la tabla M1. Esta tabla resume las principales características y condiciones de cultivo así como la procedencia de las diferentes líneas.

Tabla M1. Líneas celulares

Línea celular	Medio de cultivo	Procedencia
MCF-7	DMEM	Panel NCI
T-47-D	DMEM	Panel NCI
BT-474	DMEM	Eugenio Santos (CIC)
AU-565	DMEM	Jesús Pérez-Losada (CIC)
SK-BR-3	DMEM	Jesús Pérez-Losada (CIC)
HCC-1569	DMEM	Jesús Pérez-Losada (CIC)
MDA-MB-231	DMEM	Panel NCI
MDA-MB-435	DMEM F12	Angels Sierra (IDIBELL)
435-Lung	DMEM F12	Angels Sierra (IDIBELL)
BT-549	DMEM	Panel NCI
Hs-578-T	DMEM	Panel NCI
MDA-MB-468	DMEM	Panel NCI
SUM-149-PT	Ham's F12	Rogelio Sarmiento (CIC)
HCC-1937	Ham's F12	Rogelio Sarmiento (CIC)
435-Brain	DMEM F12	Angels Sierra (IDIBELL)
435-Liver	DMEM F12	Angels Sierra (IDIBELL)
435-Bone	DMEM F12	Angels Sierra (IDIBELL)
HUVEC	M199	Marco Calzado (IBIMIC)
HBMEC	EMC	Marco Calzado (IBIMIC)

1.2 Condiciones de cultivo

1.2.1 Mantenimiento celular

Las líneas celulares se cultivaron a 37°C en atmósfera humidificada y 5% de CO₂, en medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF) inactivado por calor (56 °C, 45 min), 5 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Se utilizó insulina 0,1 µg/ml e hidrocortisona 0,1 µg/ml para suplementar el cultivo de la línea SUM-149-PT. Cada 3-4 días las células se lavaban con PBS Na/K 1X y se dividían con tripsina/EDTA 0.05% (Gibco). La tripsina se inactivaba con medio completo (1 ml tripsina :3 ml medio) y se centrifugaban las células a 1200 rpm durante 5 min. Se sembraban las células a la dilución correspondiente en cada caso. Todos los experimentos se realizaron con células en crecimiento exponencial, en torno a un 70-80% de confluencia.

Las células HUVEC se cultivaron en medio 199 suplementado con 20 % de SBF, 2 mM de penicilina/streptomina (10,000 U y 10 mg/ml respectivamente), 2 mM anfotericina B, 2 mM L-glutamina, 10 mM Hepes, 30 mg/ml ECGS, y 100 mg/ml de heparina. Las células HBMEC se cultivaron en medio de cultivo ECM (*Endothelial Cell Medium*, Science, P60104), suplementado con 5 % de FBS, 1 % ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) y 1 % penicilina/streptomina (ScienCell, Carlsbad, CA, USA)

1.2.2 Contaje celular y determinación del número de células viables mediante Azul Tripán

El contaje de células se realizó en cámara de Neubauer con una profundidad de 0.1 mm y 0.0025 mm de área. El número de células a sembrar en cada experimento se determinó a partir de las células viables dentro del área de contaje. Las células viables se determinaron por exclusión de *Azul Tripán* (Sigma). La reactividad de este colorante se basa en el hecho de que el cromóforo está cargado negativamente y no interacciona con la célula a menos que la membrana esté dañada. Por lo tanto, todas las células que excluyen el colorante son viables. Para realizar el conteo de células viables, se tomaron 50 µl de una suspensión celular y el mismo volumen de Trypan Blue, se homogeneizó y se dejó a temperatura ambiente por 5 min. Bajo el microscopio y utilizando una cámara de Neubauer se procedió a contar las células viables no teñidas. El porcentaje de células viables se calculó como sigue:
% Número células viables = (número células viables) x 100/ (número células viables + no células viables)

Este valor se multiplicó por dos dada la dilución hecha al añadir el mismo volumen de colorante que de suspensión celular.

1.2.3 Criopreservación celular

Las células se congelaron después de dividirse en fase de crecimiento exponencial y siguiendo el protocolo anterior. Una vez centrifugadas se resuspendían en 1 ml de medio de congelación (70 % DMEM completo, 20 % FBS y 10 % DMSO) frío. Tras rotular y enfriar previamente los criotubos, se añadían las células y se trasladaban en hielo rápidamente a -20 °C. Pasadas 24h se trasladaban los criotubos en hielo seco a un congelador a -80 °C , donde se almacenaban las células antes de pasar definitivamente a tanques de N₂ líquido a -196 °C .

1.3 Tratamientos

En los ensayos *in vitro* las células se sometieron a los siguientes tratamientos:

Líneas celulares de cáncer de mama: estudios de migración y muerte celular

Los distintos tratamientos con edelfosina se realizaron 24 h después de haber sembrado las células y tras cambiar el medio de cultivo. Se utilizó una concentración de 10, 20 y 30 μM para los estudios iniciales de muerte celular, manteniendo en los siguientes estudios una concentración fija de 20 μM . En general, los tratamientos se recogían a las 24, 48, y 72 h, excepto en los estudios de expresión de proteínas y estudios funcionales. Los análisis del ciclo celular y la incorporación de yoduro de propidio se realizaron en paralelo, para lo que las muestras derivadas de los tratamientos se dividieron en dos.

Para los estudios funcionales de adhesión, migración e invasión, se utilizaron unas concentraciones de 5, 10 y 20 μM de edelfosina a unos tiempos de 16 o 36 h en función de la línea celular.

Líneas celulares endoteliales: estudios de angiogénesis

Las células HUVEC y HBMEC se trataron a unas concentraciones de 5, 15, 30 y 50 μM de edelfosina durante 6 h

Pre-tratamientos con distintos inhibidores

Todos los inhibidores se incubaron 1 h antes de aplicar los correspondientes tratamientos con edelfosina y se utilizaron a las concentraciones indicadas en la tabla M2

2. Edelfosina

Preparación de edelfosina para estudios in vitro

Se disolvió edelfosina en polvo (INKEYSA, Barcelona, España) en medio de cultivo DMEM completo sin suero (2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina) hasta

una concentración final de 2 mM. A continuación, la solución fue incubada 45 min a 50 °C, esterilizada mediante filtración con un tamaño de poro de 0,22 µm, y mantenida a 4 °C hasta su posterior utilización.

Preparación de edelfosina para estudios in vivo

Se preparó edelfosina siguiendo los pasos anteriores pero disolviéndola en agua miliQ y se mantuvo a 4 °C hasta ser utilizada. Previamente a la administración a los animales, se mantuvo a temperatura ambiente.

3. Estudio de la proliferación

15.10⁴ células se incubaron en placas de 12 pocillos durante 24 h antes de ser tratadas o no, con los fármacos a estudiar, en un volumen final de 1 ml. Cada condición se incubó por triplicado. Transcurridas 24, 48 o 72 h se añadió 5 mg/ml de bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT) a cada pocillo y se incubó durante 2 h. Pasado ese tiempo, el precipitado de azul de formazán formado por la oxidación del MTT se disolvió con 100 µl de isopropanol:HCl 1 M (24:1) y se determinó la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Bio-Rad). Se realizaron al menos tres experimentos independientes y los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.).

4. Estudio de la muerte celular por citometría de flujo

4.1 Estudio del ciclo celular y cuantificación de la proporción de células en fase sub-G0/G1

Un total de 3x10⁵ células fueron centrifugadas e incubadas toda la noche en 500 µl de etanol al 70% en H₂O (v/v) a 4 °C. Una vez fijadas, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 10 min a 37 °C con un buffer de citrato. Se centrifugaron y se incubaron seguidamente a temperatura ambiente con 1 mg/ml de RNAsa en agitación durante 1 h o durante 30 min a 37 °C. Antes de pasar las células por el citómetro en modo flujo lento (Low flow), se añadió el IP a 20 µg/ml. La proporción de células en cada fase del ciclo celular se determinó por medio de un citómetro de flujo FACScalibur (BD, San Jose, CA, USA). La cuantificación de células con degradación de DNA se realizó mediante el cálculo del porcentaje de células en la región sub-G0/G₁ (hipodiploidía) en el análisis del ciclo celular con el programa FCSexpress. Se realizaron al menos tres experimentos independientes y los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.).

4.2 Estudio de la permeabilización de la membrana plasmática por incorporación de yoduro de propidio

Para medir la permeabilización de la membrana plasmática se cuantificó la incorporación de yoduro de propidio en células vivas. Un total de 20000 células se adquirieron en un citómetro FACSCalibur utilizando el programa CellQuest (Becton Dickinson). Las células positivas y negativas para yoduro de propidio se analizaron con el programa FCSexpress. Se realizaron al menos tres experimentos independientes y los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.).

5. Análisis de la expresión proteica

5.1 Obtención de extractos proteicos

Se utilizaron un total de $5-10 \times 10^6$ células que fueron lisadas en 60 μ l del tampón de lisis (25mM HEPES pH 7.7, 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.1% Tritón X-100, 20 mM β -glicerofosfato, 0.1 mM ortovanadato sódico), suplementado con inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 20 μ g/ml aprotinina, 20 μ g/ml leupeptina). Tras una agitación vigorosa y la posterior incubación en hielo durante 20 min, las proteínas solubilizadas se obtuvieron por centrifugación a 14000 rpm, 20 min, 4 °C.

5.2 Análisis de la concentración de proteínas

La medida de la concentración proteica se realizó mediante el método Bradford, método colorimétrico basado en la reacción del colorante azul de Coomassie G-250 al unirse a proteínas. Se utilizó la solución comercial Kit Protein Assay (BioRad, Richmond, CA, USA), y la cantidad de proteínas totales de cada muestra se determinó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA) de Sigma.

5.3 Western blot

Un total de 40-70 μ g de proteínas fueron desnaturalizadas mediante una incubación de 5 min a 95°C en tampón Laemmli (2% dodecilsulfato sódico (SDS), 10% glicerol, 140 mM β -mercaptoetanol, 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,01% azul de bromofenol), y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS-PAGE.

Una vez separadas en función de su peso molecular, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) utilizando como tampón de transferencia 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol. Tras eliminar los restos de metanol mediante un lavado con tampón TBS-T (50 mM Tris-HCl,

pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20), las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-T durante 60 min a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios que se detallan en la tabla M3.

Después de realizar 3 lavados de 5 min con TBS-T, se procedió a la incubación de las membranas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Tras los correspondientes lavados con TBS-T, se incubaron durante 2 min con el sustrato de ECL (enhanced chemiluminescence) de inmunodetección en filtro (Amersham Biosciences), y el peso molecular de las proteínas en estudio se calculó utilizando marcadores estándar de peso molecular conocido (kaleidoscope Prestained Standards, BioRad).

Se realizaron al menos tres experimentos independientes.

Tabla M2. Lista de anticuerpos. Se indica la casa comercial, la dilución de trabajo.

Anticuerpo	Casa comercial	Concentración
AIF	Cell Signaling	IF 1:100
AKT	Cell Signaling	WB 1:1000
Caspasa 3	Cell Signaling	WB 1:1000
Caspasa 7	BD Biosciences	WB 1:1000
Giantina	Abcam	WB 1:3000
LC3B	Cell Signaling	WB 1:1000
mTOR	Cell Signaling	WB 1:1000
p-mTOR	Cell Signaling	WB 1:1000
p- γ H2AX	Cell Signaling	WB 1:1000
pAKT ^{S473}	Cell Signaling	WB 1:1000
PARP-1	Cell Signaling	WB 1:1000
α -Tubulina	Abcam	IF 1:100
β -actina	Sigma	WB 1:10000

6. Estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal

Utilizamos la microscopía confocal para la detección de los anticuerpos especificados en la tabla M3. Para ello, sembramos las células correspondientes en cada caso sobre cubreobjetos, previamente incubados con poli-L-lisina durante 30 min a temperatura ambiente y sometidos a 4 lavados de 10 min con PBS. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 h antes de aplicar los correspondientes tratamientos. Una vez transcurrido el tiempo en cada experimento, fijamos las células con formaldehído al 4 % durante 15 min a

temperatura ambiente. Tras lavar 3 veces con PBS durante 5 min, permeabilizamos las células con tritón X-100 al 0,2 % durante 10 min y lavamos 3 veces con PBS durante 5 min. Bloqueamos las células con BSA al 1 % en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron las células con los anticuerpos primarios correspondientes durante 1 h a temperatura ambiente o a 4 °C durante toda la noche. Tras lavar las células 3 veces con PBS durante 5 min, procedimos a incubar con los correspondientes anticuerpos secundarios durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con PBS durante 5 min, incubamos las células con Faloidina durante 20 min o montamos directamente los cubreobjetos sobre los portaobjetos con medio de montaje con DAPI. Se realizaron al menos tres experimentos independientes.

7. Estudios funcionales

7.1 Ensayos de adhesión

Se utilizaron placas de 24 pocillos para medir la adhesión celular. Las placas se trataron con dos sustratos: colágeno-I y laminina-I (sigma). Los sustratos se incubaron durante 30 min a 37 °C y se realizaron cuatro lavados de 5 min con PBS. Seguidamente 2×10^5 células se añadieron a los pocillos previa cuantificación de su viabilidad con Azul Tripán, y se dejaron adherir durante 40 min a 37 °C. Las células no adheridas se lavaron con PBS y se procedió a la fijación de las células adheridas al sustrato con formaldehído al 4 % durante 10 min a temperatura ambiente. Después de lavar 5 min con PBS se realizó la tinción de las células con Cristal Violeta al 0.01 % durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, después de eliminar el colorante y realizar tres lavados con PBS se tomaron las correspondientes imágenes de microscopía y se lisaron con SDS 0.01 %. Se tomaron 200 μ l por triplicado de la solución resultante y se midió la absorbancia de cada tratamiento en un espectrofotómetro a 630 nm.

Se realizaron tres experimentos independientes y los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.).

7.2 Ensayos de migración

Se estudiaron dos tipos de migración, la migración aleatoria o motilidad celular y la migración quimiotáctica o transmigración, en respuesta a un estímulo soluble. Para el primer caso se utilizó un ensayo de cierre de herida o *wound-healing* y para el segundo un ensayo de transmigración o migración en cámara de Boyden.

Ensayo de cierre de herida o “wound-healing”

Se cultivaron las células en placas de 12 pocillos hasta un 90 % de confluencia y se practicó una herida sobre la monocapa con una punta blanca, procurando realizar la herida siempre con el mismo ángulo para obtener grosores similares. Previamente a la realización de la herida, las células se pretrataron con mitomicina C durante 30 min con el fin de detener la proliferación. De esta manera, podemos cuantificar solamente la motilidad celular. Después de lavar las células no adheridas, se añadió medio de cultivo a los controles y medio de cultivo más edelfosina a los tratamientos (5, 10 y 20 μM). Se tomaron imágenes de microscopía a tiempo 0 y a las 16 o 36 h de tratamiento, en función de la velocidad de cada línea celular estudiada (16 h para las células MDA-MB-231 y 36 h para las células 435-Lung).

Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ y se cuantificó el área libre para cada pocillo a tiempo 0 y a tiempo final. Restando ambas áreas obtenemos el % de cierre de la herida para cada condición. Se realizaron tres experimentos independientes y los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.).

Ensayo de migración en cámara de Boyden

Para este ensayo se utilizaron placas de 24 pocillos e insertos o *transwells* de 8 μM de tamaño de poro. Se utilizó medio de cultivo para añadir a los insertos y medio con un estímulo para añadir a los pocillos, en este caso fué medio de cultivo con un 30 % de FBS y 8 $\mu\text{g/ml}$ de insulina. 2×10^5 células se añadieron a los insertos tras recuento en Azul Tripán, en un volumen final de 1 ml de medio normal o medio más edelfosina (5, 10 y 20 μM). Las células se dejaron migrar durante 16 (MDA-MB-231) o 36 h (435-Lung) a 37 °C. Tras los tiempos de incubación se procedió a lavar los insertos con PBS y se eliminaron las células que no habían migrado con bastoncillos de algodón. Para evitar dañar los filtros, el algodón se desenrolló ligeramente y se giró con cuidado. Después se fijaron las células adheridas al filtro con formaldehído al 4 % y se tiñeron con Cristal Violeta. Se tomaron imágenes de microscopía y las células se cuantificaron con el programa ImageJ. Para ello se eligieron 3 campos por condición y se realizó la media del número de células en cada campo. Se realizaron tres experimentos independientes y los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.).

7.3 Ensayo de invasión

El matrigel es una especie de membrana basal soluble extraída del tumor EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) que al solidificar forma una estructura similar a la membrana basal y está compuesto de laminina, colágeno IV, entactina y el proteoglicano heparán sulfato

mayoritariamente. El ensayo de invasión es igual que el ensayo de migración quimiotáctica y la única diferencia consiste en añadir matrigel. Se añade una capa fina de matrigel a los insertos y una vez solidificada, se añade el medio con las células en la cámara superior, dejándose a estas invadir.

Para realizar este ensayo se añadió una capa fina de Matrigel (BD Biosciences) a los insertos descritos en el ensayo de transmigración. Para ello se diluyó un volumen de Matrigel en medio de cultivo (1:3) utilizando el material previamente enfriado a 4 °C (placas multipocillo, puntas, Matrigel, medio de cultivo) para evitar la polimerización del Matrigel, que debe mantenerse entre 0 y 8 °C para conservar el estado líquido. Una vez diluido, se añadieron 30 µl de la dilución los insertos y se incubó 4 h a 37 °C hasta su gelificación. Seguidamente se procedió de la foma descrita en el ensayo de transmigración. Una vez finalizado el ensayo, se tomaron igualmente imágenes de microscopía y las células se cuantificaron con el programa ImageJ. Para ello se eligieron 3 campos por condición y se realizó la media del número de células en cada campo. Se realizaron tres experimentos independientes y los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.).

7.4 Ensayos de angiogénesis

Las células HUVEC y HBMEC (2×10^4) se añadieron sobre una capa uniforme de Matrigel (BD Biosciences) en una placa de 96 pocillos. Las células sin tratar o tratadas con edelfosina (5, 15, 30 y 50 µM) durante 12 h se lavaron con PBS y se tiñeron con 5 µM de Calceína-AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se analizó la formación de tubos utilizando el objetivo de 4x y un BD Pathway 855 Bioimager. Se utilizó el programa Attovision V 1.7 BD para cuantificar la longitud total de los tubos y el número de redes.

Paralelamente se sembraron 7×10^3 células de ambas líneas y se trataron o no con edelfosina durante 24 h, a las concentraciones descritas anteriormente. Se añadió MTT y se incubó durante 3 h a 37 °C en oscuridad. Los cristales de formazán se solubilizaron con 100 µl de DMSO y la absorbancia se midió a 550 nm usando un lector multiplaca (TECAN GENios Pro, Suiza).

Se realizaron tres experimentos independientes y los datos se analizaron con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.).

8. Estudios *in vivo*

8.1 Mantenimiento animal

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones SPF (animales libres de patógenos) del tipo NOD/SCID (Charles River). Todos los animales eran hembras con un peso entre 22 y 25 g. Los animales se mantuvieron en jaulas apiladas en un rack individual ventilado tipo ILL (IVC) de la casa Allentown que cumple la normativa vigente. Los ratones se mantuvieron en las jaulas con comida y bebida *ad libitum*, una temperatura de 20-22 °C , humedad relativa del 60-70 y ciclos de luz/oscuridad de 12 h en el estabulario del IDIBELL (Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge). La limpieza de las jaulas así como la revisión veterinaria se realizó semanalmente y cumpliendo la normativa establecida por la AAALAC (Asssociation for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International).

8.2 Inducción de metástasis experimental

Las células 435-Lung-GFP-LUC se inyectaron en la vena de la cola con una jeringa de insulina y una aguja de 30G a una concentración de $1 \cdot 10^6$ células en 100 μ l de HBSS. El procedimiento se realizó bajo la aprobación del comité ético de experimentación animal.

8.3 Administración oral de edelfosina

Los ratones fueron divididos en dos grupos y transcurridos 5 días desde la inyección intravenosa de las células tumorales se inició el tratamiento de uno de los grupos. El grupo de tratamiento con edelfosina recibió diariamente, de lunes a sábado, una dosis oral de 30 mg/kg peso y el grupo control, una cantidad igual del vehículo (agua) durante un período de 89 días.

8.4 Seguimiento de los animales

El peso de los animales se midió antes de la inyección de las células y durante los días posteriores. Una vez empezado el tratamiento con edelfosina, los ratones se pesaron previamente a la toma de imágenes de bioluminiscencia (BLI) y se les hizo un seguimiento de los parámetros que indican fuerza y dolor. Para valorar la capacidad metastática de las células se realizó el seguimiento de éstas a través de la medida de BLI. Esta técnica permite el seguimiento del crecimiento celular a través de una reacción catalizada por la enzima luciferasa en la que se liberan fotones.

Obtención de imágenes de bioluminiscencia (BLI)

Los animales se controlaron hasta la aparición de síntomas de metástasis cada 3-4 días y una vez detectadas las metástasis, el seguimiento se hizo de manera periódica. Para realizar el seguimiento de las metástasis, se administró a los ratones el sustrato de la luciferasa, la luciferina, antes de cada medida (Caliper, 150 mg/kg en PBS 1X). Pasados 5 min desde la inyección, los ratones se anestesiaban con una mezcla de oxígeno (2.0 L/min) e isoflurano (4.0 L/min durante la inducción y 2.0 L/min durante la adquisición de imágenes). El aparato de medición está unido al sistema de anestesia y permite tomar la imagen de los ratones controlando también la temperatura dentro del aparato. Por tanto, una vez dormidos, los ratones se colocaban boca abajo sobre la plataforma del aparato de medida de BLI (LI4 Ivis Lumina XR, Caliper). Las medidas se hacían del cuerpo completo del animal.

Todas las imágenes se tomaron aproximadamente a partir de los 10 min posteriores a la inyección de luciferina, tiempo donde la señal es máxima. Inicialmente se tomaba una imagen fotográfica de referencia que servía para validar la posición del animal. A continuación, sin mover al animal, se tomaba la imagen de bioluminiscencia durante 3 minutos en condiciones de alta sensibilidad de detección (small binning). De esta manera se consigue aumentar la relación señal/ruido para cada pixel.

Análisis y cuantificación de imágenes de bioluminiscencia

Para el análisis y cuantificación de las imágenes se utilizó el software de análisis Living Image 4.0 (Caliper). Los datos de BLI se analizaron delimitando regiones de igual área (ROI, region of interest) en el cuerpo del animal y se cuantificó la intensidad de la señal en estas regiones. Todos los parámetros de ajuste de la cámara, tiempo de exposición, distancia entre la lente y los animales y umbral de cuantificación se mantuvieron constantes para todas las imágenes. Como las áreas o ROIs delimitados eran iguales para todos los animales, se utilizó el parámetro Flujo total de fotones para la cuantificación. Los valores de luminiscencia se dividieron por 1000 y se aplicó el \log_{10} .

9. Histología

9.1 Preservación de tejidos

Después de la necropsia, y previo a cualquier tipo de tinción, los tejidos (cerebro, pulmones, hígado) se dividieron. Parte fueron destinados a la inclusión en parafina y se fijaron en formaldehído 4 % toda la noche previamente a su inclusión.

9.2 Hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica

Las tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y las de inmunohistoquímica (IHQ) fueron realizadas por el servicio de Patología Molecular Comparada (PMC) del Centro de Investigación del Cáncer.²³²

10. Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 5.0a (GraphPad Software, Inc.). Las diferencias estadísticas entre grupos se evaluaron por medio de ANOVA usando un p-valor menor a 0.05 como estadísticamente significativo. Para mirar las diferencias de cada grupo con el control se aplicaron pos-tests de Bonferroni de comparación de medias. En el caso de la experimentación *in vitro*, todos los experimentos se realizaron un mínimo de 3 veces y los resultados se representan como la media y desviación típica (SD).

En el estudio *in vivo*, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas. Los resultados se presentan como la media y error estandar de la media (SEM). Se consideró como significativo un p-valor inferior a 0.05.

Capítulo 4:

RESULTADOS

Sección I:

Caracterización de la muerte celular

1. La edelfosina induce muerte celular regulada en líneas de cáncer de mama

Para estudiar el efecto de la edelfosina sobre células de cáncer de mama, seleccionamos dos líneas celulares ampliamente utilizadas en la literatura como son MCF-7 y MDA-MB-231. La línea celular MCF-7 se caracteriza por ser dependiente de hormonas, tener poca capacidad invasiva y sería representativa de un tipo de cáncer Luminal, mientras que la línea celular MDA-MB-231 carece de receptores hormonales, tiene una gran capacidad invasiva y metastásica, y es representativa de un tipo de cáncer Triple Negativo con mal pronóstico. Con estas líneas hicimos los primeros ensayos de citotoxicidad y muerte celular.

1.1 La edelfosina induce una disminución de la viabilidad y la proliferación celular en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231

Utilizamos el ensayo de metabolización del MTT como medida de la proliferación y la viabilidad. El MTT atraviesa la membrana plasmática gracias a su carga neta positiva y es reducido por las reductasas mitocondriales en células metabólicamente activas (Berridge et al., 2005). Al comparar las células control y las tratadas obtenemos una medida relativa de la viabilidad celular, y al comparar el tiempo inicial del experimento con los tiempos sucesivos, entre las células control y las tratadas, obtenemos una medida relativa de la proliferación celular.

El tratamiento con edelfosina inhibió la proliferación celular en ambas líneas. En la línea MCF-7 este efecto apareció a las 48 h de tratamiento con valores de metabolización del MTT significativamente más bajos que el control en las tres concentraciones utilizadas. Sin embargo, la línea MDA-MB-231 sufrió una disminución de la proliferación desde las 24 h de tratamiento, aumentando con el tiempo y la concentración de edelfosina. En esta línea se dió una disminución de los valores de metabolización por debajo de los valores control a las concentraciones de 20 y 30 μM , quedando los valores en la línea MCF-7 similares a los del control para todas las concentraciones. Estos resultados sugieren que la edelfosina inhibe la proliferación en ambas líneas pero solo disminuye la viabilidad en la línea MDA-MB-231.

1.2 La edelfosina induce muerte celular regulada en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231

Los ensayos que cuantifican procesos bioquímicos ligados a la viabilidad celular, como el ensayo de metabolización del MTT, son adecuados para obtener información preliminar sobre la actividad citotóxica de un compuesto pero, además de que pueden verse afectados

por alteraciones metabólicas subestimando el número de células metabólicamente activas, siempre deben validarse con ensayos que cuantifiquen la muerte celular.²³³

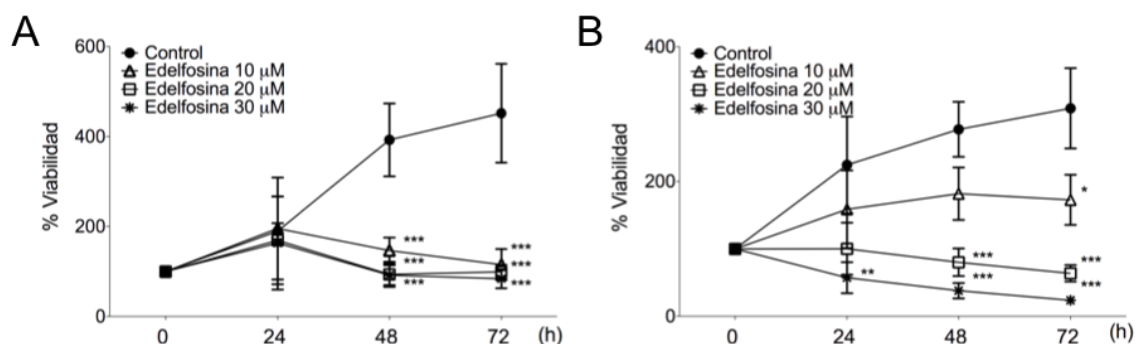


Figura R1: Efecto de la edelfosina sobre la metabolización del MTT. Las células MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B) sin tratar o tratadas con concentraciones de 10, 20 y 30 μM de edelfosina a lo largo del tiempo, se incubaron con MTT. Se midió la formación de formazán en el tiempo 0, antes de empezar los tratamientos, para tener una medida de la viabilidad de las células al inicio del experimento y cada 24h, durante 3 días consecutivos. Los resultados se representan como porcentajes de viabilidad obtenidos después de normalizar el valor de absorbancias de los tratamientos con los controles en el tiempo 0 y se expresan como la media y desviación típica de al menos 3 experimentos independientes (*p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001).

Para medir la muerte celular inducida por edelfosina utilizamos el ensayo de incorporación de yoduro de propidio, ya que este no puede cruzar la membrana plasmática intacta. La permeabilización de la membrana es un punto de no retorno a partir del cual podemos definir una célula como muerta y, por tanto, es una medida de la muerte celular.¹⁶⁷

La edelfosina indujo muerte celular en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231, siendo esta dependiente del tiempo y la concentración. Se encontraron diferencias significativas a partir de las 48 h de tratamiento a concentraciones de 10 y 20 μM en la línea MCF-7. Sin embargo, en la línea MDA-MB-231 solo se observaron diferencias significativas a la concentración de 10 μM a partir de las 72 h, encontrándose valores significativos con la concentración de 20 μM desde las 24 h de tratamiento. La muerte celular ocurrió de forma dilatada en el tiempo. Estos resultados sugieren que no se trata de una muerte de tipo accidental (ACD), sino de una muerte celular regulada (RCD).

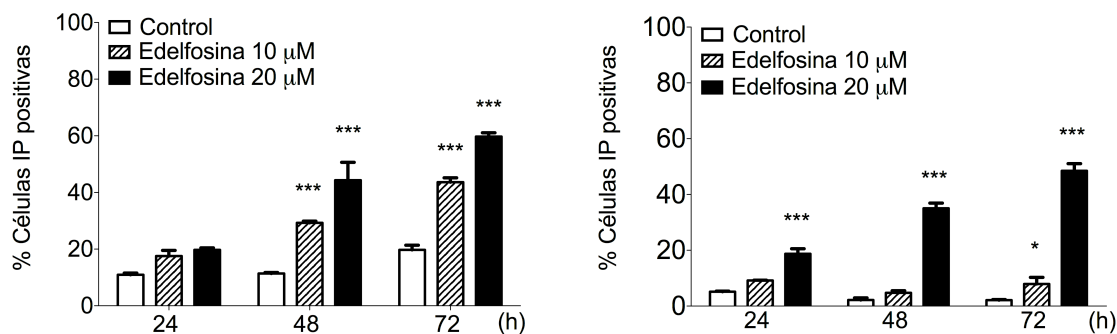


Figura R2: Efecto de la edelfosina sobre la permeabilidad de la membrana plasmática. Células de las líneas MCF-7 (izquierda) y MDA-MB-231 (derecha), sin tratar o tratadas a unas concentraciones de 10 y 20 μM de edelfosina, se analizaron a las 24, 48 y 72 h de tratamiento. Los resultados se representan como la media y desviación típica de al menos tres experimentos independientes (* <0.05 , *** $<0,001$).

Dadas las siguientes premisas:

1. El tratamiento con edelfosina en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 era efectivo induciendo muerte celular.
2. El cáncer de mama se caracteriza por ser un conjunto de enfermedades, con varios subtipos y cada uno de ellos tiene un comportamiento y pronóstico clínico diferente.
3. Conocemos gran cantidad de información sobre el mecanismo de acción de la edelfosina en otros tipos de cáncer y cuáles son las principales rutas de señalización implicadas en la muerte celular inducida por edelfosina.

Quisimos hacer un barrido lo más amplio posible de su actividad en un gran número de líneas celulares con el objetivo de tener una imagen lo más real posible de la actividad antitumoral de la edelfosina en cáncer de mama y, analizar si existe alguna relación entre la sensibilidad o resistencia a edelfosina y el subtipo molecular. Para ello elegimos varias líneas celulares (Tabla R1) que fueran representativas de los distintos tipos de cáncer de mama y de la clasificación que se hace desde el punto de vista clínico. De esta manera, podíamos estudiar si algún tipo de cáncer era más susceptible que otro al tratamiento. Al mismo tiempo, dada la heterogeneidad de este tipo de cáncer, evitábamos sacar conclusiones erróneas derivadas de analizar únicamente líneas sensibles, como habían resultado ser las MCF-7 y MDA-MB-231. Debido a la gran heterogeneidad dentro del subtipo molecular Triple Negativo, hicimos una subclasificación de las líneas celulares en este subtipo en dos grandes grupos, *Claudin-low* y *Basal-like*. Estos subtipos dentro del Triple Negativo son conocidos por presentar diferencias en cuanto a características moleculares y pronóstico, siendo el subtipo *Basal-like* de peor pronóstico. En la tabla R1 se indica entre paréntesis, a que subtipo de la subclasificación de *Pietenpol* y *col.* correspondería cada

línea en los subtipos Triple Negativo. Dentro del grupo Triple Negativo (*Basal-like*) las líneas HCC-1937 y SUM-149-PT son portadoras de mutaciones en BRCA1, y la segunda deriva de un cáncer de mama inflamatorio.

Tabla R1: Clasificación de las líneas de cáncer de mama utilizadas y principales características. ²³⁴, ²³⁵, ²³⁶

Clasificación	Receptores			Características	Líneas celulares
	ER	PR	HER2		
Luminal A	+++	++	-	Ki67 bajo o RS bajo TP53(32%)	MCF-7 T-47-D
Luminal B	+	+/-	-/+	Ki67 alto, PR negativo o bajo y RS alto en el caso de ser HER2 - ó Ki67 cualquiera, PR cualquiera y HER2 ++ PIK3CA (32%), TP53 (32%)	BT-474
HER2	-	-	+++	Ki67 alto TP53 (75%) PIK3CA (42%)	AU-565 SK-BR-3 HCC-1569
Triple negativo / <i>Claudin-low</i>	-	-	-	Ki67 bajo TP53(84%)	BT-549 (M) Hs-578-T (MSL) MDA-MB-231(MSL) MDA-MB-435 MDA-MB-435-Lung ²³⁷
Triple negativo / <i>Basal-like</i>	-	-	-	Ki67 alto EGFR +	MDA-MB-468 (BL1) HCC-1937 (BL1) SUM-149-PT (BL2)

RS: índice de recurrencia o recurrence score, TP53: proteína tumoral P53, ER: receptor de estrógenos, PR: receptor de progesterona, HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, PIK3CA: fosfoinositol 3-quinasa clase IA, EGFR: también llamado HER-1, receptor del factor de crecimiento epidérmico 1, M: mesenquimal, MSL: mesenchymal-like o tipo mesenquimal, BL1: basal-like 1 o tipo basal 1, BL2: basal-like 2 o tipo basal 2.

1.3 La acción de la edelfosina es independiente del subtipo molecular de cáncer de mama

Para estudiar la muerte celular en el panel de líneas elegidas, se trataron las células durante 48 h a una concentración de 20 μ M de edelfosina y se analizaron dos parámetros: la permeabilidad de la membrana plasmática, característica de una respuesta necrótica o de

necrosis subsiguiente a apoptosis²³⁸ (Figura 3) y la fragmentación del DNA como medida de la fragmentación celular, característica de una respuesta apoptótica¹⁶⁸ (Figura 4). Con estas dos medidas quedaban cubiertos los dos puntos de no retorno en el proceso de muerte celular y se podía establecer qué líneas eran sensibles al tratamiento dentro de cada subtipo molecular. Los dos parámetros se analizaron en paralelo.

El tratamiento con edelfosina induce la permeabilización de la membrana plasmática en todos los subtipos moleculares

En el grupo de líneas del subtipo *Luminal*, el tratamiento indujo muerte celular en la línea MCF-7, como se había visto en los estudios preliminares, y en la línea BT-474 (Figura R3). En cambio la línea T-47-D fué resistente a la acción de la edelfosina. Tanto las MCF-7 como las T-47-D pertenecen al tipo, dentro del subtipo molecular Luminal, *Luminal A*. Las células BT-474 pertenecen al tipo *Luminal B* (ver Tabla R1).

En el grupo *HER2* formado por las líneas AU-565, SK-BR-3 y HCC-1569, el tratamiento con edelfosina causó muerte celular en las tres líneas con diferencias altamente significativas respecto al control (Figura R3).

En cuanto al subtipo *Triple Negativo (claudin-low)*, el tratamiento causó muerte celular en la línea MDA-MB-231, como habíamos visto anteriormente, y en las líneas MDA-MB-435 y 435-Lung²³⁹ (línea altamente metastática derivada de la anterior y con un fuerte tropismo hacia pulmón). No se encontraron diferencias significativas respecto al control en dos de las cinco líneas tratadas con edelfosina (BT-549 y Hs-578-T) por lo que se consideraron resistentes al tratamiento. Hubo una gran diferencia de sensibilidad a edelfosina entre ambas líneas MDA-MB-435, siendo mucho más sensible la parental y menos la 435-Lung.

En el subtipo *Triple Negativo (basal-like)* encontramos dos líneas altamente sensibles (HCC-1937 y SUM-149-PT) y una medianamente resistente, la línea MDA-MB-468 (Figura R3).

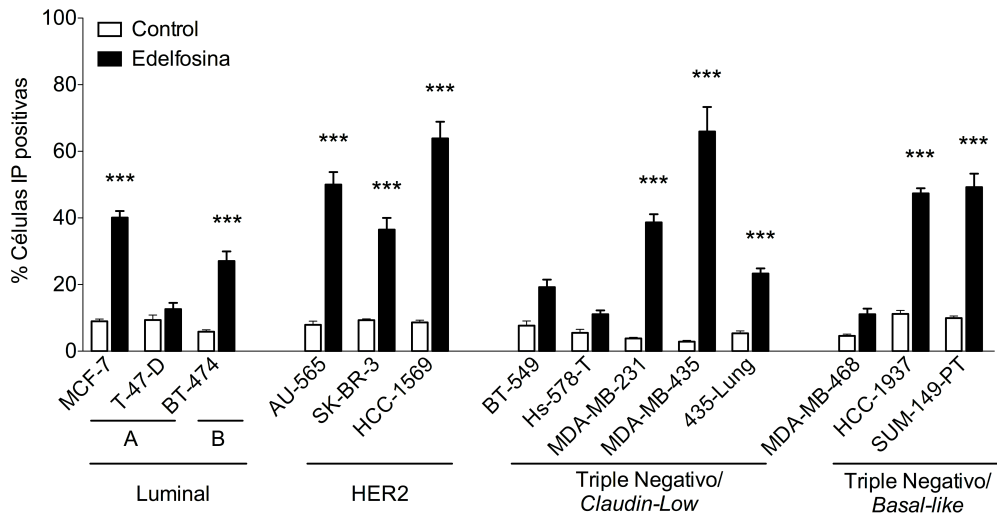


Figura R3: Efecto de la edelfosina sobre la permeabilidad de la membrana plasmática en el panel de líneas celulares. Las células se analizaron tras el tratamiento con edelfosina a una concentración 20 μ M durante 48 h. Los resultados se expresan como la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes para cada línea celular (***) $p < 0.001$).

El tratamiento con edelfosina induce degradación de DNA en todos los subtipos moleculares

Para analizar si el tratamiento podía causar fragmentación celular, que no detectaríamos con la medida de la permeabilidad de la membrana, analizamos el ciclo celular para estudiar la posible aparición de células hipodiploides que nos indicarían procesos de degradación del DNA, característicos de un tipo de muerte apoptótica (Figura R4).

En el grupo Luminal, el tratamiento con edelfosina causó degradación de DNA en las células MCF-7, aunque en baja proporción, y en las células BT-474 en mayor grado. Las células de la línea T-47-D no sufrieron un efecto del tratamiento sobre el ciclo celular. Estos resultados junto a los datos de permeabilidad de la membrana plasmática, nos llevaron a clasificar esta línea como resistente y a las MCF-7 y BT-474 como sensibles (Tabla R2).

Las células de las líneas HER2 mostraron una alta sensibilidad a edelfosina con porcentajes de degradación de DNA altamente significativos con respecto al control (Figura R4). Estos datos junto a los de la permeabilidad de la membrana (Figura R3) nos llevaron a clasificar las líneas AU-565, SK-BR-3 y HCC-1569 como sensibles al tratamiento con edelfosina (Tabla R2).

En el caso del subtipo Triple Negativo (*claudin-low*) solo encontramos degradación de DNA en las líneas BT-549 y MDA-MB-435, ambas con bajos porcentajes (Figura R4). Las líneas MDA-MB-231 y 435-Lung, que mostraban permeabilidad de la membrana plasmática tras el

tratamiento, no muestran sin embargo una degradación del DNA significativa respecto al control. La línea Hs-578-T no mostró sensibilidad al tratamiento con respecto a la degradación del DNA, al igual que con respecto a la permeabilidad de la membrana plasmática (Figura R3) por lo que la fué clasificada como resistente. En cambio, las líneas BT-549 y 435-Lung mostraron una baja, aunque estadísticamente significativa, sensibilidad sólo con respecto a uno de los parámetros de muerte celular (degradación de DNA en las células BT-549 y permeabilidad de la membrana plasmática en las 435-Lung) por lo fueron clasificadas como medianamente resistentes (Tabla R2).

El grupo de líneas Triple Negativo (*basal-like*) mostró degradación del DNA en las tres líneas con porcentajes altamente significativos respecto al control (Figura R4). La línea MDA-MB-468 mostró los valores más bajos del grupo pero significativos, a diferencia de los resultados en la permeabilización de la membrana, por lo que fué clasificada como medianamente resistente. Las líneas SUM-149-PT y HCC-1937 resultaron en altos porcentajes de degradación del DNA y, estos datos junto a los de incorporación de yoduro de propidio nos permitieron clasificarlas como sensibles al tratamiento (Tabla R2).

Tabla R2: Clasificación de las líneas celulares en función de su sensibilidad a edelfosina.

Sensibles	Resistentes	Medianamente Resistentes
MCF-7	T-47-D	435-Lung
BT-474	Hs-578-T	BT-549
AU-565		MDA-MB-468
SK-BR-3		
HCC-1569		
MDA-MB-231		
MDA-MB-435		
SUM-149-PT		
HCC-1937		

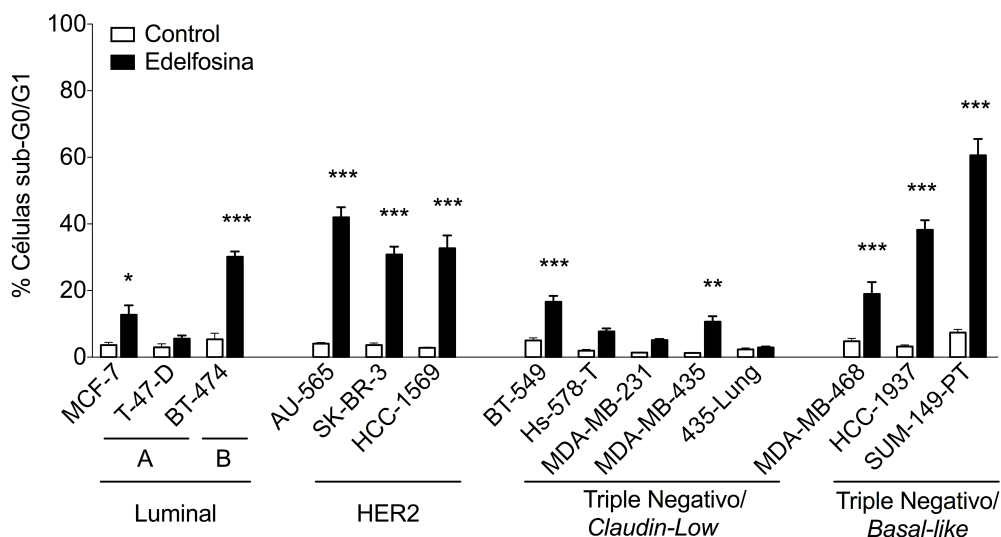


Figura R4: Efecto de la edelfosina sobre la degradación de DNA en el panel de líneas celulares. Todas las líneas, sin tratar o tratadas con edelfosina a una concentración de 20 μ M durante 48 h, se analizaron por citometría de flujo para cuantificar la células hipodiploides correspondientes a la fase subG0/G1 del ciclo celular. Los valores corresponden al porcentaje de células en esta fase y se expresan como la media y desviación típica de al menos tres experimentos independientes para cada línea celular (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$).

1.4 Caracterización morfológica por microscopía óptica

Para estudiar las características morfológicas de la muerte celular inducida por edelfosina, realizamos un análisis a tiempos cortos (24 h) con varias líneas celulares: MCF-7, BT-474, SK-BR-3 y MDA-MB-231 (Figura R5).

Lo primero que observamos tras el tratamiento con edelfosina es el redondeamiento de las células que pasan de estar adheridas a estar en suspensión, y una intensa vacuolización citoplasmática. También se observan células con morfología apoptótica y fragmentación celular, además de células con morfología necrótica (Figura R5).

1.5 Análisis de la muerte celular por citometría de flujo

Para estudiar el efecto de la edelfosina sobre la morfología de las células en todas las líneas, analizamos los parámetros tamaño y complejidad celular mediante citometría de flujo (Figuras R6, R7, R8 y R9). Se observaron dos tipos principales de modificaciones en las líneas celulares tratadas con edelfosina que se resumen en la Tabla R3.

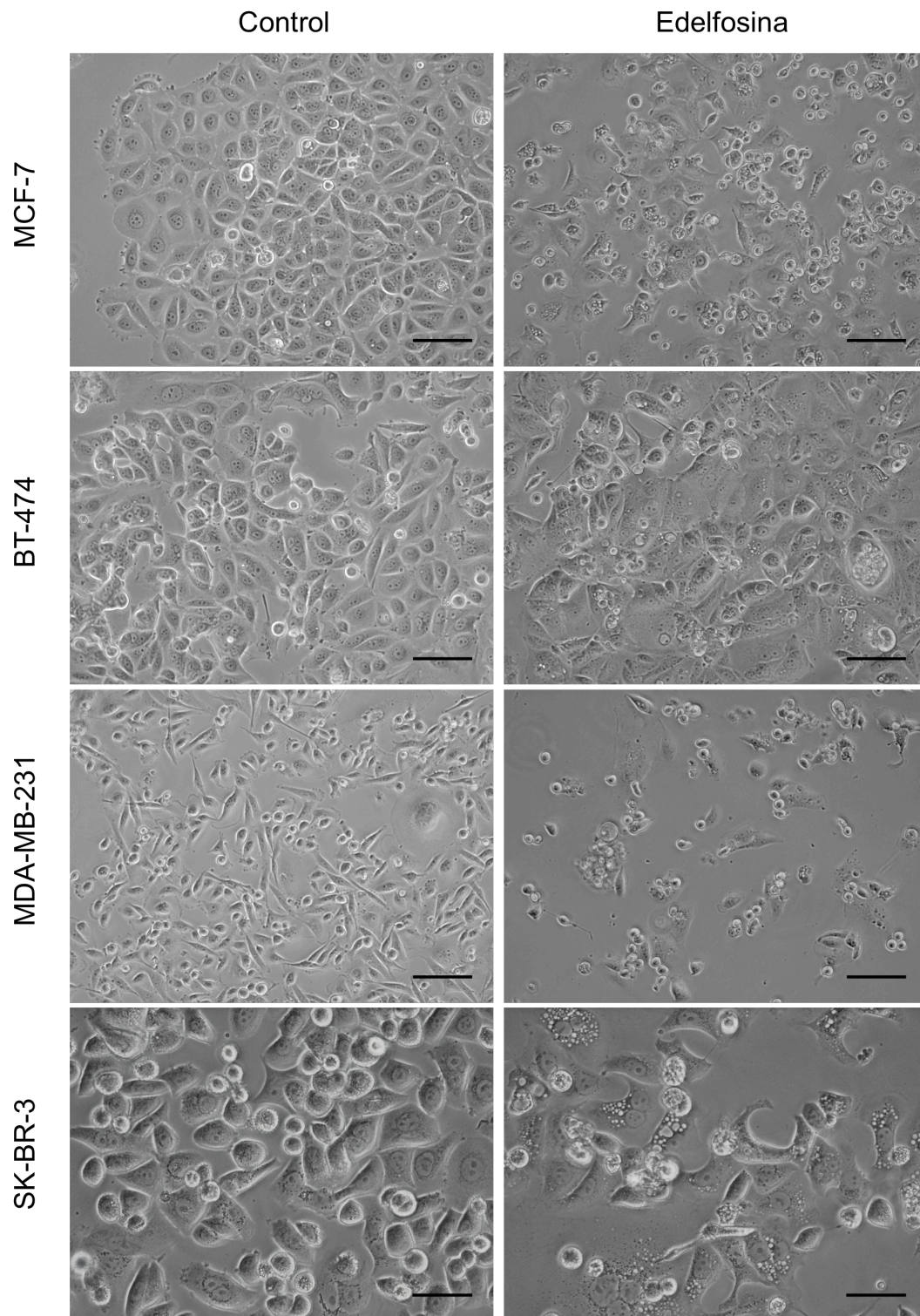


Figura R5: Imágenes de microscopía óptica en campo claro de distintas líneas tratadas con edelfosina. Las líneas utilizadas fueron MCF-7 del subtipo Luminal A, BT-474 del subtipo Luminal B, MDA-MB-231 del subtipo Triple Negativo (Imágenes 10x, Barra de escala: 100 μ m) y la línea SK-BR-3 del subtipo HER2 (Imágenes 20x, Barra de escala: 50 μ m), en las que se aprecia mejor la intensa vacuolización inducida tras el tratamiento.

Como vemos en las figuras R6-A, R7-A y R10-A, las líneas BT-474, AU-565, SK-BR-3, HCC-1569, HCC-1937 y SUM-149-PT, sufrieron una disminución del tamaño y la complejidad celulares, y degradación del DNA (líneas sombreadas). Las líneas MCF-7 (Figura R6-A) y MDA-MB-468 (Figura R10-A) presentaron estas características en un grado mucho menor. Por el contrario, las líneas MDA-MB-231, MDA-MB-435, 435-Lung y BT-549 (Figuras R8-A y R9-A) sufrieron un aumento de la complejidad celular, y solo un bajo porcentaje de la población celular presentó degradación de DNA y disminución de tamaño celular. No se observó aumento del tamaño celular, característica de necrosis,²³⁸ con el tratamiento en ninguna de las líneas estudiadas.

Tabla R3: Efecto del tratamiento con edelfosina sobre la morfología celular y el DNA. Se indican las líneas que sufren una disminución del tamaño y de la complejidad celular, un aumento de la complejidad celular y las líneas que sufren degradación del DNA. Se indica entre paréntesis cuando este efecto es menor y se indican con sombreado gris aquellas líneas que comparten características de manera uniforme.

Disminución de tamaño	de Disminución de complejidad	Aumento de complejidad	de Degradación de DNA
MCF-7	MCF-7		MCF-7 (menor)
BT-474	BT-474		BT-474
AU-565	AU-565		AU-565
SK-BR-3	SK-BR-3		SK-BR-3
HCC-1569	HCC-1569		HCC-1569
MDA-MB-231 (menor)		MDA-MB-231	
MDA-MB-435 (menor)		MDA-MB-435	MDA-MB-435 (menor)
		435-Lung	
BT-549 (menor)		BT-549	BT-549 (menor)
Hs-578-T (menor)			Hs-578-T (menor)
MDA-MB-468 (menor)			MDA-MB-468 (menor)
SUM-149-PT	SUM-149-PT		SUM-149-PT
HCC-1937	HCC-1937		HCC-1937

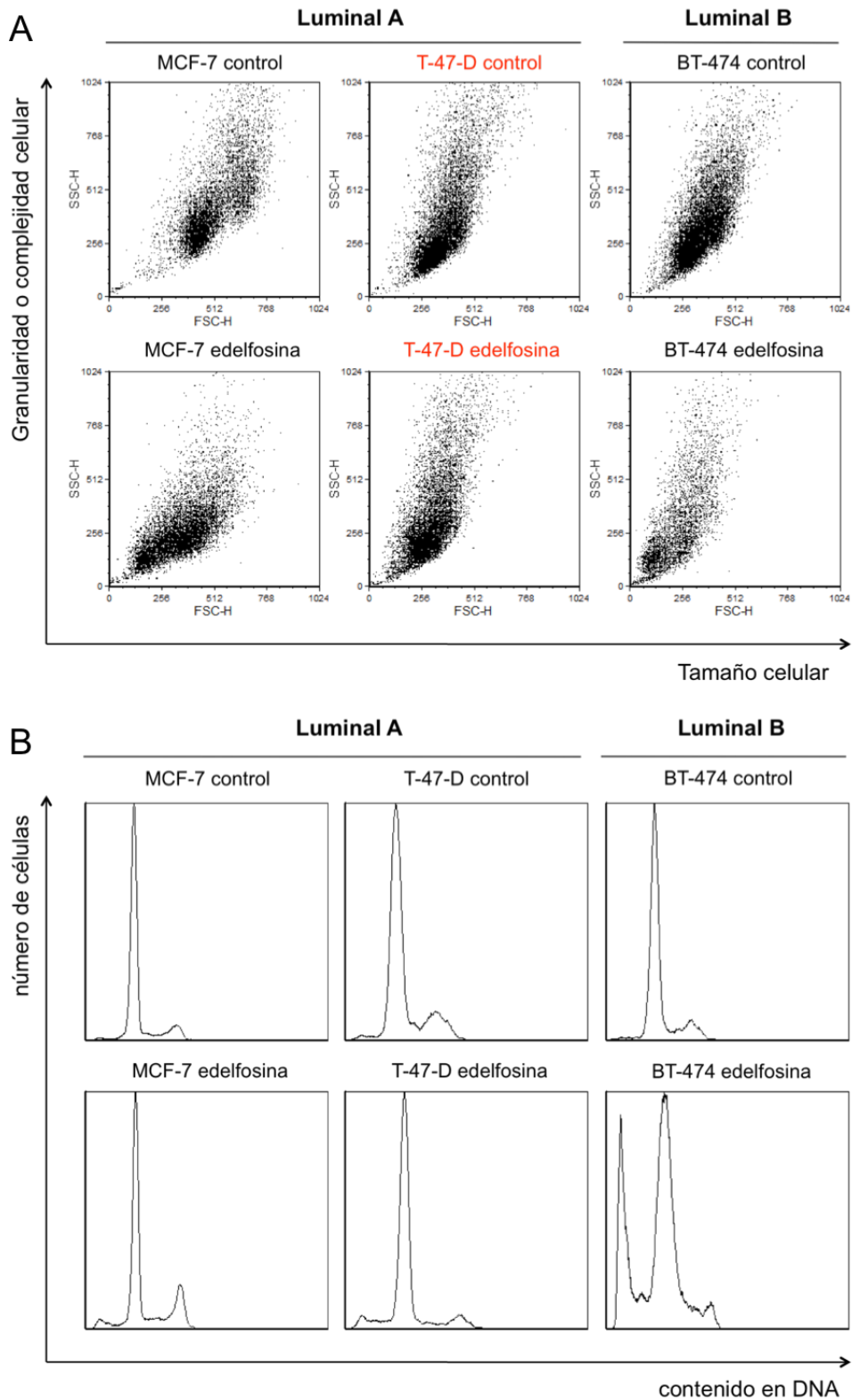


Figura R6: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo *Luminal*. Diagramas de puntos (A) representando la complejidad o granularidad celular en el eje Y, frente al tamaño celular en el eje X. Perfiles de ciclo celular (B) de las líneas MCF-7, T-47-D y BT-474. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Tratamientos de 24 h en la línea MCF-7 y 48 h en las líneas T-47-D y BT-474.

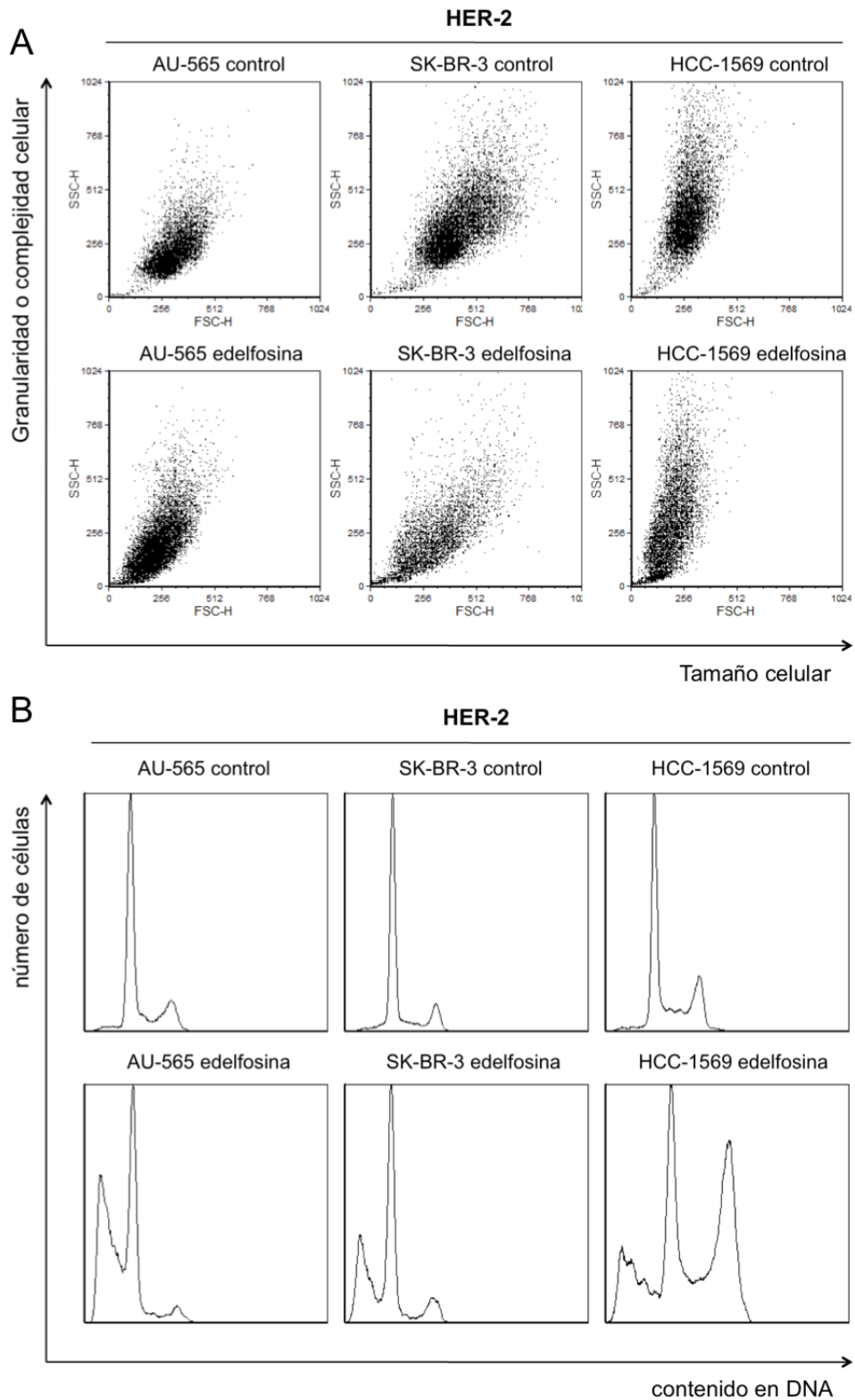


Figura R7: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo *HER2*. Diagramas de puntos (A) representando la complejidad o granularidad celular en el eje Y, frente al tamaño celular en el eje X. Perfiles de ciclo celular (B) de las líneas AU-565, SK-BR-3 y HCC-1569. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Tratamientos de 48 h.

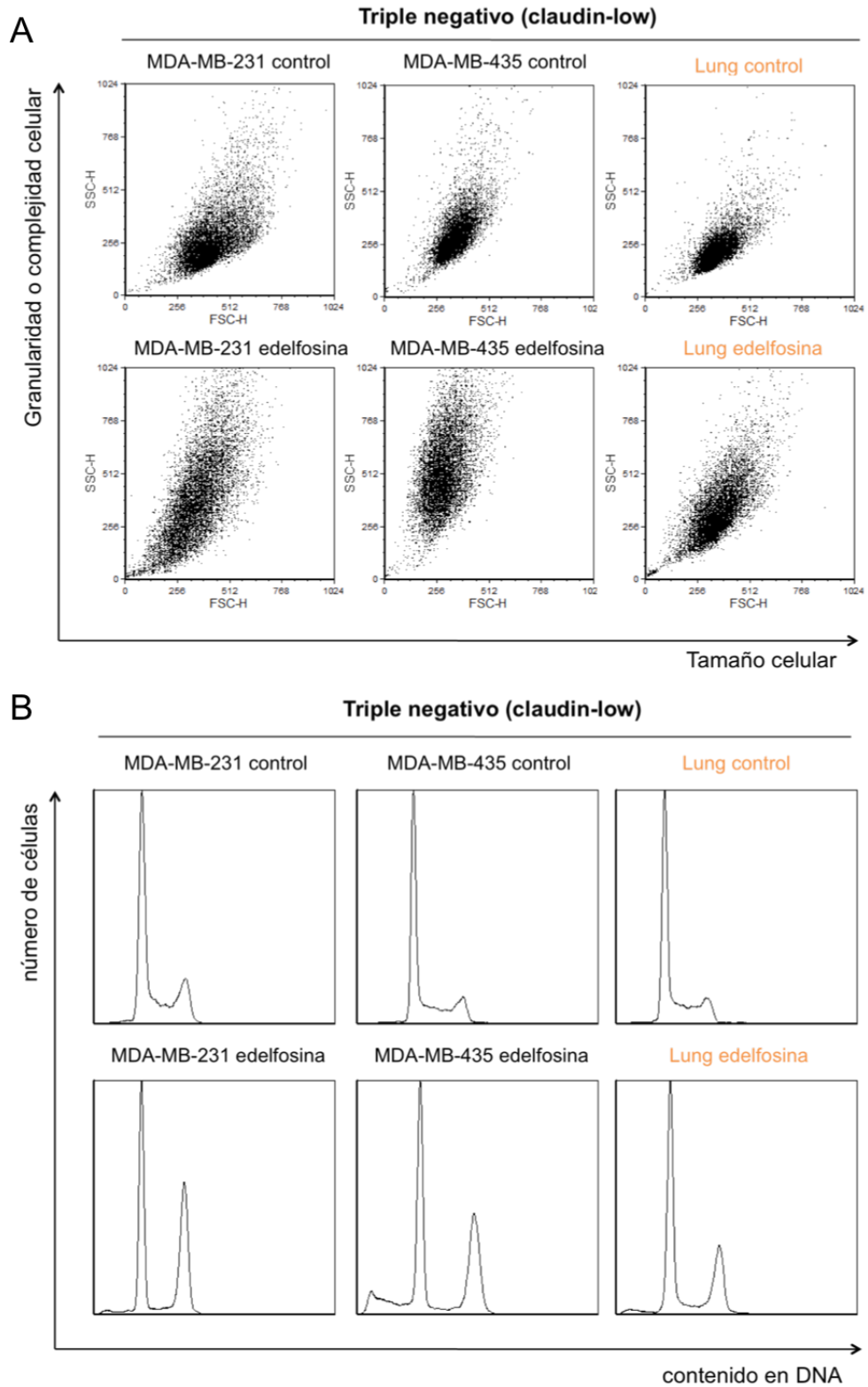


Figura R8: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo *Triple Negativo (claudin-low)*. Diagramas de puntos (A) representando la complejidad o granularidad celular en el eje Y, frente al tamaño celular en el eje X. Perfiles de ciclo celular (B) para las líneas MDA-MB-231, MDA-MB-435 y 435-Lung. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Tratamientos de 24 h.

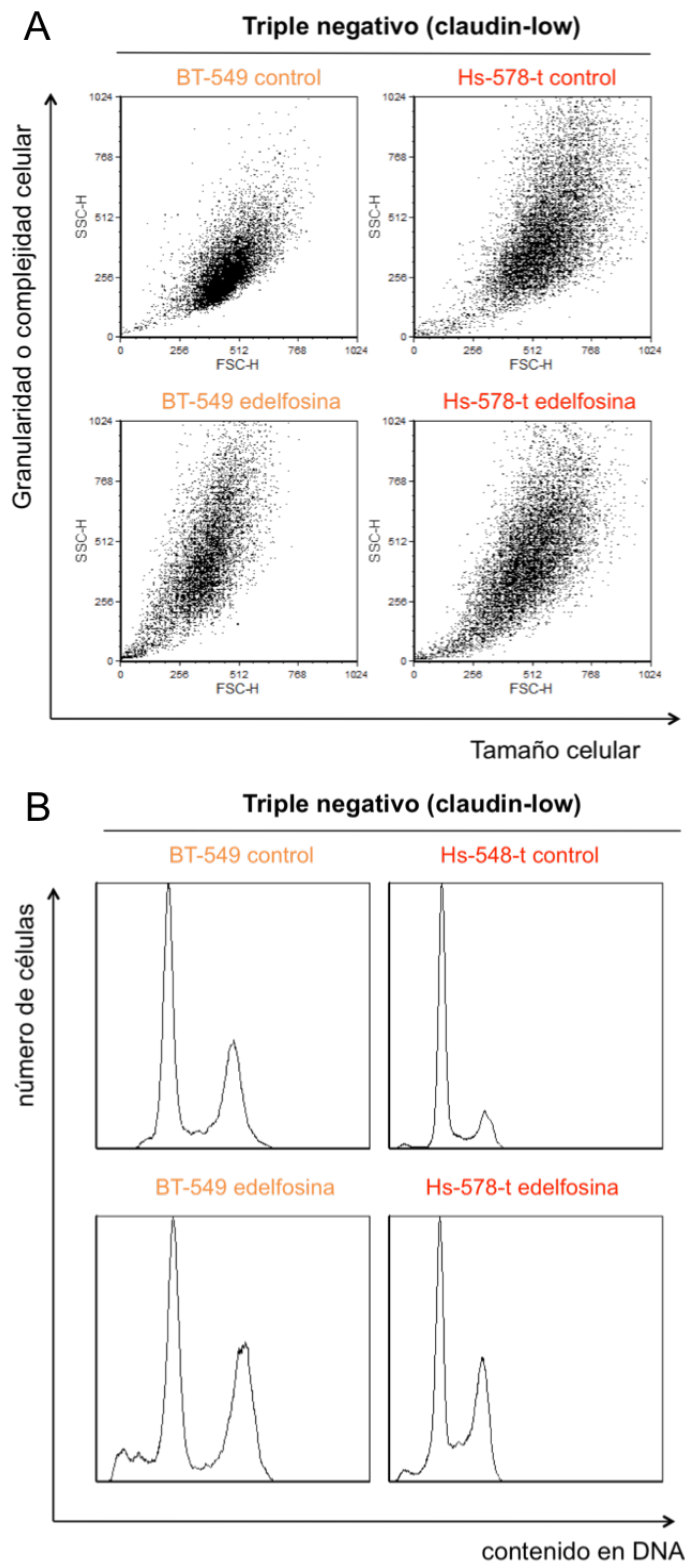


Figura R9: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo *Triple Negativo (claudin-low)* continuación. Diagramas de puntos (A) representando la complejidad o granularidad celular en el eje Y, frente al tamaño celular en el eje X. Perfiles de ciclo celular (B) para las líneas BT-549 y Hs-578-T. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Tratamientos de 48 h.

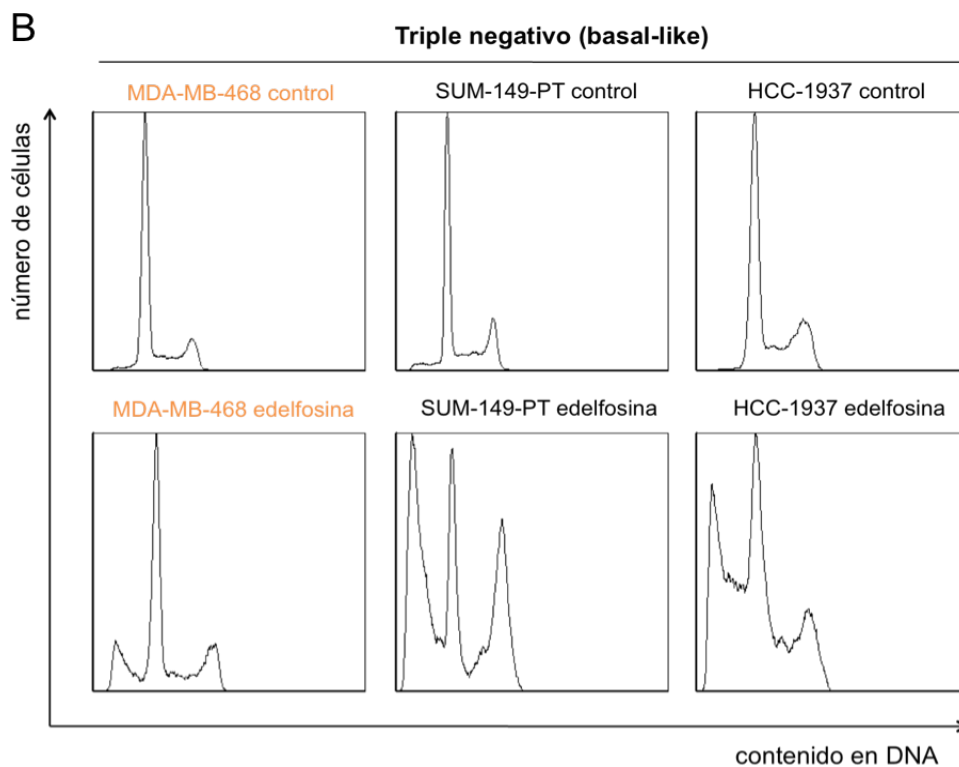
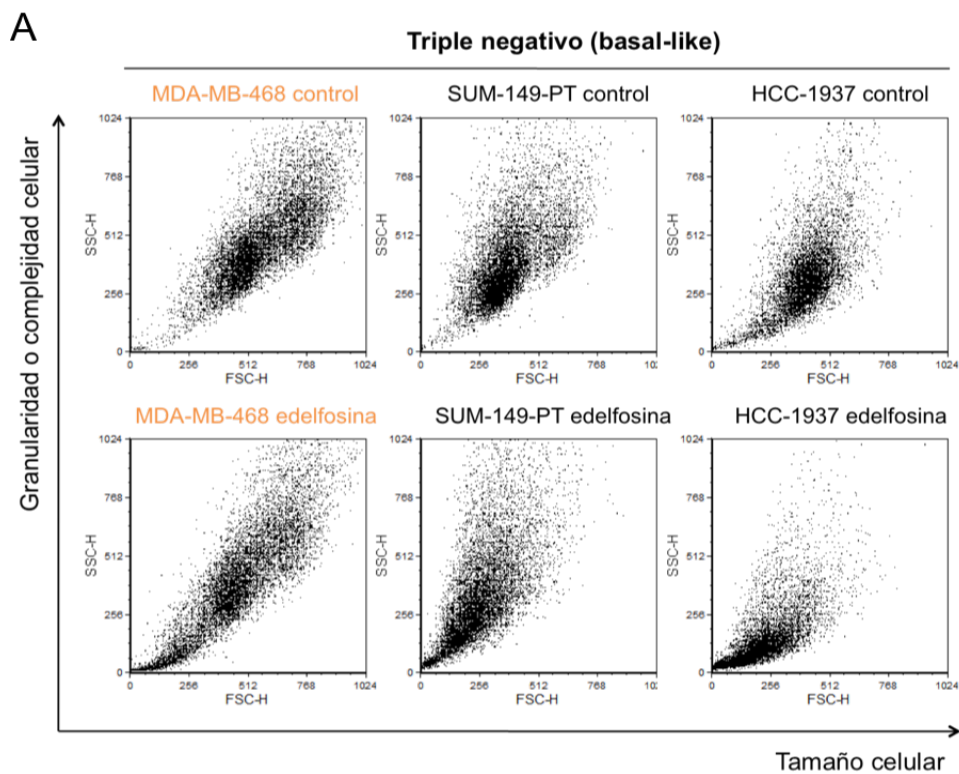


Figura R10: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo *Triple Negativo (basal-like)*. Diagramas de puntos (A) representando la complejidad o granularidad celular en el eje Y, frente al tamaño celular en el eje X. Perfiles de ciclo celular (B) para las líneas MDA-MB-468, SUM-149-PT y HCC-1937. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes. Tratamientos de 48 h.

1.6 La degradación de DNA inducida por la edelfosina es dependiente de caspasas

Además de la degradación de DNA, quisimos estudiar otros marcadores de apoptosis como son la activación de caspasas efectoras como la caspasa-3 y la caspasa-7, y la fragmentación de su diana, la proteína PARP-1. Esta proteína es inactivada por caspasas durante la apoptosis impidiendo que se reparen posibles daños en el DNA, en el transcurso del desmantelamiento celular.²⁴⁰

El tratamiento con edelfosina induce la activación de caspasas efectoras en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231

El tratamiento con edelfosina indujo una ligera expresión del fragmento activo de la caspasa 3 en la línea MDA-MB-231. La línea MCF-7 carece de caspasa-3, pero mostró una inducción del fragmento activo de la caspasa-7 con el tratamiento. Estos resultados sugieren que la edelfosina induce la activación de caspasas, siendo una activación muy leve en el caso de la línea MDA-MB-231 (Figura R11). Este resultado es congruente con la poca degradación del DNA observada para esta línea (Figura R4, tratamiento de 48 h y R8, tratamiento de 24 h).

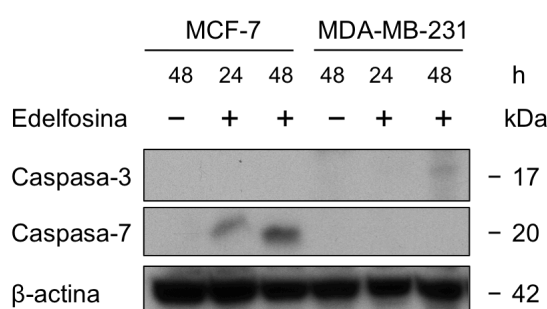


Figura R11: Efecto de la edelfosina sobre la fragmentación de las caspasas 3 y 7 en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231. Células de las línea MCF-7 y MDA-MB-231 sin tratar y tratadas con edelfosina, fueron lisadas a las 24 h de tratamiento. Se indica la expresión del fragmento activo de la caspasa-3 (17 kDa) y la caspasa-7 (20 kDa). Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

El inhibidor de caspasas z-VAD-fmk inhibe la fragmentación de PARP-1 inducida por edelfosina

Para estudiar si el tratamiento con edelfosina inducía la fragmentación de PARP-1, analizamos su expresión en células MCF-7 sin tratar y tratadas con edelfosina. Para analizar también si era un proceso dependiente de caspasas, utilizamos el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. El tratamiento con edelfosina a distintos tiempos indujo la

fragmentación de PARP-1 y ésta se inhibió totalmente con el pretratamiento de las células con el inhibidor de caspasas. Estos resultados sugieren que la fragmentación de PARP-1 inducida por el tratamiento, sería dependiente de caspasas en la línea MCF-7 (Figura R12).

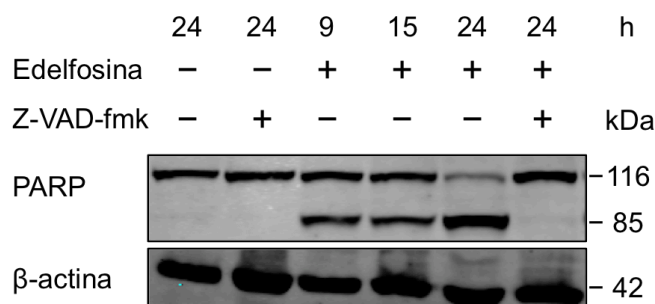


Figura R12: Efecto de la edelfosina sobre la fragmentación de PARP-1. Células de la línea MCF-7 sin tratar y tratadas con edelfosina, pretratadas o no con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk fueron lisadas a las 9, 15 y 24 h de tratamiento. Se indica la fragmentación de la proteína total PARP-1 (116 kDa) originando su fragmento (85 kDa), característico de una escisión por caspasas efectoras. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

La inhibición general de caspasas inhibe la degradación del DNA inducida por edelfosina

Para estudiar la implicación de caspasas en el efecto de la edelfosina sobre la degradación del DNA, analizamos el ciclo celular de las células con y sin un pretratamiento con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. Como vemos en la figura R13, la degradación del DNA se inhibió en todos los casos con porcentajes altamente significativos excepto en la línea MDA-MB-468. Estos resultados sugieren que, los procesos de degradación del DNA inducidos por edelfosina en cáncer de mama serían mayoritariamente dependientes de caspasas.

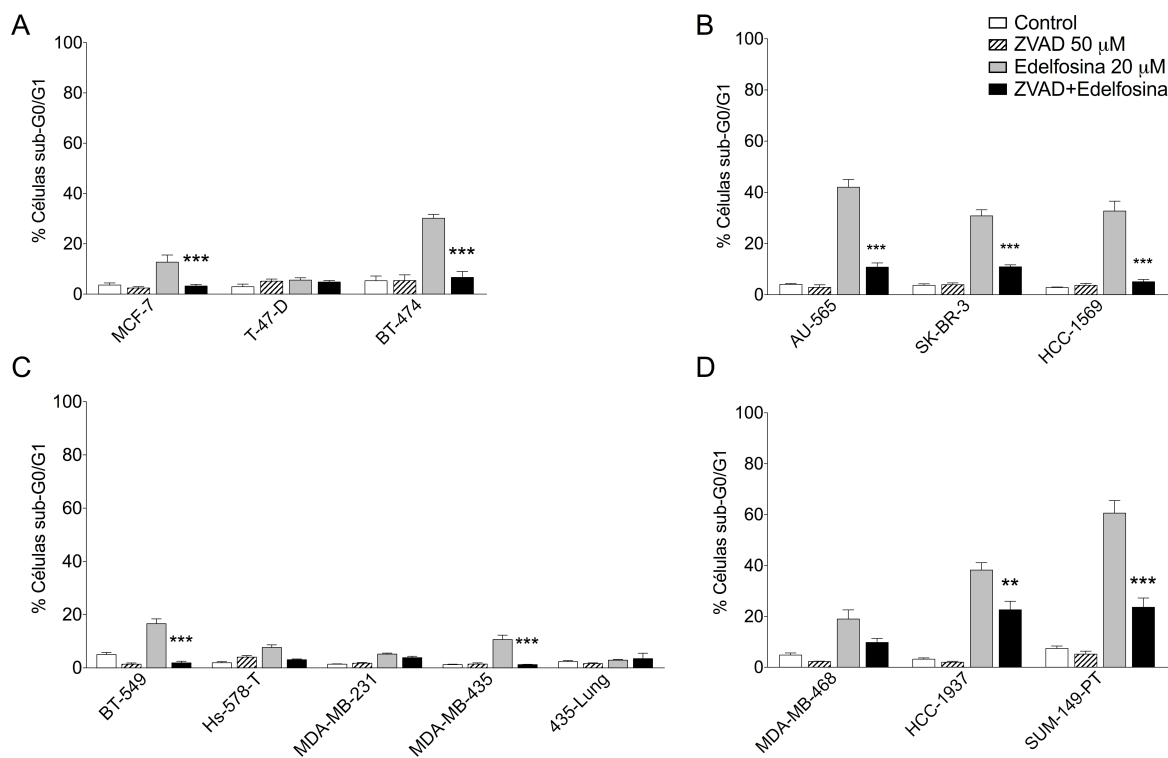


Figura R13: Efecto del pretratamiento con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk sobre la degradación del DNA inducida por edelfosina. Células del subtipo Luminal (A), HER2 (B), Triple Negativo /Claudin-low (C) y Triple Negativo/Basal-like (D) sin tratar, tratadas con z-VAD-fmk, tratadas con edelfosina y pretratadas con z-VAD-fmk y tratadas con edelfosina se recogieron a las 48 h y posteriormente se analizaron por citometría de flujo para cuantificar las células hipodiploides. Los resultados se expresan como la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes para cada línea celular (** P<0.01, *** P<0.001).

1.7 La activación de caspasas no es imprescindible para la muerte celular

Para estudiar si la activación de caspasas es un proceso implicado en la muerte celular analizamos la permeabilidad de la membrana plasmática, paralelamente al estudio del ciclo celular. El pretratamiento con z-VAD-fmk solo disminuyó la permeabilización de la membrana plasmática en dos líneas celulares de forma estadísticamente significativa, a pesar de que inhibió la degradación de DNA en todas las líneas (Figura R14). Estos resultados parecen indicar que la activación de caspasas podría ser un proceso paralelo al resto de procesos que llevan a la muerte celular y el peso de este en el destino final de la célula dependería del contexto celular.

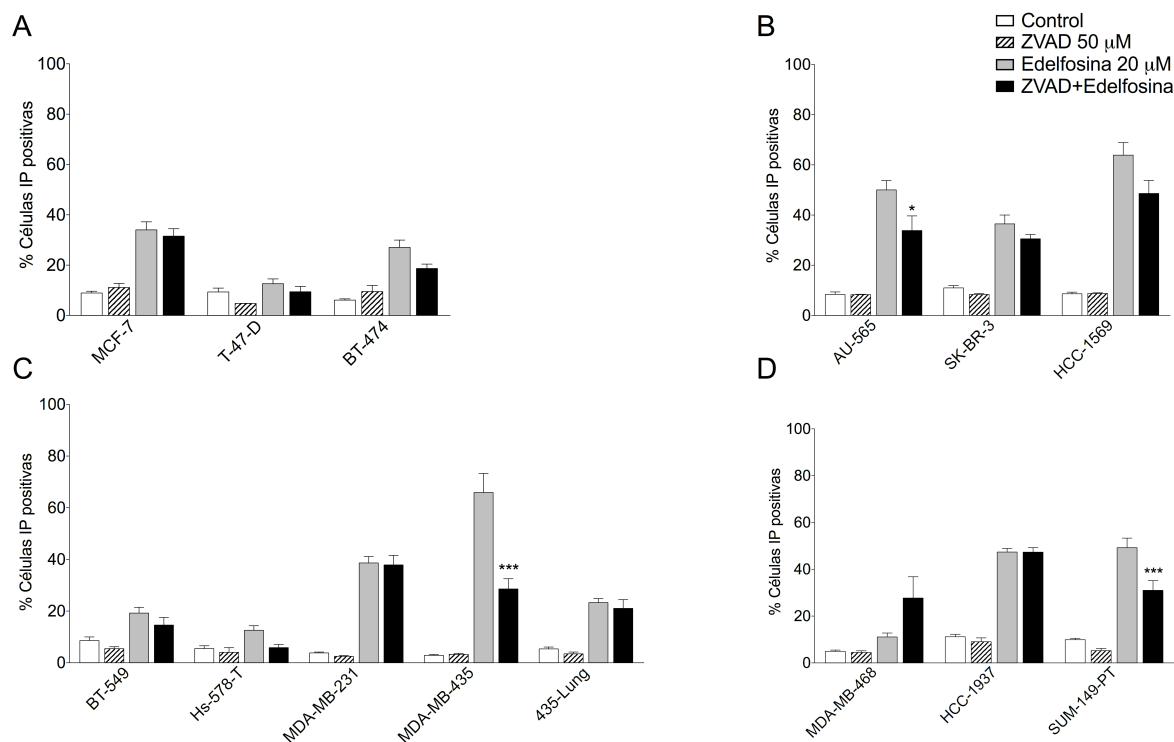


Figura R14: Efecto del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk sobre la permeabilidad de la membrana plasmática inducida por edelfosina. Células sin tratar, tratadas con z-VAD-fmk, tratadas con edelfosina y, pretratadas con z-VAD-fmk y tratadas con edelfosina se recogieron a las 48 h y posteriormente se analizaron por citometría de flujo para cuantificar las células con incorporación de ioduro de propidio. Los resultados se expresan como la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes para cada línea celular (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

1.8 No hay implicación de AIF en la degradación de DNA

Otra de las proteínas implicadas en la muerte de tipo apoptótica es AIF (apoptosis-inductor factor) que sale de la mitocondria y se trasloca al núcleo donde induce la fragmentación del DNA en tamaños grandes (50 kB aproximadamente). Este tipo de fragmentación del DNA no puede detectarse en el estudio del ciclo celular convencional ya que, en este ensayo se fijan y permeabilizan las células con etanol. Los poros producidos por el etanol no son lo suficientemente grandes como para permitir la salida de fragmentos de DNA de ese tamaño, por lo que sería necesario otro tipo de análisis para detectarlos.

Sabemos por otros estudios que la edelfosina produce daño en la mitocondria y otros orgánulos como el retículo endoplásmico²⁴¹. Dado que el daño en la mitocondria puede inducir la salida de AIF,²⁴² quisimos analizar por microscopía confocal si el tratamiento con edelfosina inducía algún tipo de cambio en su distribución subcelular.

Para ello realizamos una inmunofluorescencia con las células MCF-7 sin tratar (Figura R15-A) y tratadas con edelfosina (Figura R15-B). Este estudio no reveló ningún cambio en el patrón de distribución de AIF con el tratamiento. Estos resultados sugerirían que AIF no estaría implicado en la respuesta celular al tratamiento con edelfosina.

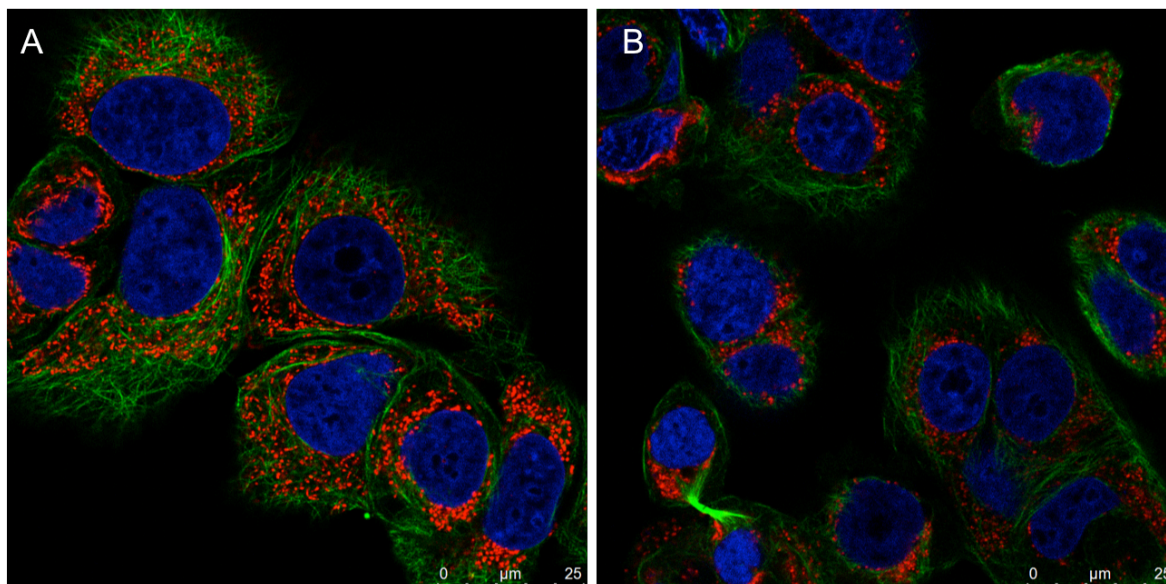


Figura R15: Efecto del tratamiento con edelfosina sobre la distribución subcelular de AIF en células MCF-7. Imágenes de microscopía confocal de células MCF-7 fijadas después de haber sido cultivadas normalmente durante 12 h (A) o tratadas con edelfosina a una concentración de 20 μ M (B). AIF: rojo, Núcleo: DAPI, α Tubulina: verde. Barra de escala = 25 μ m.

2. La inhibición de la autofagia sensibiliza las líneas resistentes a edelfosina

Hemos visto que el tratamiento con edelfosina induce procesos apoptóticos y necróticos en células de cáncer de mama. Quisimos saber si la autofagia podía tener algún papel en la muerte celular inducida por edelfosina. Para ello analizamos la expresión de la proteína LC3 (cadena ligera 3 asociada a microtúbulos), ampliamente utilizada en la literatura como un marcador de autofagia.²⁴³ La conversión de LC3 (LC3-I a LC3-II) nos indica la formación de autofagosomas y puede detectarse por western blot,²⁴³ ya que la cantidad de LC3-II correlaciona con la cantidad de autofagosomas. En este proceso, la forma LC3-I o LC3A sería la forma citosólica y la forma LC3-II o LC3B (unida a fosfatidiletanolamina, PE) sería la

forma lipídada, unida a la membrana de los autofagosomas. Para estos estudios utilizamos las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

2.1 La edelfosina induce la acumulación de autofagosomas

Para estudiar la lipidación de LC3B, células sin tratar o tratadas con edelfosina fueron analizadas a distintos intervalos de tiempo. La edelfosina indujo la expresión de LC3B a partir de los 30 min de tratamiento y ésta fué aumentando a lo largo del tiempo. Estos resultados nos indicarían que el tratamiento con edelfosina está induciendo la acumulación de autofagosomas. Sin embargo, esto podría deberse tanto a la inducción de autofagia como a un bloqueo de la autofagia basal, por ejemplo a nivel de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas o a nivel de la degradación lisosomal.²⁴⁴

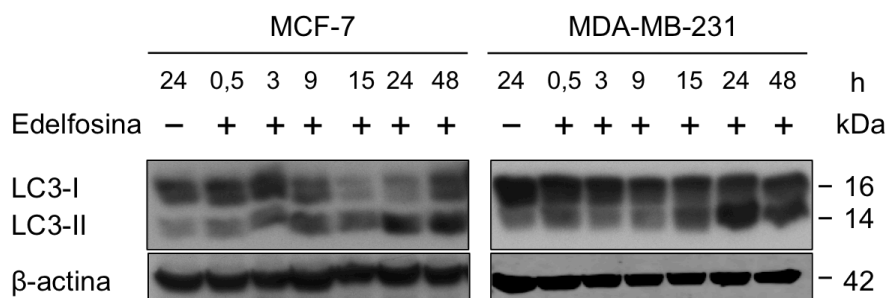


Figura R16: Efecto de la edelfosina sobre la conversión de LC3. Células de las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 sin tratar y tratadas a una concentración de 20 μ M de edelfosina fueron lisadas a distintos tiempos y se analizó la lipidación (Paso de LC3-I a LC3-II o LC3B, forma unida a PE en la membrana de los autofagosomas) de la proteína LC3. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

2.2 La edelfosina induce autofagia

Para poder estudiar si la acumulación de autofagosomas se debe a la inducción o a un bloqueo de la degradación autofágica, se debería comparar la acumulación de autofagosomas con y sin un inhibidor de autofagia a este nivel, como pueden ser la cloroquina o la bafilomicina (inhibidores de la función lisosomal que impiden la degradación). De esta forma si al inhibir la degradación de los autofagosomas, estos se acumulan podríamos afirmar que se está induciendo su formación. Si por el contrario, no se da una acumulación de autofagosomas podríamos decir que se está produciendo un bloqueo en su degradación.²⁴⁴

Para estudiar si el tratamiento con edelfosina inducía autofagia pretratamos células de la línea MCF-7 con cloroquina antes de tratar con edelfosina durante 24 h (Figura R17). El pretratamiento con cloroquina, y posterior tratamiento con edelfosina, indujo una acumulación de LC3-II mayor que la producida por el tratamiento con edelfosina (Figura

R17). Estos resultados reflejan un aumento del flujo autofágico tras el tratamiento con edelfosina y sugieren que la edelfosina induce autofagia en células MCF-7.

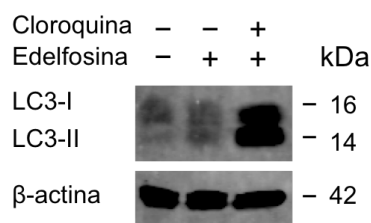


Figura R17: Efecto de la edelfosina sobre la inducción de LC3-II en células MCF-7, en presencia y ausencia de cloroquina. Células de la línea MCF-7 sin tratar y tratadas con edelfosina, se pretrataron o no durante 1 h con un inhibidor de la función lisosomal como la cloroquina. La cloroquina es una base débil que, en su forma sin carga, penetra en el lisosoma donde pasa a estar cargada y aumenta el pH lisosomal, inhibiendo así su función. Después de 24 h de tratamiento se lisaron y se analizó la expresión de la proteína LC3-II, observándose una mayor expresión en las células pretratadas con cloroquina que en las tratadas con edelfosina únicamente. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

2.3 La inhibición de la autofagia aumenta la muerte celular en parte de las líneas celulares estudiadas

Quisimos saber si la autofagia inducida por edelfosina tenía algún papel en la muerte celular. Para ello analizamos si la inhibición del flujo autofágico tenía un efecto sobre la permeabilidad de la membrana plasmática. Teniendo en cuenta que la autofagia inducida por edelfosina podía ser un efecto general decidimos hacer el estudio con todas las líneas celulares.

Para este estudio realizamos ensayos con cloroquina y bafilomicina en las distintas líneas y elegimos para cada una, el inhibidor que no tenía efectos sobre la viabilidad celular. La concentración de cada inhibidor se estudió en las líneas MCF-7, MDA-MB-231 y MDA-MB-468. En primer lugar se eligieron dos concentraciones de uso en la literatura para la cloroquina ²⁴⁵ y dos para la bafilomicina. ²⁴⁶ Con ellas se realizaron curvas de dosis-respuesta en varias líneas celulares y se eligieron dos concentraciones de cloroquina y una de bafilomicina para utilizar en el resto de líneas. Después de analizar estas concentraciones para cada línea, se eligió la concentración adecuada. Las líneas AU-565, HCC-1569, SK-BR-3, BT-474, T-47-D, SUM-149-PT y HCC-1937 fueron pretratadas con cloroquina a una concentración de 15 μ M, las líneas MCF-7, MDA-MB-231, Hs-578-T, BT-549, MDA-MB-435 y 435-Lung fueron pretratadas con cloroquina 25 μ M y la línea MDA-MB-468 con Bafilomicina a una concentración de 10 nM. En todos los casos las células se pretrataron durante 1 h antes de añadir la edelfosina y no se eliminó el inhibidor. Para los

tratamientos con edelfosina se usó una concentración de 20 μM durante 48 h, al igual que en los estudios anteriores.

El pretratamiento con inhibidores lisosomales aumentó la permeabilización de la membrana plasmática en las líneas MDA-MB-468 y 435-Lung de forma altamente significativa (4,5 y 3,9 veces respectivamente) con respecto al tratamiento con edelfosina (Figura R19). También se produjo un aumento significativo de la muerte celular en la línea MDA-MB-435, con un 20 % más de células positivas para ioduro de propidio que con el tratamiento con edelfosina (Figura R19).

En ninguna línea se inhibió la muerte celular de forma estadísticamente significativa. Estos datos sugieren que la autofagia no tendría un papel en la muerte celular inducida por edelfosina.

Por el contrario, en aquellas líneas medianamente resistentes al tratamiento como son la MDA-MB-468 y la 435-Lung, la inhibición de la autofagia aumentó la muerte celular (Figura R19). Estos resultados sugieren que en estas líneas, la autofagia podría estar jugando un papel de resistencia al tratamiento. En la línea medianamente resistente, BT-549 y en las resistentes, T-47-D y Hs-578-T (Tabla R2) no se produjo ningún cambio significativo (Figura R19). De igual forma, en las líneas sensibles no se produjeron cambios excepto por el aumento en la línea MDA-MB-435 antes mencionado (Figura R19).

Quisimos saber si la inhibición de la autofagia podía tener efectos sobre los procesos de muerte celular apoptótica. Para ello en este mismo estudio, se tomaron muestras para el análisis del ciclo celular y se cuantificó la degradación del DNA en las distintas líneas. La inhibición de la autofagia no disminuyó la degradación del DNA en ninguna línea celular, aunque hay una disminución en la línea BT-474 pero sin significación estadística (Figura R20). En cambio, se produjo un aumento altamente significativo en las líneas HCC-1569, BT-549 y MDA-MB-468 (Figura R20). También hubo un aumento de la degradación del DNA en la línea MDA-MB-231, pero no fué estadísticamente significativo. Estos resultados apoyan los resultados sobre la permeabilidad de la membrana y sugieren en su conjunto, que la autofagia no tiene un papel en la muerte celular inducida por edelfosina, sino mas bien un papel de resistencia al tratamiento en algunas líneas.

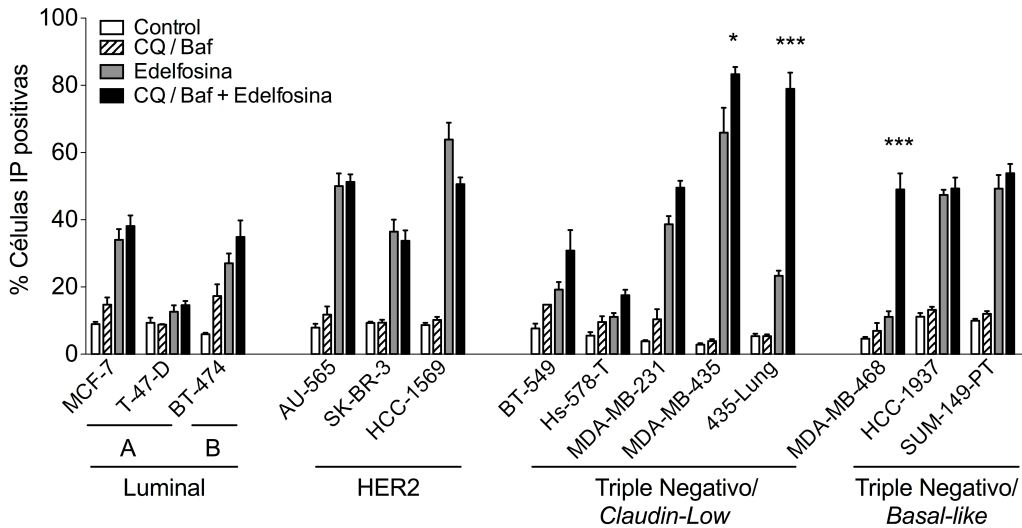


Figura R18: Efecto de los inhibidores lisosomales sobre la incorporación de ioduro de propidio tras el tratamiento con edelfosina. Células sin pretratar o pretratadas durante 1 h con su correspondiente inhibidor lisosomal (cloroquina 15 μ M y 25 μ M, bafilomicina 10 nM) fueron o no tratadas con edelfosina a una concentración de 20 μ M durante 48 h y analizadas por citometría de flujo. Se cuantificó el porcentaje de células positivas para ioduro de propidio y se representa la media y desviación típica de al menos tres experimentos independientes para cada línea (* P < 0.05, *** P < 0.001).

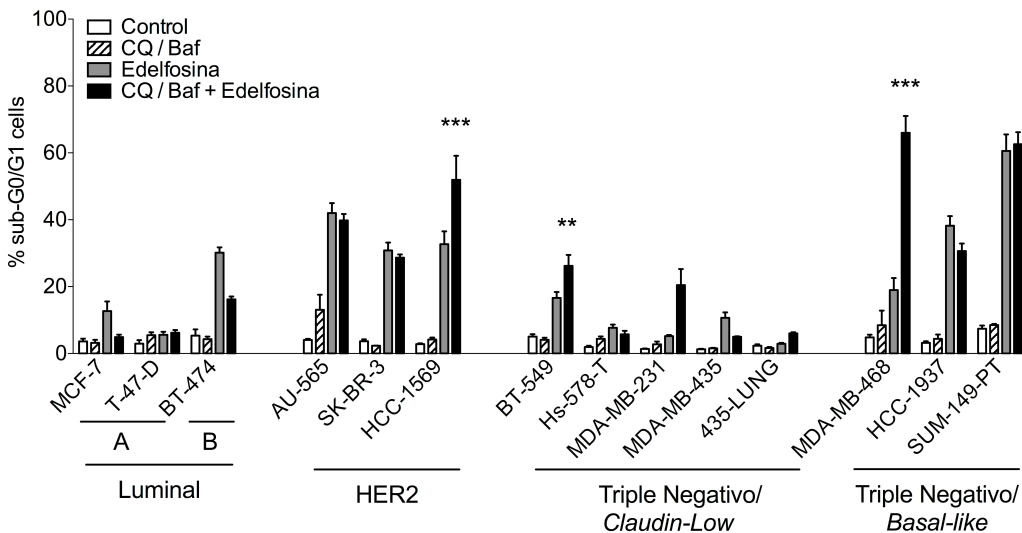


Figura R19: Efecto de los inhibidores lisosomales sobre la degradación del DNA inducida por edelfosina. Células sin pretratar o pretratadas durante 1 h con su correspondiente inhibidor lisosomal (cloroquina 15 μ M, cloroquina 25 μ M, bafilomicina 10 nM) fueron o no tratadas con edelfosina a una concentración de 20 μ M durante 48 h y analizadas por citometría de flujo. Se cuantificó el porcentaje de células positivas subG0/G1 y se representa la media y desviación típica de al menos tres experimentos independientes para cada línea (** P < 0.01, *** P < 0.001).

2.4 Las líneas resistentes sufren un aumento de la muerte celular con la inhibición de la autofagia

Dado el efecto sobre las líneas MDA-MB-468, 435-Lung y BT-549, las tres medianamente resistentes, quisimos saber si la inhibición de la autofagia tenía algún efecto sobre las líneas resistentes y medianamente resistentes que no habían mostrado un cambio significativo a las 48 h de tratamiento y realizamos este estudio con tiempos de tratamiento de 96 h.

La inhibición de la autofagia aumentó la degradación del DNA de forma altamente significativa en las cuatro líneas estudiadas (Figura R21). También se produjo un aumento significativo en la permeabilización de la membrana plasmática en las células Hs-578-T, y obviamente en las 435-Lung que ya mostraban este aumento a las 48 h. No aumentó, sin embargo, el porcentaje de permeabilización de la membrana en las células T-47-D y BT-549 (Figura R21).

Estos resultados en su conjunto sugieren que la autofagia inducida por edelfosina juega un papel de resistencia en las líneas menos sensibles al tratamiento. También nos indicarían que no tiene ningún papel en la muerte celular, sugiriendo que la autofagia sería un proceso paralelo en las líneas sensibles a edelfosina, que podría retrasar la muerte apoptótica en el caso de las células HCC-1569.

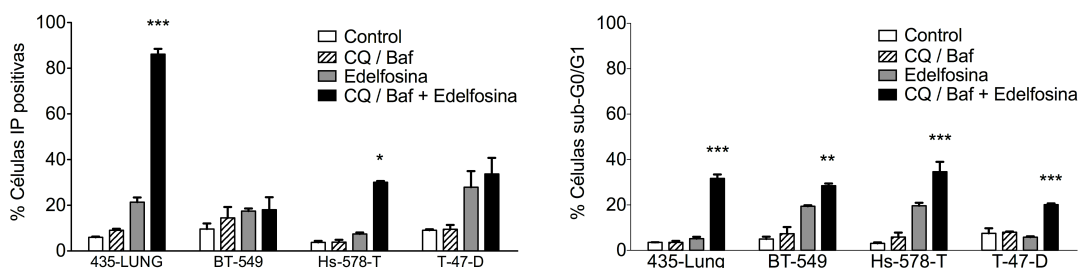


Figura R20: Efecto de los inhibidores lisosomales sobre el efecto del tratamiento con edelfosina en las líneas resistentes. Células sin pretratar o pretratadas durante 1 h con su correspondiente inhibidor lisosomal (T-47-D: cloroquina 15 μ M, BT-435-Lung, BT-549 y Hs-578-T: cloroquina 25 μ M) fueron o no tratadas con edelfosina a una concentración de 20 μ M durante 48 h y analizadas por citometría de flujo. Se cuantificó el porcentaje de células positivas para yoduro de propidio (izquierda) y el porcentaje de células subG0/G1 (derecha). Se representa la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes para cada línea (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$)

3. La edelfosina induce un aumento de células en fase G2/M sin afectar al DNA

Como hemos visto en los perfiles de ciclo celular, el tratamiento con edelfosina induce un aumento del número de células en fase G2/M en parte de las líneas estudiadas. Este cambio podría deberse a una parada del ciclo celular en la fase G2 o en la fase M. Existen tres puntos de control del ciclo celular que impiden que la célula se divida si las condiciones externas e internas no son las adecuadas. El punto de control de la fase G1 se encarga de asegurar las condiciones externas y los puntos de control de las fases G2 y M, las internas. El punto de control de la fase G2 impide la progresión del ciclo celular en caso de daño en el DNA y el de la fase M detiene el ciclo si los cromosomas no se han unido al huso mitótico, asegurando la correcta segregación cromosómica²⁴⁷.

Una de las líneas en la que se da un aumento de las células en fase G2/M en mayor proporción es la MDA-MB-231 (Figuras R8-B, R22). Por el contrario la línea MCF-7 no sufre ningún cambio en el ciclo celular (Figuras R6-B, R22). Escogimos estas dos líneas para realizar los ensayos con el fin de comparar ambos modelos.

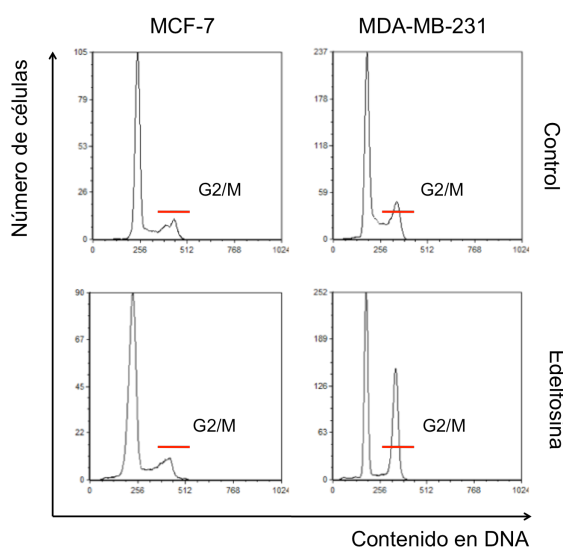


Figura R21: Comparación del efecto de edelfosina sobre el ciclo celular en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231. Células sin tratar y tratadas con edelfosina durante 24 h y analizadas por citometría de flujo. Se observa como el tratamiento con edelfosina induce un aumento en la proporción de células en la fase G2/M en la línea MDA-MB-231, mientras que no induce ningún cambio en la línea MCF-7.

3.1 El tratamiento con edelfosina induce un aumento de la fase G2/M del ciclo celular

El tratamiento con edelfosina indujo una acumulación de células en la fase G2/M del ciclo en la línea MDA-MB-231 a lo largo del tiempo (Figura R23). Estos resultados sugieren una parada del ciclo celular que podría darse en la fase G2 o en la fase M. Para analizar estas posibilidades quisimos estudiar la expresión de un marcador de la fase G2, la proteína CDK1 (Quinasa dependiente de ciclina 1 o cdc2).

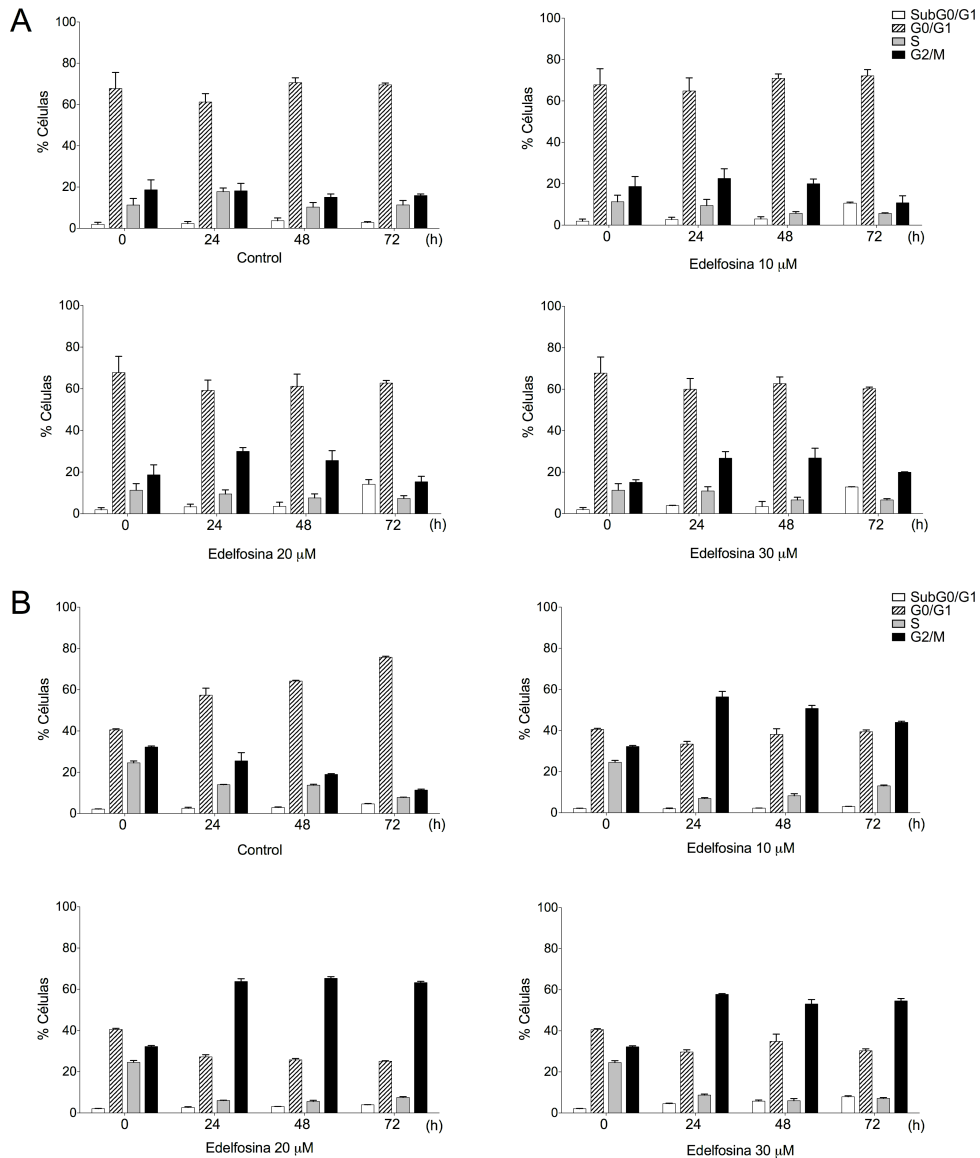


Figura R22: Efecto de la edelfosina sobre el ciclo celular a lo largo del tiempo en las células MCF-7 y MDA-MB-231. Células de las líneas MCF-7 (A) y MDA-MB-231 (B) sin tratar y tratadas con 20 µM de edelfosina durante 24, 48 y 72 h, fueron fijadas y procesadas como se indica en los materiales y métodos, y analizadas por citometría de flujo. Se cuantificaron las distintas fases del ciclo celular para cada línea y se representan la media y desviación típica de al menos tres experimentos independientes.

3.2 El aumento de células en fase G2/M no se debe a una parada del ciclo en la fase G2

Durante la parada de ciclo celular en fase G2, se produce una acumulación de la forma fosforilada de CDK1.²⁴⁸ En cambio, tras el tratamiento con edelfosina la expresión de p-CDK1 no se acumula y fluctúa a lo largo del tiempo (Figura R24). Estos resultados sugieren que la edelfosina no induce una parada de ciclo celular en la fase G2, pero no descartan una parada del ciclo celular en la fase M.

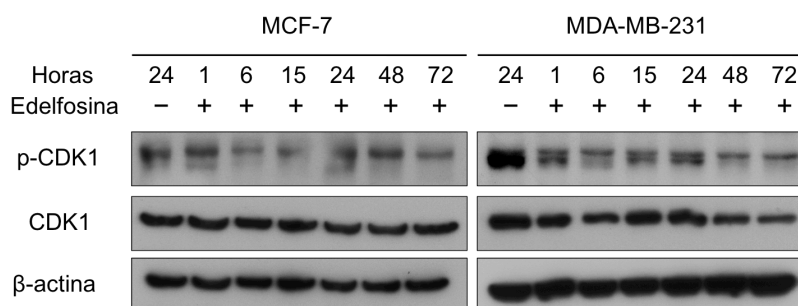


Figura R23: Efecto de la edelfosina sobre la expresión de p-CDK1 y CDK1 a lo largo del tiempo. Células sin tratar y tratadas con edelfosina, se analizaron a distintos intervalos de tiempo. Imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

3.3 El tratamiento con edelfosina no induce la aparición de focos de reparación de daño en el DNA

Una de las posibles causas de una parada de ciclo celular es el daño en el DNA. Para poder estudiar si el tratamiento con edelfosina inducía daños en el DNA utilizamos un marcador de daño génico como es la expresión de la proteína γ H2AX fosforilada. La histona H2AX se fosforila cuando se producen roturas de doble cadena en el DNA y es ampliamente utilizada en la literatura como marcador de daño génico.²⁴⁹

Utilizamos las líneas MCF-7 y MDA-MB-231 para este estudio. Las células fueron tratadas con edelfosina a una concentración de 20 μ M durante 8 h. Como control positivo de daño génico utilizamos doxorrubicina a una concentración de 0,5 μ M durante el mismo periodo de tiempo. El tratamiento con doxorrubicina causó múltiples focos de daño en el DNA en ambas líneas celulares (Figura R25). Sin embargo, el tratamiento con edelfosina no indujo focos de fosforilación de la histona en ninguna de las líneas, si bien la línea MDA-MB-231 parte de un nivel de daño basal elevado, que se mantiene con el tratamiento con edelfosina. Estos resultados sugieren que la edelfosina no induce daño en el DNA.

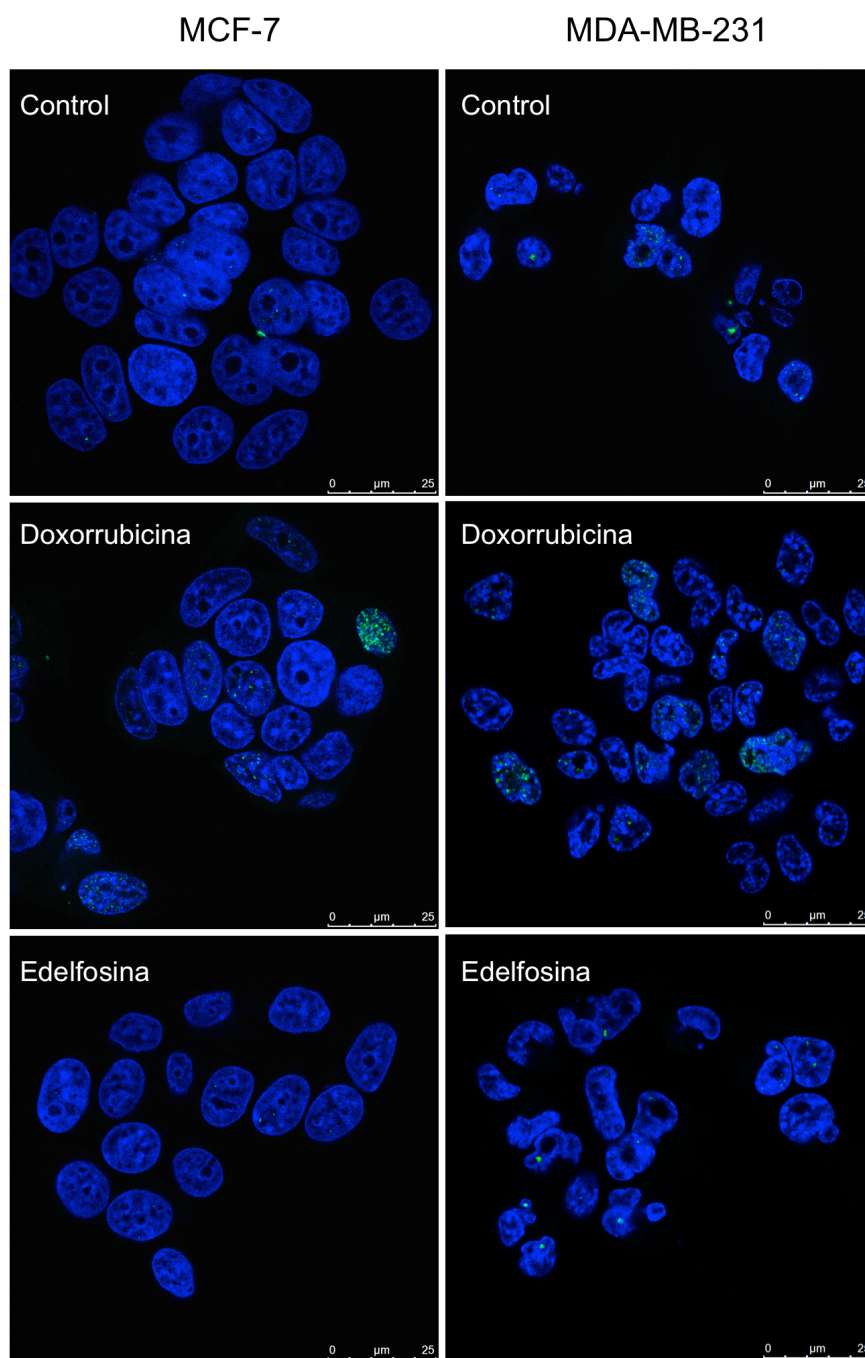


Figura R24: Efecto de la edelfosina y la doxorubicina sobre la fosforilación de la proteína γ H2AX. Células sin tratar y tratadas con edelfosina y doxorubicina durante 8 h se fijaron y procesaron para el análisis por microscopía confocal de la expresión de p- γ H2AX. Imágenes a un aumento de 40x representativas de de tres experimentos independientes. DAPI: azul, p- γ H2AX: verde. Barra de escala: 25 μm

3.4 El tratamiento con edelfosina no impide la división nuclear

Si no existen daños en el DNA, el ciclo celular progresa hacia la fase M en la que se verifica que los cromosomas estén unidos al huso en el punto de control de la fase M. De esta manera se evita una división desigual del material genético entre las células hijas y los núcleos se dividen normalmente²⁵⁰. Para saber si el tratamiento con edelfosina tenía algún efecto sobre la división nuclear observamos los cultivos celulares tras el tratamiento con edelfosina para detectar la aparición de mitosis.

El tratamiento con edelfosina no impidió la aparición de figuras mitóticas en los cultivos celulares, indicando que los núcleos se estaban dividiendo normalmente (Figura R26). Estos resultados sugieren que la edelfosina no induce una parada de ciclo celular en la fase M. En su conjunto, estos resultados y los anteriores sugerirían que el aumento de células en la fase G2/M tras el tratamiento con edelfosina no se debe a una parada del ciclo celular.

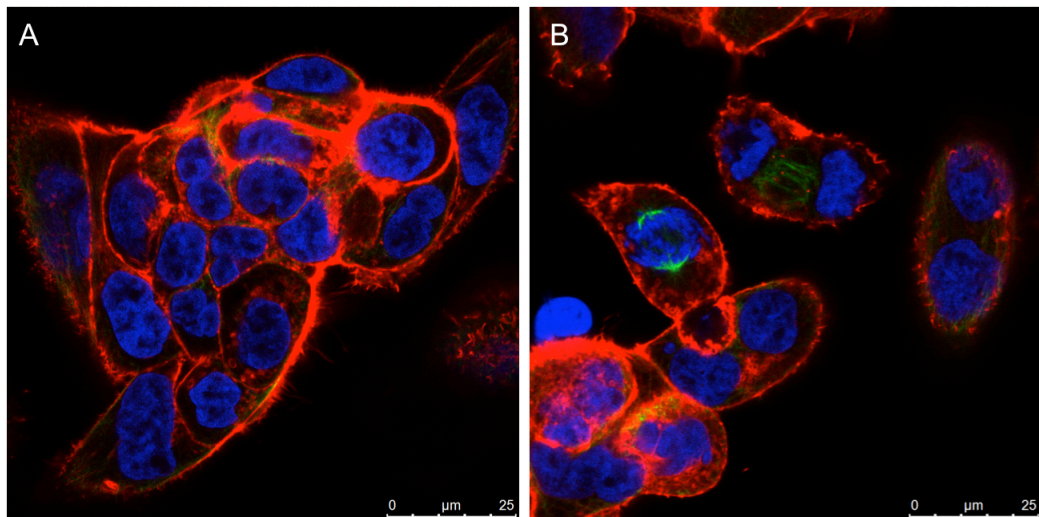


Figura 25: Efecto de la edelfosina sobre la división nuclear. Células de la línea HCC-1569 fueron tratadas con edelfosina a una concentración de 20 μ M durante 12 h. Las células se fijaron y procesaron para el estudio de la expresión de α -tubulina (verde), actina (rojo) y el DNA (DAPI) por microscopía confocal. Imágenes a un aumento de 40x representativas de tres experimentos independientes. Barra de escala: 25 μ m.

4. El tratamiento con edelfosina inhibe mayoritariamente la fosforilación de AKT^{S473}

La vía PI3K-Akt-mTOR es una diana terapéutica fundamental en el tratamiento del cáncer de mama debido a su implicación en las resistencias al tratamiento,¹¹⁰ así como por su papel en la generación de metástasis, promoviendo la invasión, la angiogénesis y la inhibición de la apoptosis.⁹⁸ Quisimos estudiar si el tratamiento con edelfosina podía tener algún efecto sobre esta vía de señalización, dado que sabemos que los lipid rafts son importantes en la señalización de esta vía de supervivencia¹⁸⁰ y la edelfosina se incorpora a los lipid rafts y desplaza, impidiendo que se activen o inactivándolas, a proteínas como AKT en otros tumores.^{193, 191}

4.1 La edelfosina induce la desfosforilación de AKT^{S473} en la línea MCF-7

Para estudiar si la edelfosina podía tener algún efecto sobre la vía PI3K-AKT, utilizamos la línea celular MCF-7 y estudiamos la expresión de la forma fosforilada en Ser 473 de la proteína AKT (Figura R26). AKT es fosforilada en su residuo treonina 308 por PDK1 y en su residuo serina 473 por mTORC2.²⁵¹ Los niveles de fosforilación de AKT en S473 son más predictivos del estado de activación que los de T308 y, por esta razón decidimos usar este para nuestro estudio. Para ello tratamos las células MCF-7 con edelfosina 20 μ M y analizamos la expresión de pAKT^{S473} después de 1, 6, 15, 24, 48 y 72 h de tratamiento. El tratamiento con edelfosina disminuyó la expresión de pAKT^{S473} a lo largo del tiempo, llegando a inhibirla totalmente a las 72 h. Estos resultados sugieren que el tratamiento con edelfosina inhibe la fosforilación de AKT en su residuo Ser 473.

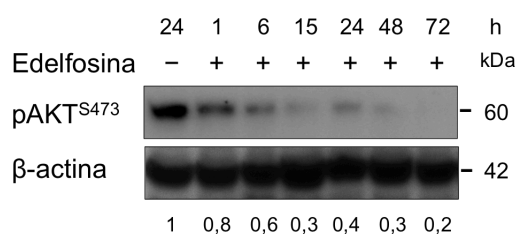


Figura R26: Efecto de la edelfosina sobre la fosforilación de AKT en el residuo Ser 473. Células de la línea luminal MCF-7 fueron tratadas con 20 μ M de edelfosina durante 72 h. Se recogieron células tratadas a 1, 6, 15, 24, 48 y 72 de tratamiento, y las células control a las 72 h. Las células se lisaron y se procesaron para analizar la expresión de la proteína AKT fosforilada en el residuo Ser 473. Como control de carga se analizó la expresión de

la proteína β -actina. Los niveles de proteína se cuantificaron con el programa ImageJ. Imágenes representativas de tres experimentos independientes.

4.2 El tratamiento induce la desfosforilación de AKT en la mayoría de líneas estudiadas en un estudio preliminar.

Quisimos saber si el efecto observado en la línea MCF-7 podía extenderse a otras líneas y para ello, tratamos distintas líneas de cáncer de mama con edelfosina a una concentración de 20 μ M igualmente durante 24 h (Figura R27). Elegimos este periodo de tratamiento para que las líneas más sensibles no tuvieran elevados porcentajes de muerte celular, que impedirían ver una señalización temprana en respuesta al tratamiento. Además de la expresión de pAKT^{S473} analizamos los niveles de expresión de AKT, p-mTOR y mTOR, para tener una visión más completa del efecto del tratamiento en la señalización de la vía PI3K-Akt-mTOR.

El tratamiento con edelfosina disminuyó la expresión de pAKT^{S473} en 12 de las 14 líneas estudiadas. El efecto sobre la fosforilación de mTOR y la expresión de las proteínas totales de AKT y mTOR, fué desigual. Los resultados del tratamiento sobre la expresión de las proteínas estudiadas se resumen en la tabla R4.

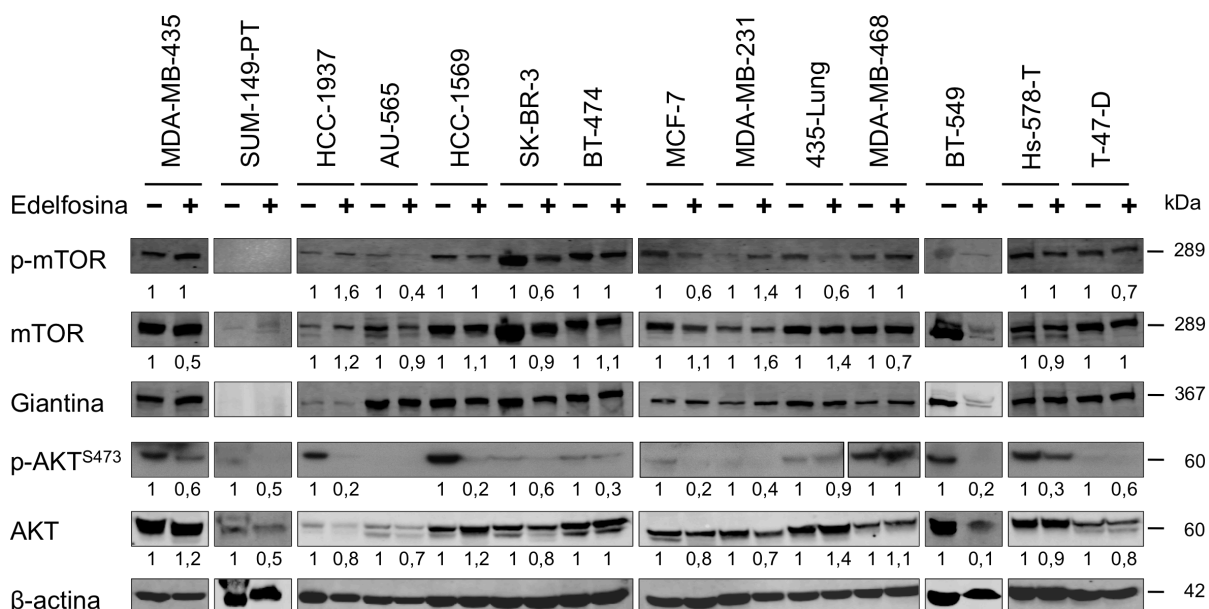


Figura R27: Efecto de la edelfosina sobre la expresión de p-mTOR, mTOR, p-AKT y AKT. Células de las líneas celulares indicadas sin tratar o tratadas con 20 μ M de edelfosina durante 24 h, se lisaron y se procesaron para analizar la expresión de las proteína p-AKT^{S473}, AKT, p-mTOR y mTOR. Como control de carga se analizó la expresión de la proteína β -actina para las proteínas de 60 kDa y, la proteína Giantina par las proteínas de 289

kDa. No se observó expresión de Giantina en la línea SUM-149-PT por lo que no podemos estar seguros de los resultados en esta línea con respecto a p-mTOR y mTOR. En la línea BT-549, observamos que hay una disminución de la expresión de Giantina con el tratamiento por lo que tampoco podemos estar seguros de los resultados de mTOR. Los niveles de proteína se cuantificaron con el programa ImageJ. Imágenes correspondientes a un experimento.

Tabla R4: Efecto de la edelfosina sobre la expresión o fosforilación de AKT y/o mTOR. Se indican la línea celular, el subtipo molecular, sensibilidad a edelfosina y aumento o disminución de la expresión de las proteínas estudiadas. Los aumentos o disminuciones menores de la expresión (valores de 0,1) se han excluido de la tabla.

Líneas celulares	Subtipo molecular	Sensibilidad	p-AKT ^{S473}	AKT	p-mTOR	mTOR
MCF-7	Luminal A	S	↓	↓	↓	
T-47-D	Luminal A	R	↓		↓	
BT-474	Luminal B	S	↓			
AU-565	HER2	S		↓	↓	
SK-BR-3	HER2	S	↓	↓	↓	
HCC-1569	HER2	S	↓	↑		
MDA-MB-231	TN(<i>Claudin -low</i>)	S	↓	↓	↑	↑
MDA-MB-435	TN(<i>Claudin -low</i>)	S	↓	↑		↓
435-Lung	TN(<i>Claudin -low</i>)	MR		↑	↓	↑
BT-549	TN(<i>Claudin -low</i>)	MR	↓	↓		↓
Hs-578-T	TN(<i>Claudin -low</i>)	R	↓			
MDA-MB-468	TN(<i>Basal-like</i>)	MR				↓
HCC-1937	TN(<i>Basal-like</i>)	S	↓	↓	↑	↑
SUM-149-PT	TN(<i>Basal-like</i>)	S	↓	↓		

TN: Triple Negativo, S: sensible, MR: medianamente resistente, R: resistente

Las líneas SUM-149-PT y BT-549 no mostraron una expresión de Giantina que pudiera ser utilizada como control de carga, por lo que no podemos asegurar que los resultados de la expresión de p-mTOR y mTOR para estas líneas sean correctos y decidimos obviarlos.

Los resultados de este estudio parecen indicar una serie de cuestiones respecto a la implicación de las vías de supervivencia en la sensibilidad o resistencia a edelfosina.

En primer lugar, como podemos ver en la figura R27 y la tabla R4, la edelfosina induce una disminución de la expresión de p-AKT^{S473} en líneas resistentes y sensibles al tratamiento. En cuanto a los niveles de AKT total, el tratamiento induce la disminución de la expresión en líneas sensibles como SUM-149-PT y medianamente resistentes como BT-549. Por el

contrario se producen aumentos de la expresión en líneas sensibles como HCC-1569 y en la línea medianamente resistente 435-Lung.

En segundo lugar, la edelfosina induce una disminución de p-mTOR en líneas resistentes como T-47-D y sensibles como SK-BR-3. De igual forma se induce un aumento de p-mTOR en la línea medianamente resistente 435-Lung y en la línea sensible HCC-1937. En los niveles de la proteína total se observó disminución en líneas sensibles como MDA-MB-435 y medianamente resistente como 435-Lung, y aumento en la línea sensible MDA-MB-231 y disminución en la medianamente resistente BT-549.

Estos resultados sugieren, de forma preliminar, que el efecto de la edelfosina sobre la señalización de estas proteínas sería independiente de los procesos de muerte celular, ya que tienen lugar en líneas resistentes y sensibles al tratamiento.

Por otra parte, vemos que el nivel basal de p-AKT^{S473} no parece influir en la sensibilidad o resistencia al tratamiento ya que observamos unos niveles elevados tanto en líneas sensibles (MDA-MB-435, HCC-1937, HCC-1965) como medianamente resistentes (BT-549) y resistentes (Hs-587-T). Estos resultados apuntarían a que una alta fosforilación basal de AKT no sería un factor de resistencia al tratamiento con edelfosina. En este sentido, dado que la fosforilación de AKT en el residuo Serina 473 es un indicador del estado de activación de AKT, estos resultados sugieren de forma preliminar que la sensibilidad a edelfosina es independiente de la activación oncogénica de AKT en las distintas líneas celulares. Si observamos qué líneas tienen bajos niveles de fosforilación de AKT, tampoco encontramos una relación con la sensibilidad a edelfosina, habiendo líneas sensibles como la SUM-149-PT y resistentes como la T-47-D que no expresan una fosforilación basal de AKT. Estas observaciones serían válidas igualmente para los niveles basales de AKT total, p-mTOR y m-TOR, no encontrando en este estudio una relación entre ellos y la sensibilidad o resistencia a edelfosina.

Finalmente, existe una disminución general de la expresión de pAKT^{S473}, tanto en líneas sensibles como resistentes, sugiriendo que la edelfosina ejerce un efecto sobre la activación de AKT que es independiente de la inducción de muerte celular.

Sección II:

**Estudio del fenotipo
metastático**

1. La edelfosina inhibe la adhesión celular

La adhesión celular es un elemento clave en las distintas etapas del proceso metastático. En las etapas iniciales, las células tumorales deben ser capaces de degradar la membrana basal que les rodea y migrar a través del estroma hasta el sistema circulatorio. En todos estos pasos, es imprescindible que las células sean capaces de unirse a la membrana basal que van a invadir, tanto en el estroma como en los vasos, y a los componentes de la matriz extracelular por la que tienen que migrar.¹⁴⁰ Pero no sólo en estas etapas sino también, en los pasos de adhesión a los vasos cuando están en el torrente circulatorio y mientras realizan el camino inverso para establecerse en el nuevo microambiente, extravasando desde la circulación y migrando a través de la nueva matriz extracelular para formar un tumor secundario. En todos estos procesos necesitarán unirse a la membrana basal y a la matriz extracelular para poder traccionar y migrar sobre ellas.²⁵²

En este sentido, el colágeno tipo I se utiliza experimentalmente como sustrato para mimetizar el estroma mamario²⁵³ y la laminina-I para imitar las condiciones de la membrana basal por ser, ambos, componentes principales de estas dos estructuras celulares.²⁵⁴

Para estudiar si la edelfosina podía tener algún efecto sobre la adhesión celular utilizamos dos líneas metastáticas como son la MDA-MB-231 y la 435-Lung. Quisimos analizar si el tratamiento influía en la adhesión de estas células al colágeno y a la laminina, y para ello realizamos ensayos de adhesión celular (Figura R28). Para estos ensayos las células se pretrataron durante 6 h con una concentración de 20 μ M de edelfosina y se dejaron adherir a los dos sustratos durante 40 min.

El tratamiento con edelfosina disminuyó la adhesión celular de forma altamente significativa en ambas líneas celulares y en ambos sustratos (Figura R28). La inhibición de la adhesión al colágeno fué ligeramente mayor en la línea 435-Lung. La inhibición de la adhesión a la laminina fué mayor que para el colágeno en ambas líneas (Figura R28). Estos resultados sugieren que el tratamiento con edelfosina inhibe la adhesión al colágeno y a la laminina en las líneas MDA-MB-231 y 435-Lung, y que este efecto no se debe a una disminución de la viabilidad (Figura R28-E).

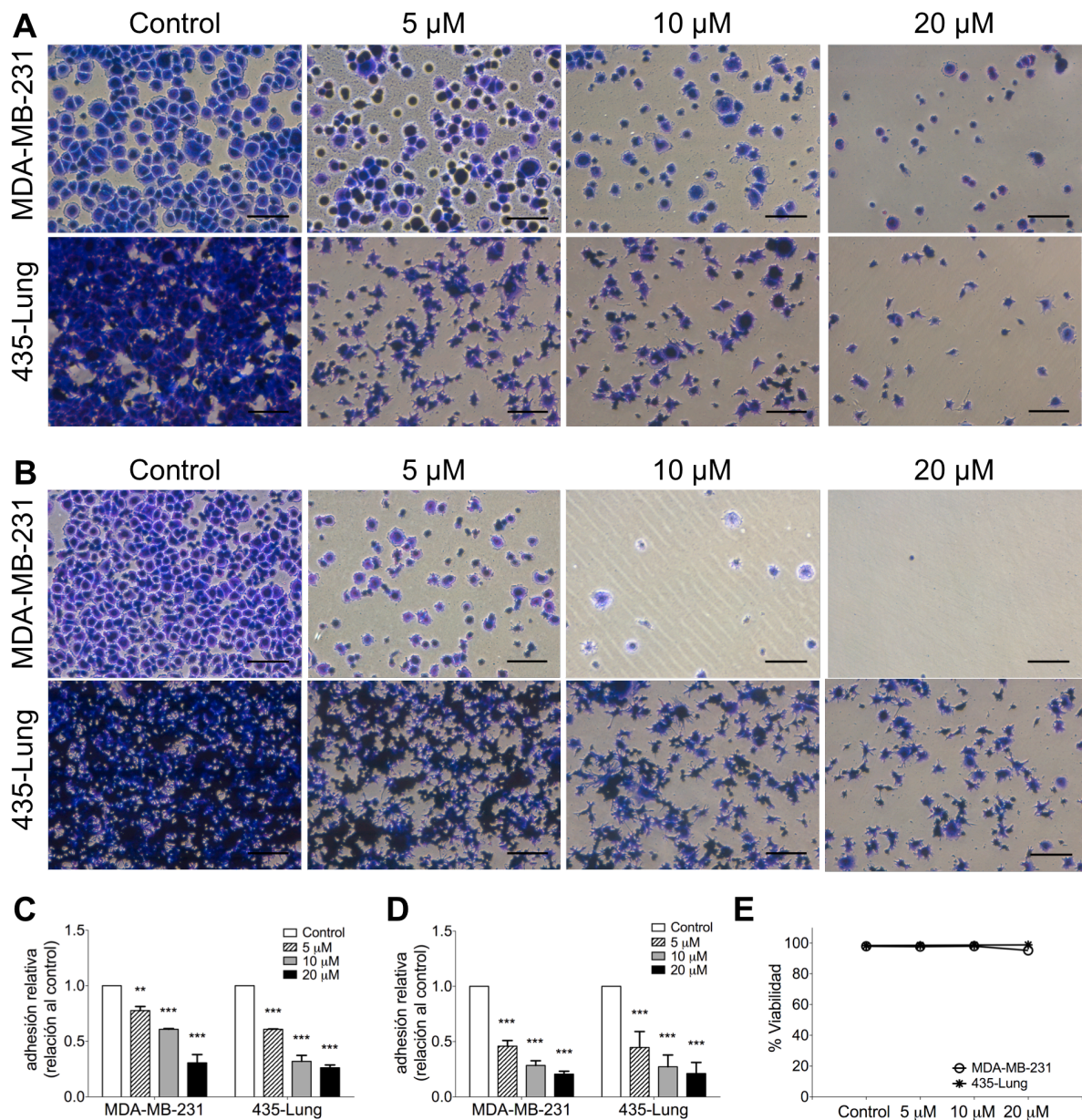


Figura R28: Efecto de la edelfosina sobre la adhesión al colágeno y a la laminina en las células MDA-MB-231 y 435-Lung. Las células se pretrataron con edelfosina a una concentración de 20 μM durante 6 h y se dejaron adherir al colágeno (A) y a la laminina (B) durante 40 min. Después de lavar las células no adheridas, se fijaron y se tiñeron con cristal violeta. Una vez tomadas las imágenes correspondientes se lisaron con SDS y se leyó la absorbancia a 630 nm. Los valores de absorbancia se utilizaron para cuantificar el número de células adheridas al colágeno (C) y a la laminina (D). Después del pretratamiento con edelfosina y antes de añadir las células a los sustratos, se cuantificó la viabilidad por exclusión del colorante Azul Tripán y ésta fué mayor al 90 % (E). Se representan la media y la desviación típica de al menos tres experimentos independientes (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) para cada línea y sustrato.

2. La edelfosina inhibe la migración celular

La migración celular es otra de los procesos clave implicados en la metastasis tumoral. Así las células metastáticas deben migrar a través de la matriz extracelular que les rodea y pueden hacerlo de forma colectiva o individual.¹⁴³ La capacidad de las células metastáticas para migrar les permitirá llegar a los vasos sanguíneos o linfáticos, intravasarse en la circulación, extravasarse posteriormente en los sitios de metástasis secundarios y establecer los nuevos tumores.¹⁴²

Las células tumorales pueden moverse de forma aleatoria o dirigida, en respuesta a factores extracelulares solubles.²⁵⁵ Quisimos estudiar si el tratamiento con edelfosina tenía algún efecto sobre la migración celular. Para ello realizamos ensayos para estudiar la motilidad celular y otros para estudiar la migración a favor de gradiente o quimiotáctica. En estos estudios utilizamos también las líneas metastáticas MDA-MB-231 y 435-Lung.

2.1 El tratamiento con edelfosina disminuye la motilidad celular

Para estudiar la motilidad celular utilizamos un ensayo de cierre de herida o *wound healing* (Figura R29). En este ensayo se cuantificó el área cubierta por las células tras la realización de una herida sobre una monocapa y posterior incubación hasta el cierre de esta. Comparando el área de cierre de las células tratadas y sin tratar podemos estudiar si un compuesto afecta a la motilidad celular.

La edelfosina disminuyó el porcentaje de cierre de la herida en las líneas MDA-MB-231 (Figura 24-A) y 435-Lung (Figura 24-B). La inhibición fue mucho mayor en la línea MDA-MB-231 que mostró una gran capacidad de cierre de la herida, en contraste con la línea 435-Lung (Figura 24-C). En la línea MDA-MB-231, la edelfosina disminuyó la capacidad de cierre un 20 % a una concentración de 5 μ M, que no resultó estadísticamente significativo, y un 50 % a una concentración de 10 μ M. En ambos casos la viabilidad fue mayor del 90 % (Figura 24-D). Con la concentración de 20 μ M se produjo una inhibición del 90 %, pero la viabilidad disminuyó a un 79 %. En la línea 435-Lung, la edelfosina produjo una inhibición del 20 % a una concentración de 5 μ M, del 30 % a 10 μ M y del 50 % a 20 μ M manteniéndose la viabilidad por encima del 90 % (Figura R29-D).

Estos resultados sugieren que la edelfosina inhibe la motilidad celular en las líneas MDA-MB-231 y 435-Lung.

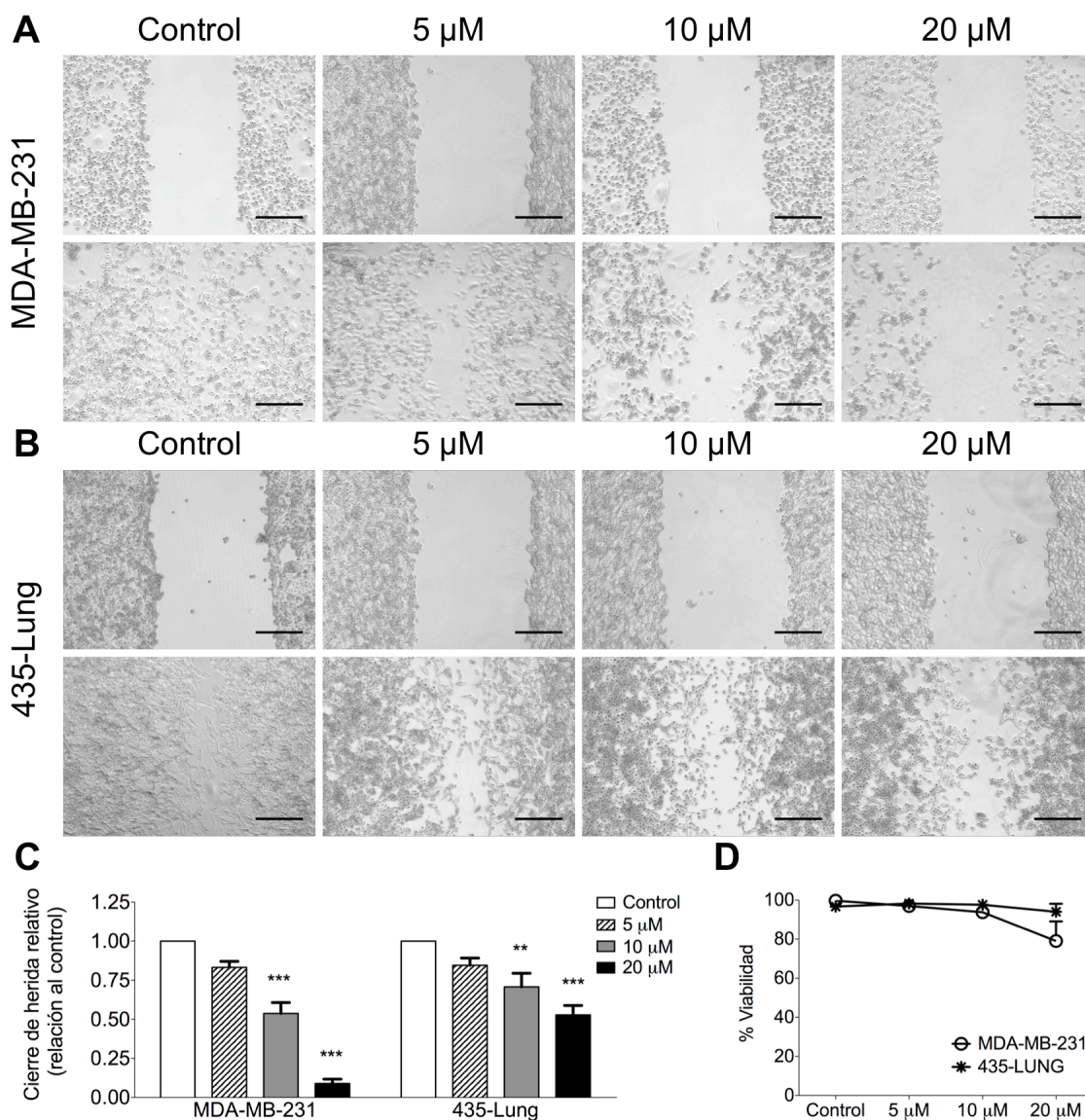


Figura R29: Efecto de la edelfosina sobre el cierre de la herida en las células MDA-MB-231 y 435-Lung.

Las células fueron cultivadas hasta un 90 % de confluencia. Posteriormente se realizaron heridas con una punta de 10 μ l. Se tomaron imágenes de las células en ese momento, después de lavar las células no adheridas a la placa. Posteriormente se añadió medio de cultivo a los controles y medio con edelfosina a distintas concentraciones (5, 10 y 20 μ M) en ambas líneas celulares. Tras un tiempo de 16 h para la línea MDA-MB-231 (A) y de 36 h para la línea 435-Lung (B), se tomaron imágenes de las células control y tratadas y se midió la viabilidad celular por exclusión del colorante azul tripán (D). Los tiempos de incubación fueron determinados por el porcentaje de cierre de la herida en las células control, que fué mucho más rápido en el caso de las células MDA-MB-231 y más lento para las 435-Lung. El área de cierre de la herida se cuantificó con el software ImageJ (C), tomándose los valores de cierre de la herida de los controles como el 1 y normalizando los datos de los tratamientos respecto a ellos. (A), (B): Imágenes representativas de tres experimentos independientes. (C): Inhibición del cierre de la herida en ambas líneas. Se representan los valores medios relativos normalizados respecto al control y la desviación típica de tres experimentos independientes (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). (D): Valores medios y desviación típica de la viabilidad en tres experimentos independientes.

2.2 El tratamiento con edelfosina inhibe la migración quimiotáctica

La quimiotaxis es la capacidad para migrar a favor o en contra de un estímulo extracelular soluble. Es una propiedad fundamental de las células tumorales que pueden responder a componentes de la matriz extracelular, a factores secretados por las mismas células tumorales o a factores secretados por las células del huésped. Esta capacidad migratoria es determinante en el fenotipo invasivo de las células tumorales.²⁵⁵

Quisimos analizar si la edelfosina podía tener algún efecto sobre la migración quimiotáctica y para ello realizamos un ensayo de migración en cámara de Boyden. En este estudio utilizamos insertos con un tamaño de poro de 8 μm y como estímulo un gradiente de SBF e insulina.

El tratamiento con edelfosina inhibió la migración en las líneas MDA-MB-231 y 435-Lung (Figura R30). La línea MDA-MB-231 se dejó migrar a favor de gradiente durante 16 h. Se comparó el número de células sin tratar que migraron en ese tiempo con el número de células que lo hicieron tratadas con una concentración de 5, 10 y 20 μM de edelfosina. El estudio de la viabilidad se obvió puesto que el tiempo y las concentraciones de edelfosina eran las mismas que en el ensayo de cierre de herida. De esta forma, se tomaron como válidos los porcentajes de viabilidad del ensayo anterior. Teniendo en cuenta estos, la edelfosina inhibió la migración a las concentraciones de 5 y 10 μM sin afectar a la viabilidad. A estas concentraciones la migración disminuyó un 35 y un 68 % respectivamente. A la concentración de 20 μM se produjo una inhibición del 97 %, pero la viabilidad bajó al 79 % (Figura R30). La línea 435-Lung se dejó migrar durante 36 h y la edelfosina inhibió la migración un 14 % a la concentración de 5 μM (porcentaje no significativo estadísticamente), un 48 % a la concentración de 10 μM y un 80 % a la concentración de 20 μM . Los porcentajes de viabilidad a las 36 h de tratamiento fueron superiores al 90 % en las tres concentraciones, tal y como se indicó en el ensayo anterior (Figura R30).

Estos resultados sugieren que la edelfosina inhibe la migración quimiotáctica en las líneas MDA-MB-231 y 435-Lung.

3. La edelfosina inhibe la invasión

Las células tumorales invasivas son capaces de degradar la membrana basal que rodea los epitelios y la matriz extracelular subyacente, consiguiendo escapar del tumor primario y metastatizar. También invaden los tejidos secundarios a donde llegan a través de la circulación linfática o hematogena. De esta manera la capacidad invasiva es fundamental en el proceso de metastásis tumoral.

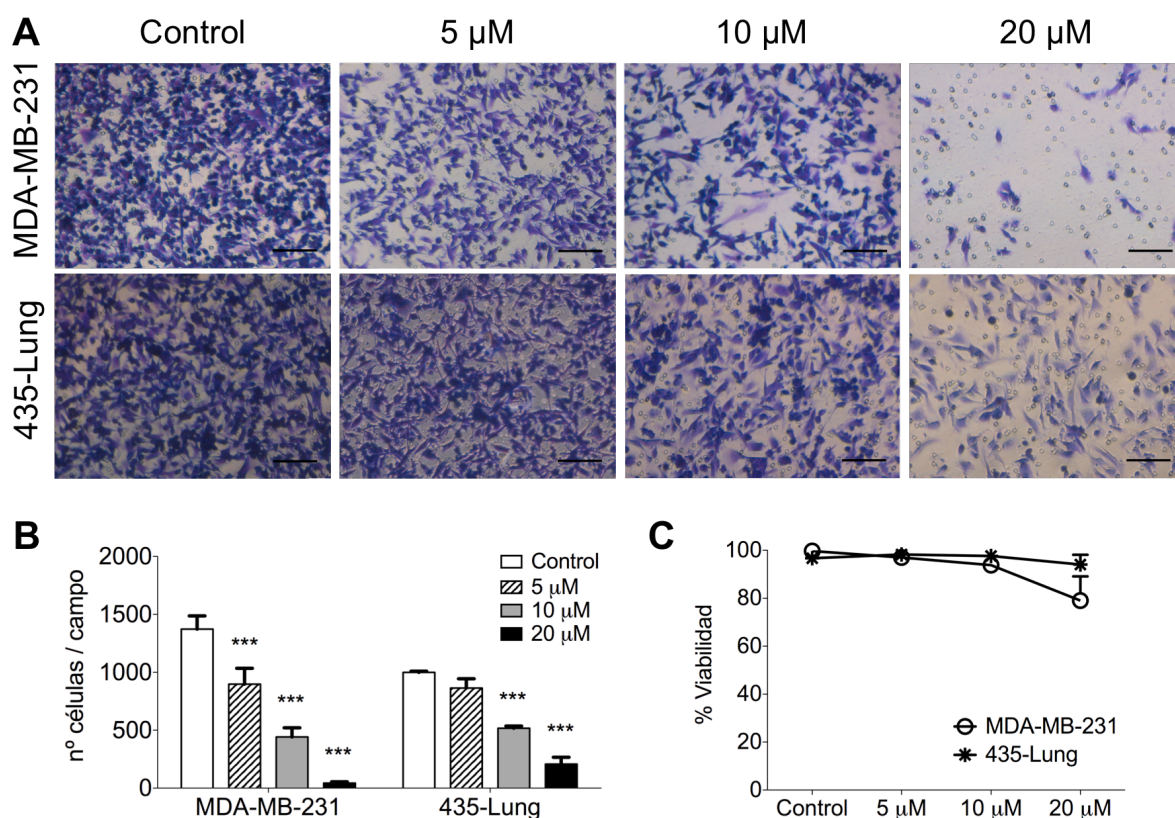


Figura R30: Efecto de la edelfosina sobre la migración quimiotáctica en células MDA-MB-231 y 435-Lung.

Células sin tratar y tratadas con 5, 10 y 20 μM de edelfosina se dejaron migrar a favor de un gradiente de SBF e insulina durante 16 h (MDA-MB-231) y 36 h (435-Lung), en un ensayo en cámara de Boyden. Los insertos utilizados fueron de 8 μm de tamaño de poro, en placas de 24 pocillos con medio normal o con edelfosina en la cámara superior. Las células se añadieron a la cámara superior y se contaron el número de células que migraron a la cámara inferior, que contenía medio de cultivo con una concentración 3 veces superior de SBF e insulina como atrayentes. Para ello se eliminaron las células de la cámara superior que no habían migrado y las células que migraron a través del inserto se fijaron y tiñeron. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independientes (A) a un aumento de 20X. Barra de escala: 100 μm . Se representan la media y desviación típica del número de células por campo observadas para cada tratamiento (B) en tres experimentos independientes (***) $p < 0.001$). Los porcentajes de viabilidad (C) son los mismos que los mostrados en la figura R29.

Quisimos estudiar si el tratamiento con edelfosina podía inducir algún efecto sobre la capacidad invasiva de las células y para ello utilizamos la línea metastática MDA-MB-231. Con esta línea realizamos ensayos de invasión en matrigel (Figura R31). Se estudió la invasión de células MDA-MB-231 sin tratar y tratadas con edelfosina durante 16 h a las concentraciones de 5, 10 y 20 μM . Se obvió la medida de la viabilidad, utilizándose la realizada en los ensayos de cierre de herida para esta línea.

La edelfosina inhibió la invasión de las células MDA-MB-231, de forma altamente significativa, en todas las concentraciones (Figura R31). Si bien, a la concentración de 20 μM sabemos que la viabilidad desciende a un 79 %, se produjo una inhibición del 93 % con esta concentración. A las concentraciones de 5 y 10 μM se inhibió la invasión un 46 y un 66 % respectivamente, estando la viabilidad por encima del 90 % como se indicó anteriormente.

Estos resultados sugieren que la edelfosina inhibe la invasión celular de un sustrato similar a la membrana basal, en la línea MDA-MB-231.

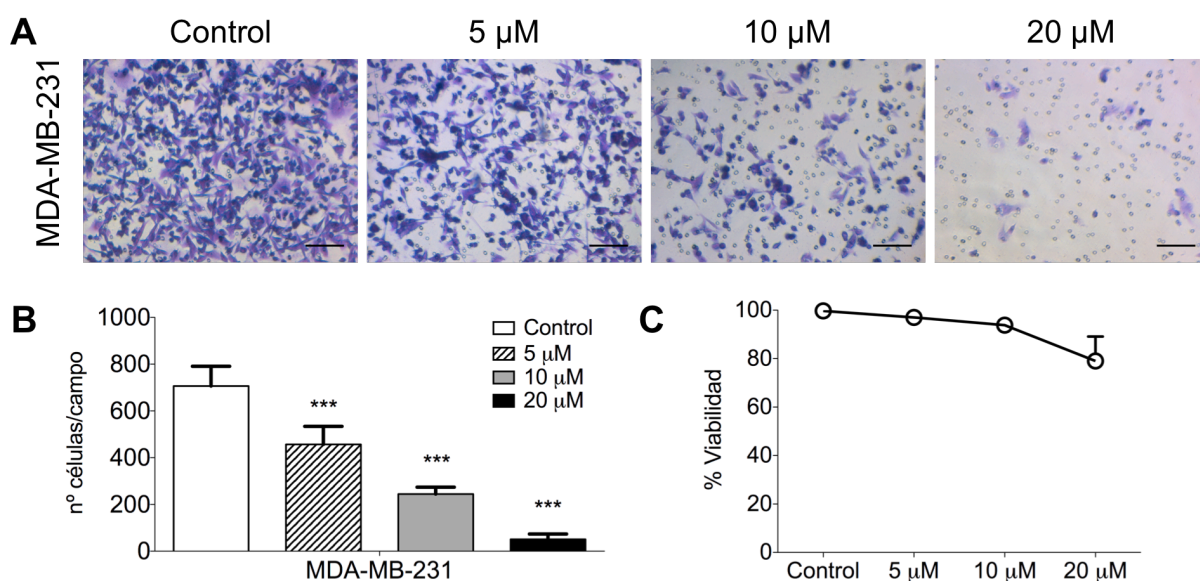


Figura R31: Efecto de la edelfosina sobre la invasión celular en la línea MDA-MB-231. (A) Células sin tratar y tratadas con edelfosina a una concentración de 5, 10 y 20 μM , se cultivaron sobre matrigel en una cámara de Boyden. Después de añadir una fina capa de matrigel y dejarla solidificar, se añadió el medio de cultivo conteniendo las células sin tratar o tratadas con edelfosina. Se dejaron invadir durante 16 h y después se fijaron y tiñeron con cristal violeta. Las células que no habían invadido se eliminaron junto con el matrigel antes de fijar las células adheridas al inserto. (B) Se contó el número de células por campo y se representa la media y desviación típica de campos representativos en cada concentración para tres experimentos independientes (C)

Viabilidad de la línea MDA-MB-231 después de tratarse a las concentraciones indicadas durante 16 h. (***)
p<0.001)

4. La edelfosina inhibe la angiogénesis

El crecimiento tumoral y el desarrollo de metastásis dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos que proporcionen los nutrientes necesarios y el medio para la diseminación a otras regiones del organismo.²⁵⁶ La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos a partir de otros ya existentes, debido a la proliferación y migración de las células endoteliales. Las células tumorales inducirían la proliferación de células endoteliales en los vasos próximos y la migración de éstas hacia el tumor.²⁵⁷ En este sentido, se ha visto que el número de capilares sanguíneos en el tumor correlaciona con el riesgo de metástasis en cáncer de mama y está asociado a mal pronóstico.²⁵⁸

Quisimos saber si la edelfosina podía influir en los procesos angiogénicos. Para ello se estudió el efecto de la edelfosina sobre la angiogénesis de células endoteliales humanas. En colaboración con el grupo del Dr. Marco Antonio Calzado en la Universidad de Córdoba, se realizaron estudios sobre angiogénesis en las líneas HUVEC (human vein endotelial cells) y HBMEC (human brain microvasculature endotelial cells). En estos ensayos se analizaron la formación de tubos por las células endoteliales y se midió la longitud total de los tubos y el número de redes, como se explica en los materiales y métodos.

Las células de ambas líneas se trataron con edelfosina durante 12 h a unas concentraciones de 5, 15, 30 y 50 μ M (Figura R32, R33). La viabilidad se midió en paralelo con el ensayo de metabolización del MTT, permaneciendo en todos casos alrededor del 100 % (Figura R31-C y R32-C). El tratamiento con edelfosina disminuyó la longitud total de los tubos y el número de redes en ambas líneas a partir de una concentración de edelfosina de 15 μ M (Figura 32-B y R33-B). Estos resultados sugieren que el tratamiento con edelfosina inhibe la angiogénesis en ambas líneas celulares.

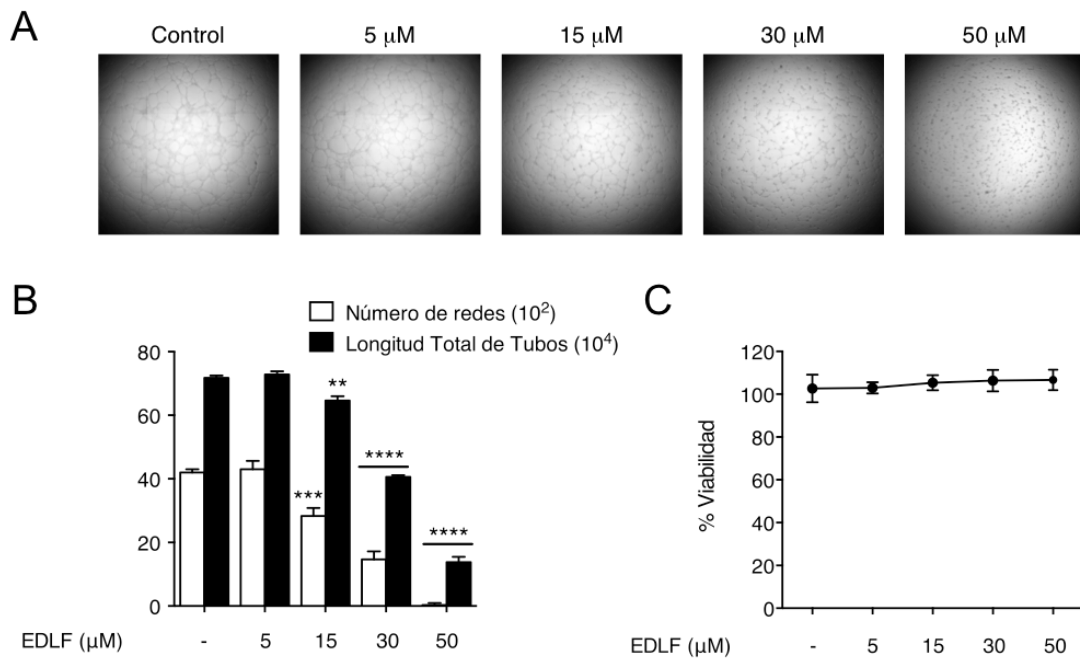


Figura R32: Efecto de la edelfosina sobre la angiogénesis en la línea endotelial HBMEC. (A) Imágenes representativas de células sin tratar y tratadas con 5, 15, 30 y 50 μM de edelfosina durante 12 h. (B) Cuantificación del número de redes y la longitud total de los tubos formados. Se representan la media y desviación típica de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). (C) Cuantificación de la viabilidad celular por medio del ensayo de metabolización del MTT.

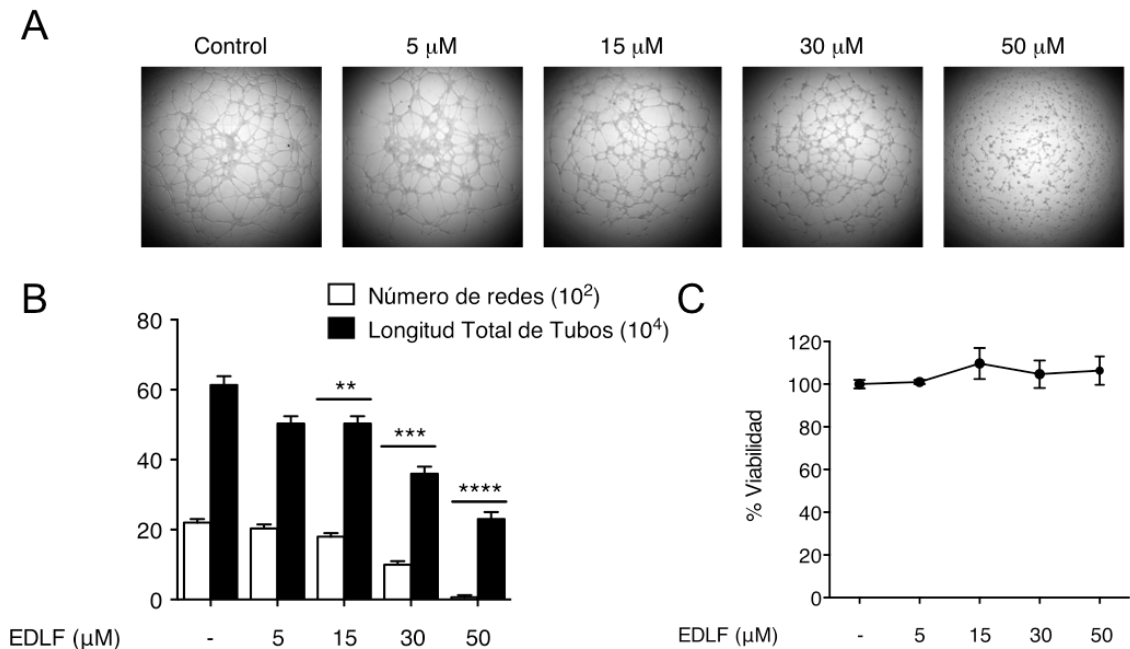


Figura R33: Efecto de la edelfosina sobre la angiogénesis en la línea endotelial HUVEC. (A) Imágenes representativas de células sin tratar y tratadas con 5, 15, 30 y 50 μM de edelfosina durante 12 h. (B) Cuantificación del número de redes y la longitud total de los tubos formados. Se representan la media y desviación típica de tres experimentos independientes (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). (C) Cuantificación de la viabilidad celular por medio del ensayo de metabolización del MTT.

Sección III:

**Estudio de la colonización
metastática**

La proliferación de células metastáticas en lugares alejados del tumor primario da lugar a tumores secundarios y se conoce como colonización metastática.²⁵⁶ Para que se formen estas metástasis, las células que han viajado a través del sistema circulatorio o linfático deben ser capaces de extravasar y crecer en el nuevo microambiente tumoral. Esta capacidad es la que diferencia a las células que metastatizan y originan un tumor secundario, de aquellas que habiendo metastatizado permanecen quiescentes o mueren.¹³⁹

La colonización secundaria sería una etapa clave y determinaría el éxito del proceso metastático. En este sentido, interferir en los procesos implicados en la colonización metastática podría tener implicaciones terapéuticas. Por lo tanto, quisimos estudiar si la edelfosina podría tener algún efecto en estos procesos y para ello realizamos un estudio *in vivo*.

1. Sensibilidad del panel de líneas metastáticas derivadas de la línea mda-mb-435

En colaboración con el grupo de la Dra. Angels Sierra (IRO, Barcelona) realizamos un estudio sobre la sensibilidad de diferentes líneas metastáticas procedentes de la línea MDA-MB-435. Este grupo derivó diferentes líneas metastáticas a partir de la línea parental con diferentes tropismos en un modelo de ratón.²⁵⁹ Así cada una de ellas se aisló de un órgano diferente, se cultivó *in vitro* y se volvió a introducir en el animal en repetidas ocasiones hasta lograr patrones de metástasis con tropismos determinados hacia pulmones (435-Lung), cerebro (435-Brain), hígado (435-Liver) y huesos (435-Bone).

Quisimos saber que grado de sensibilidad tenían las distintas líneas al tratamiento con edelfosina y para ello realizamos un ensayo de viabilidad con cristal violeta. La edelfosina disminuyó la viabilidad en todas las líneas, encontrándose una mayor sensibilidad en la línea con tropismo a cerebro y menor en la línea con tropismo a pulmón (Figura R34).

Decidimos usar la línea 435-Lung para el estudio *in vivo* por su capacidad para inducir metástasis en poco tiempo cuando son introducidas en la circulación. Este tipo de ensayo de metástasis experimental obvia todos los pasos iniciales de la cascada metastática pero es muy útil en el estudio de la colonización.

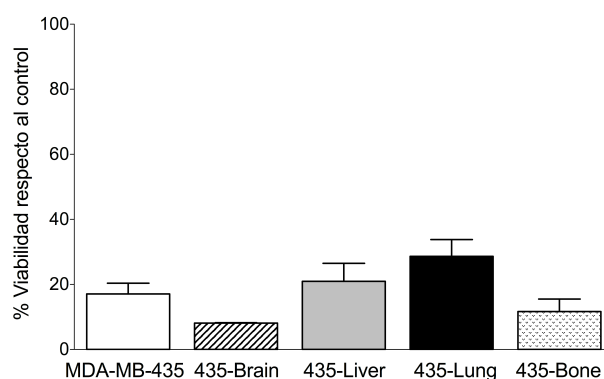


Figura R34: Efecto de la edelfosina sobre viabilidad de la línea MDA-MB-435 y sus líneas derivadas. Células sin tratar y tratadas con edelfosina a una concentración de 20 μ M durante 72h fueron lavadas y fijadas antes de teñirse con cristal violeta. Después se lisaron y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro. Se representan los valores normalizados respecto al control en cada línea y corresponden a la media y desviación típica de tres experimentos independientes.

2. Diseño experimental

Las células 435-Lung expresan de forma estable una construcción GFP-LUC (proteína fluorescente verde - luciferasa) que permite ser seguida por bioluminiscencia en los animales después de administrarles luciferasa. Gracias a esto podemos analizar el crecimiento de las metástasis de forma no invasiva y determinar el grado de afectación a lo largo del tiempo.

Las células se inyectaron en la vena de la cola en el día 0 del estudio y se empezó a tratar a los animales a partir del día 5 (Figura 30). La dosis de edelfosina fué de 30 mg/kg de lunes a sábado y se administró de forma oral disuelta en agua. Los animales del grupo control fueron administrados con el mismo volumen de agua. En la figura 30 se indican los días de seguimiento de las células tumorales por bioluminiscencia. Tras dormir a los animales con isoflurano y administrarles la dosis de luciferina adecuada a su peso, se tomaron imágenes de los distintos grupos para su cuantificación.

Los animales que presentaban gran afectación o síntomas de dolor fueron sacrificados por motivos éticos y los días de sacrificio se muestran en la figura R35-A con flechas discontinuas (animales 5, 1, 2, 4 y 6). En el día 89 del estudio se sacrificaron el animal número 3 del grupo control y los 6 animales del grupo tratado.

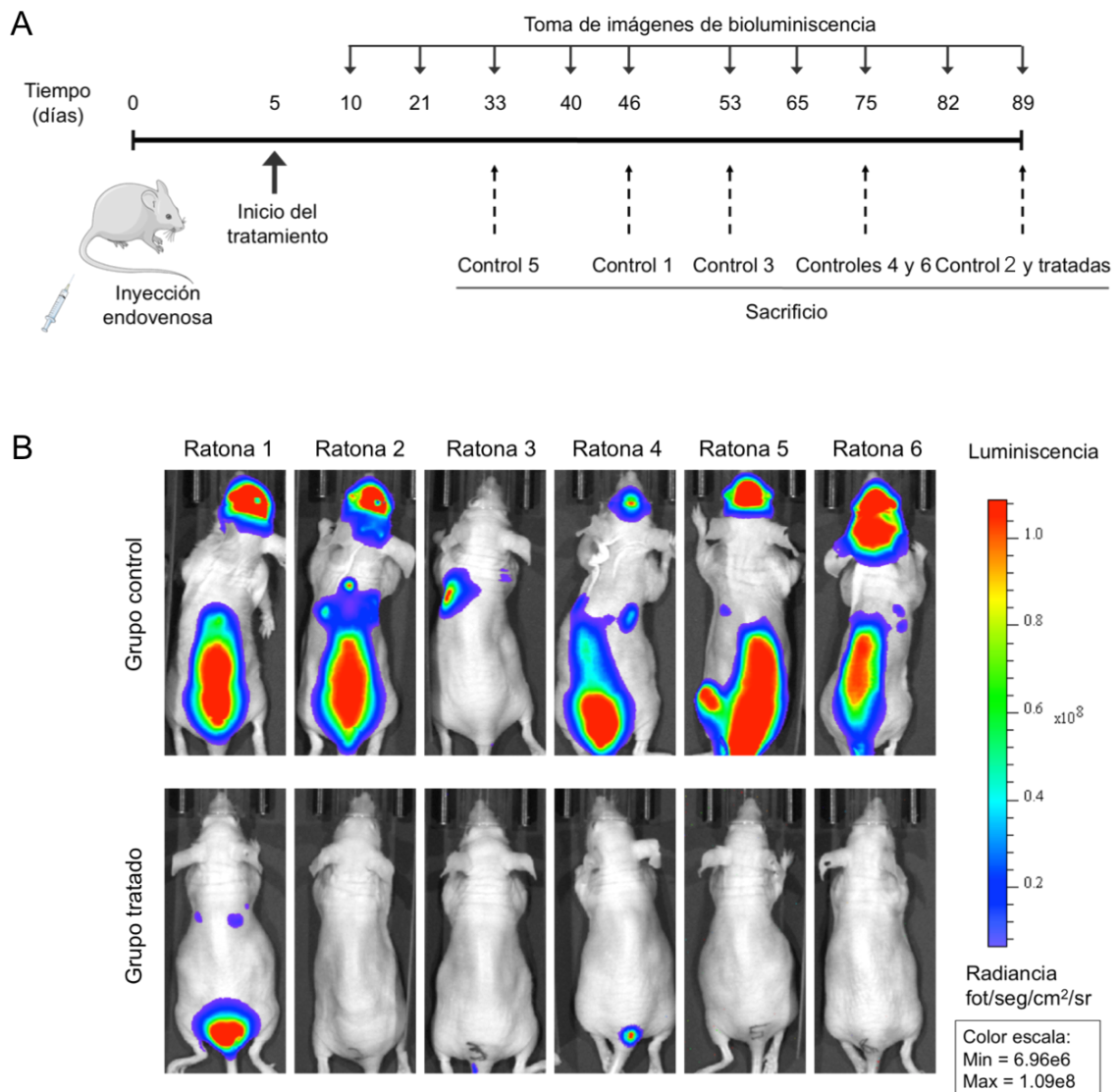


Figura R35: Diseño experimental e imágenes de BLI a fin de experimento para cada ratona. (A) Línea de tiempo con los principales eventos del estudio. (B) Imágenes de BLI correspondientes al día del sacrificio de cada ratona en el grupo control y el grupo tratado con edelfosina.

3. La edelfosina inhibe la colonización metastática

Las células 435-Lung originaron extensas metástasis en 5 de los 6 animales del grupo control, mientras que 5 de los 6 animales del grupo tratado con edelfosina permanecieron sin metástasis aparentes hasta el fin del estudio. Uno de los animales del grupo control desarrolló metástasis pulmonares de menor grado y uno de los animales del grupo tratado

desarrolló igualmente metástasis pequeñas en los pulmones y crecimiento tumoral en la zona de inyección.

Estos resultados sugieren que la edelfosina inhibió la aparición de metástasis en 5 de los 6 animales tratados. Al mismo tiempo, señalan que la línea 435-Lung fué capaz de desarrollar metástasis en los 6 animales inyectados, con una pequeña variación en el animal número 3.

3.1 El tratamiento con edelfosina inhibió la colonización metastática en cerebro y pulmones

Para cuantificar la BLI de las metástasis pulmonares y cerebrales por separado se hicieron, con el software de análisis, regiones (ROIs) cuadradas englobando el tórax y el cráneo respectivamente como se indica en la figura R36. De esta forma se tomó como BLI procedente del cerebro, la emisión de fotones recogida en la región craneal y como BLI procedente de los pulmones, la recogida en la región torácica. Así los valores representados en la figura R37 corresponden a los valores de estas regiones.

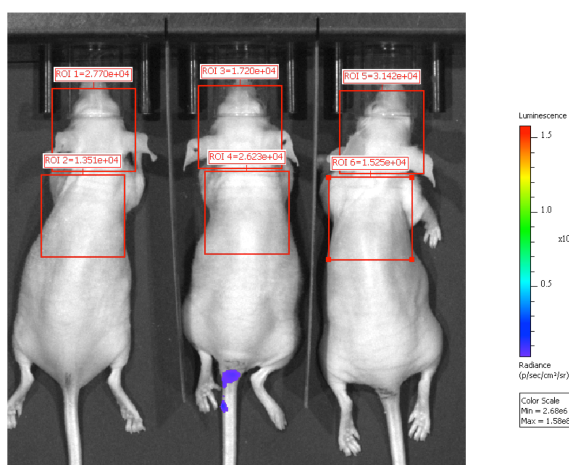


Figura R36: Ejemplo de regiones para la cuantificación de metástasis cerebrales y pulmonares.

El tratamiento con edelfosina redujo de forma altamente significativa las metástasis cerebrales y pulmonares, con diferencias de tres órdenes de magnitud entre los controles y los tratados en el día 46 del estudio (Figura R37). A partir de ese día el número de controles estaba por debajo de 4 y las medias no eran comparables, por lo que solo se representaron los valores del día 0 al día 46. Estos resultados sugieren que el tratamiento con edelfosina inhibió el crecimiento de las células tumorales en el cerebro y en los pulmones, inhibiendo así la colonización metastática en ambos órganos por las células 435-Lung.

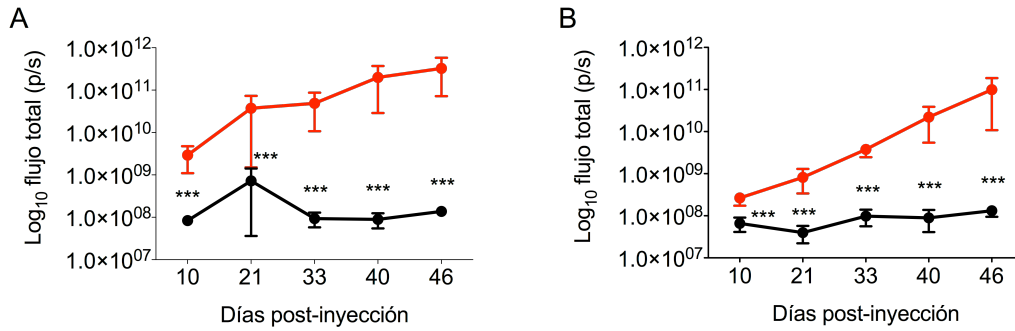


Figura R37: Efecto de la edelfosina sobre las metástasis cerebrales y pulmonares. Ratonas sin tratar y tratadas con edelfosina fueron monitorizadas por bioluminiscencia, después de la inyección de células tumorales de la línea 435-Lung que expresaban el gen de la luciferasa. Las mediciones se hicieron en un scanner tras anestesiarse a los animales con isoflurano e inyectarles el sustrato de la enzima luciferasa (luciferina) por vía intraperitoneal. Se representa la media y la desviación estándar del \log_{10} flujo total de bioluminiscencia para el grupo control y el grupo tratado hasta el día 46 del estudio. Prueba U de Mann-Whitney, *** $p < 0.0001$.

3.2 El tratamiento con edelfosina disminuyó la carga tumoral total y aumentó drásticamente la supervivencia

Para medir la carga tumoral total se hicieron regiones englobando el cuerpo entero de las ratonas y se analizaron los dos grupos para el mismo periodo anterior. La edelfosina disminuyó drásticamente la carga tumoral total en los animales del grupo tratado, con una supervivencia del 100 % (Figura R38).

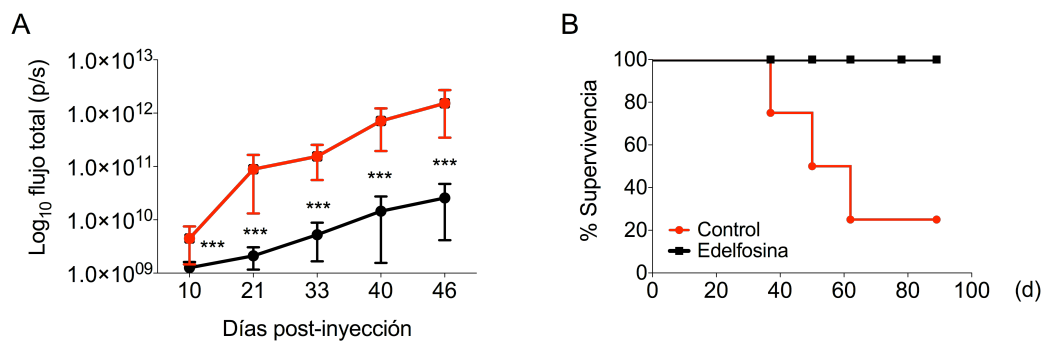


Figura R38: Efecto de la edelfosina sobre la carga tumoral total y curvas de supervivencia Kaplan-Meier. (A) Se representa la media y la desviación estándar del \log_{10} flujo total de bioluminiscencia para la carga tumoral total del grupo control y el grupo tratado hasta el día 46 del estudio. Prueba U de Mann-Whitney, *** $p < 0.0001$. (B) Curvas de supervivencia Kaplan-Meier.

Las ratonas se pesaron antes de empezar el estudio y en cada toma de imágenes de BLI (Figura R39). Los pesos de los animales no sufrieron variaciones en ninguno de los grupos. El grupo tratado partía de una media de peso ligeramente más alta que el grupo control. En

ambos se produjo un aumento de peso aunque fué mayor en el grupo tratado. Además del peso se estudió el comportamiento de los animales durante el estudio sin presentarse ninguna anomalía, excepto en el grupo control en el que se sacrificaron cuando se detectaron síntomas de dificultad respiratoria o sufrimiento. Estos resultados sugieren que el tratamiento con edelfosina no causó pérdida de peso en los animales.

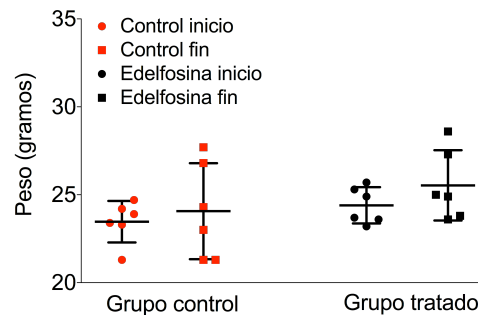


Figura R39: Control de pesos de las ratonas en el grupo control y tratado al inicio y fin del estudio.

4. Estudio histológico

Quisimos validar los resultados de BLI y para ello realizamos un estudio histológico de los órganos afectados en el grupo control y el grupo tratado. Se realizó una tinción de hematoxilina-eosina (HE) en cortes seriados de pulmones y cerebro para verificar la existencia de metástasis. Se analizaron el índice de proliferación con la expresión de Ki67 y el grado de angiogénesis con la expresión de CD31. Como marcador de células tumorales se utilizó la expresión de vimentina humana.

4.1 Metástasis pulmonares

Se detectaron metástasis pulmonares en todos los animales control, presentando un grado de afectación equivalente a los datos de BLI que habíamos obtenido. En la figura 33 podemos ver una panorámica representativa de las metástasis en pulmones y ganglios linfáticos observadas en el grupo control. Estas metástasis fueron de menor tamaño en la ratona número 3 del grupo, tal y como indica la señal de BLI.

En el grupo tratado no se encontraron metástasis en 5 de los 6 animales tal y como indicaban los datos de BLI. Se muestran imágenes representativas de los animales 1 a 5 en la figura 34 A y B, en las que se observa una estructura histológica conservada en la tinción HE (Figura 34), sin expresión de vimentina (Figura 34B). Se encontraron micrometástasis en

el animal número 6 tras la realización de cortes seriados a distintas profundidades (Figura 34 C a F), con expresión de vimentina (Figura 34D) y Ki67 (Figura 34E-F).

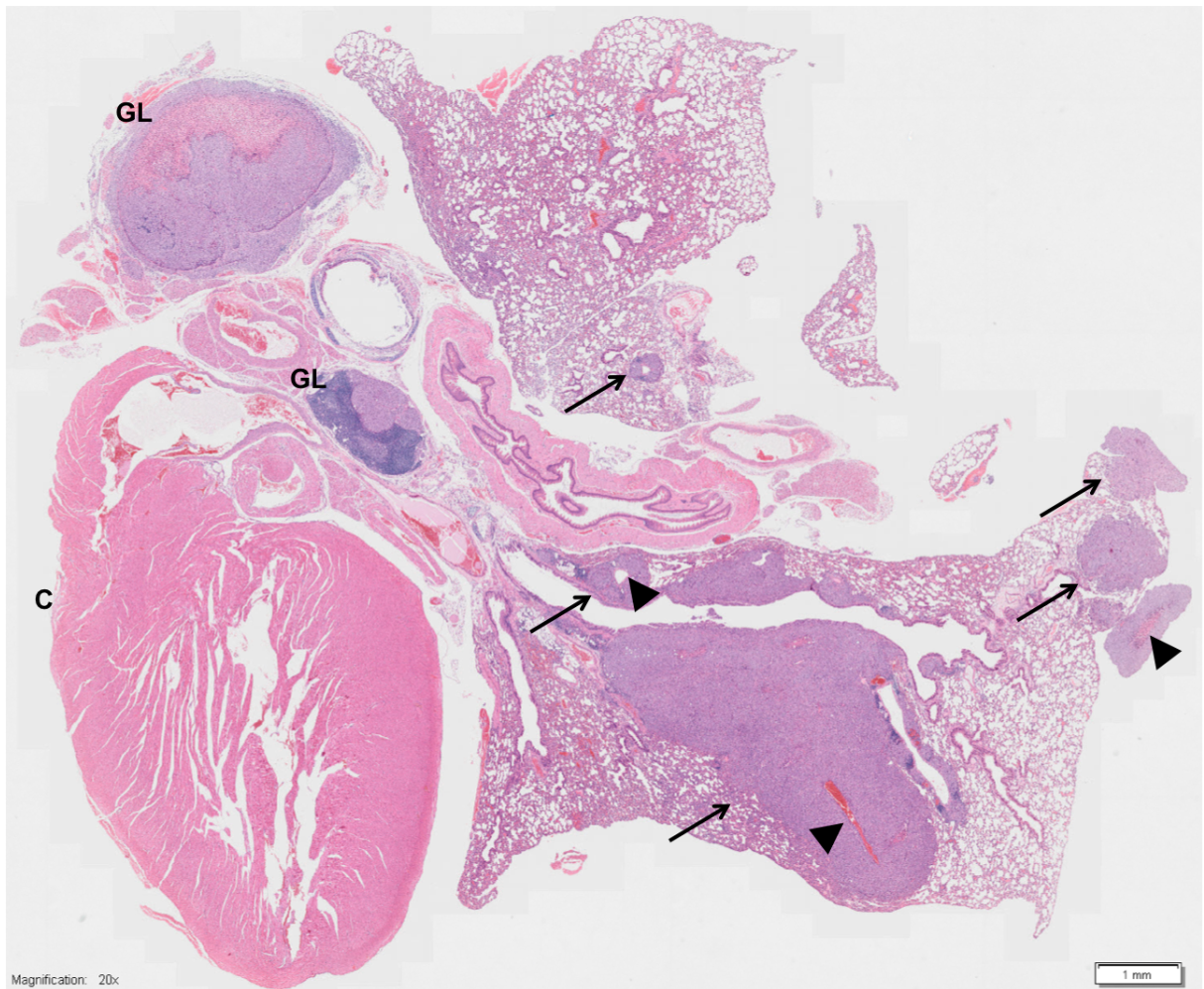


Figura R40: Panorámica de la afectación pulmonar en animal del grupo control. Tejido pulmonar infiltrado por nódulos células tumorales atípicas (flechas), de diferentes tamaños, centrados por un vaso (cabeza de flecha). Dos ganglios linfáticos (GL) con infiltración parcial y total de su estructura por las mismas células tumorales atípicas descritas en el pulmón. Corazón con estructura histológica conservada (C). HE 0,59X. Barra de escala: 1 mm.

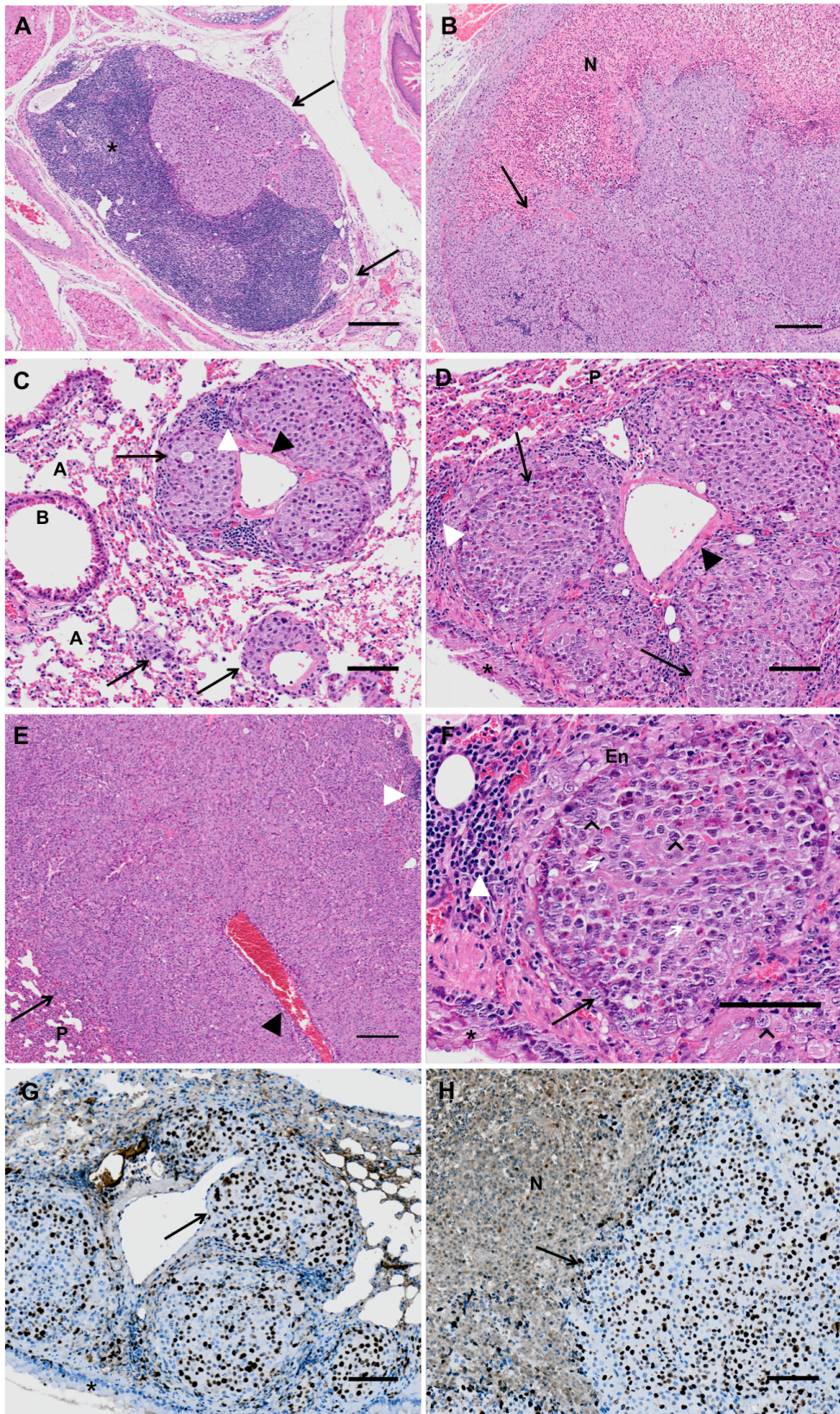


Figura R41: Detalles de las metástasis pulmonares de la figura 33. (A) Mayor aumento. Ganglio linfático parcialmente sustituido por células tumorales atípicas (flechas). Tejido linfático conservado (asterisco). HE 4x. Barra de escala: 100 μ m **(B)** Mayor aumento. Ganglio linfático sustituido en su totalidad por las células tumorales atípicas descritas. Necrosis parcial (N). HE 4x. Barra de escala: 100 μ m. **(C)** Mayor aumento. Nódulos tumorales

perivasculares (flechas) con reacción inflamatoria crónica linfocitaria (cabeza de flecha blanca) y células tumorales aisladas (flechas). Tejido pulmonar conservado con bronquiolo terminal (B) y sacos alveolares (A). HE 10x. Barra de escala: 100 μ m (D) Mayor aumento. Nódulos tumorales pulmonares con vaso sanguíneo central. Périfericamente tejido pulmonar (P) con discreta hemorragia y acúmulo de infiltrado inflamatorio crónico linfocitario (cabeza de flecha blanca). Epitelio bronquial conservado (asterisco). HE 10x. Barra de escala: 100 μ m. (E) Mayor aumento. Masa tumoral (flecha) rodeada con vaso sanguíneo central (cabeza de flecha) por reacción inflamatoria crónica linfocitaria (cabeza de flecha blanca) y tejido pulmonar (P). HE 2x. Barra de escala: 500 μ m. (F) Mayor aumento. Nódulo tumoral (flecha) infiltrando pared bronquial. Célula tumoral con núcleo grande (^), cromatina finamente granular, nucleolo evidente y muy escaso citoplasma. Mitosis (flecha blanca). HE 20x. Barra de escala: 50 μ m. (G) Tejido pulmonar correspondiente al tejido observado en la figura D anterior. Nódulos tumorales pulmonares (flecha) con vaso sanguíneo central. Expresión nuclear de Ki67 e índice de proliferación elevado. IHQ 10x. Barra de escala: 100 μ m. (H) Ganglio linfático sustituido en su totalidad por células tumorales atípicas (flecha) correspondiente a la figura B anterior. Necrosis parcial (N). Expresión nuclear de Ki67 marcada en células tumorales (flecha). IHQ 10x. Barra de escala: 100 μ m.

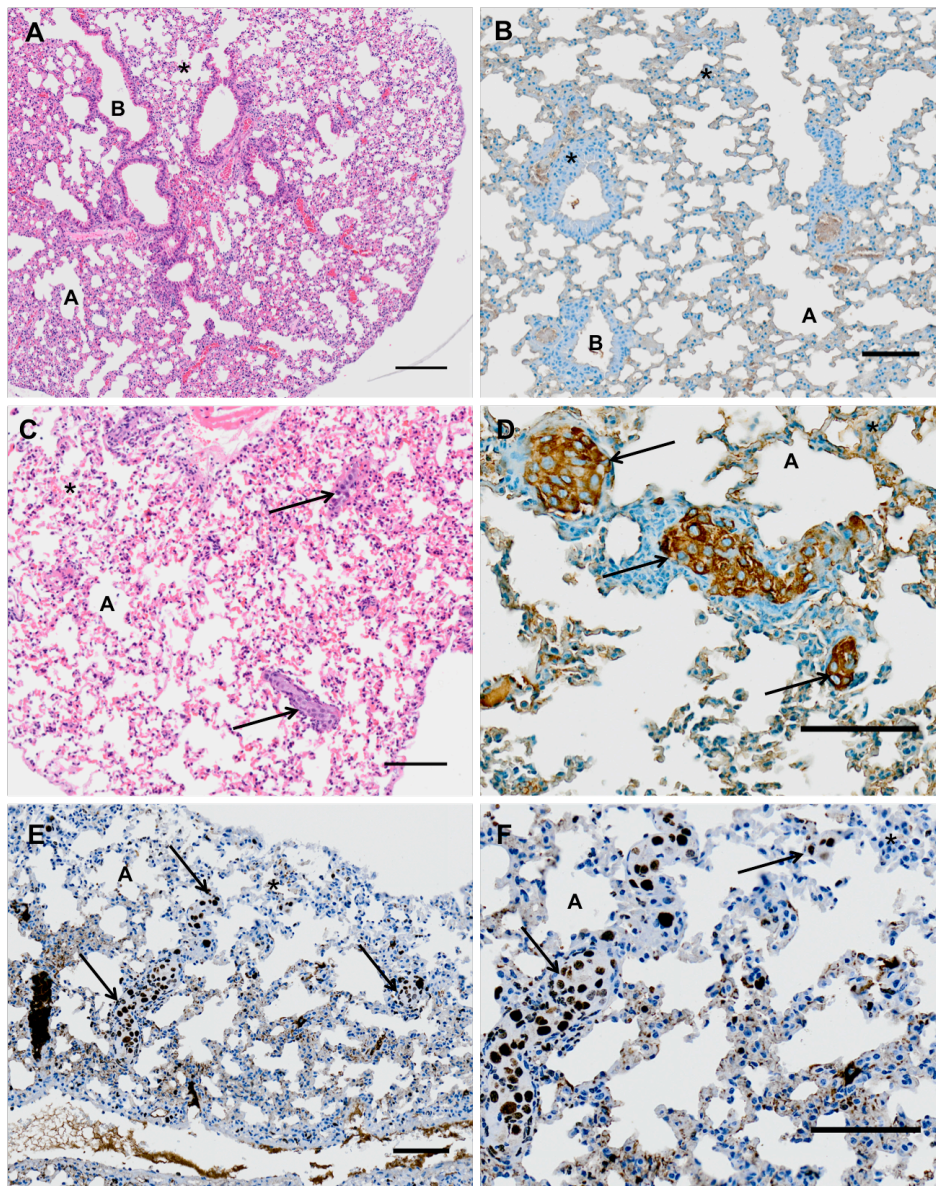


Figura R42: Estructura histológica conservada representativa de los animales tratados sin metástasis y metástasis pulmonares en el animal número 6 del grupo de tratamiento. (A) Tejido pulmonar conservado (asterisco) sin infiltración por células tumorales atípicas. Bronquiolo terminal (B). Sacos alveolares (A). HE 2x. Barra de escala: 100 μm . (B) Mayor aumento. Tejido pulmonar conservado (asteriscos) sin infiltración por células tumorales atípicas. Bronquiolos (B). Sacos alveolares (A). Tinción vimentina negativa. IHQ 10x. Barra de escala: 100 μm . (C) Tejido pulmonar conservado (asterisco) con infiltración por células tumorales atípicas (flechas) formando micrometástasis. Sacos alveolares (A). HE 4x. Barra de escala: 150 μm . (D) Tejido pulmonar con micrometástasis de células tumorales atípicas (flechas) con expresión citoplásmica de vimentina. Sacos alveolares (A). IHQ 20x. Barra de escala: 50 μm . (E) Tejido pulmonar con estructura histológica conservada e infiltración focal por células tumorales atípicas intravasculares (flechas). Expresión nuclear de Ki67. IHQ 10x. Barra de escala: 100 μm . (F) Mayor aumento. Expresión nuclear de Ki67 en células tumorales atípicas (flechas). IHQ 20x. Barra de escala: 50 μm .

4.2 Metástasis cerebrales

Los animales del grupo control presentaron macrometástasis (Figura 35 C) generalmente y metástasis de menor tamaño en zonas determinadas (Figura 35 A), a excepción del animal número 3 en el que no se observaron metástasis. En el grupo de tratamiento se hicieron cortes seriados a distinta profundidad para buscar micrometástasis o células tumorales aisladas, pero no se encontraron metástasis en ninguno de los animales del grupo. Se muestran imágenes representativas de los cortes histológicos de los animales tratados en la figura 35 (B, D y F).

Las metástasis cerebrales en el grupo control presentaron expresión de vimentina (Figura 36 C, D) y Ki67 (Figura 36 A, B). La IHQ de CD31 mostró frecuentemente nódulos de células tumorales alrededor de un vaso sanguíneo como se aprecia en la figura representativa 36 F. Como control positivo de expresión de CD31 se puede observar la tinción de las células de los plexos coroideos (Figura 36 E, flecha).

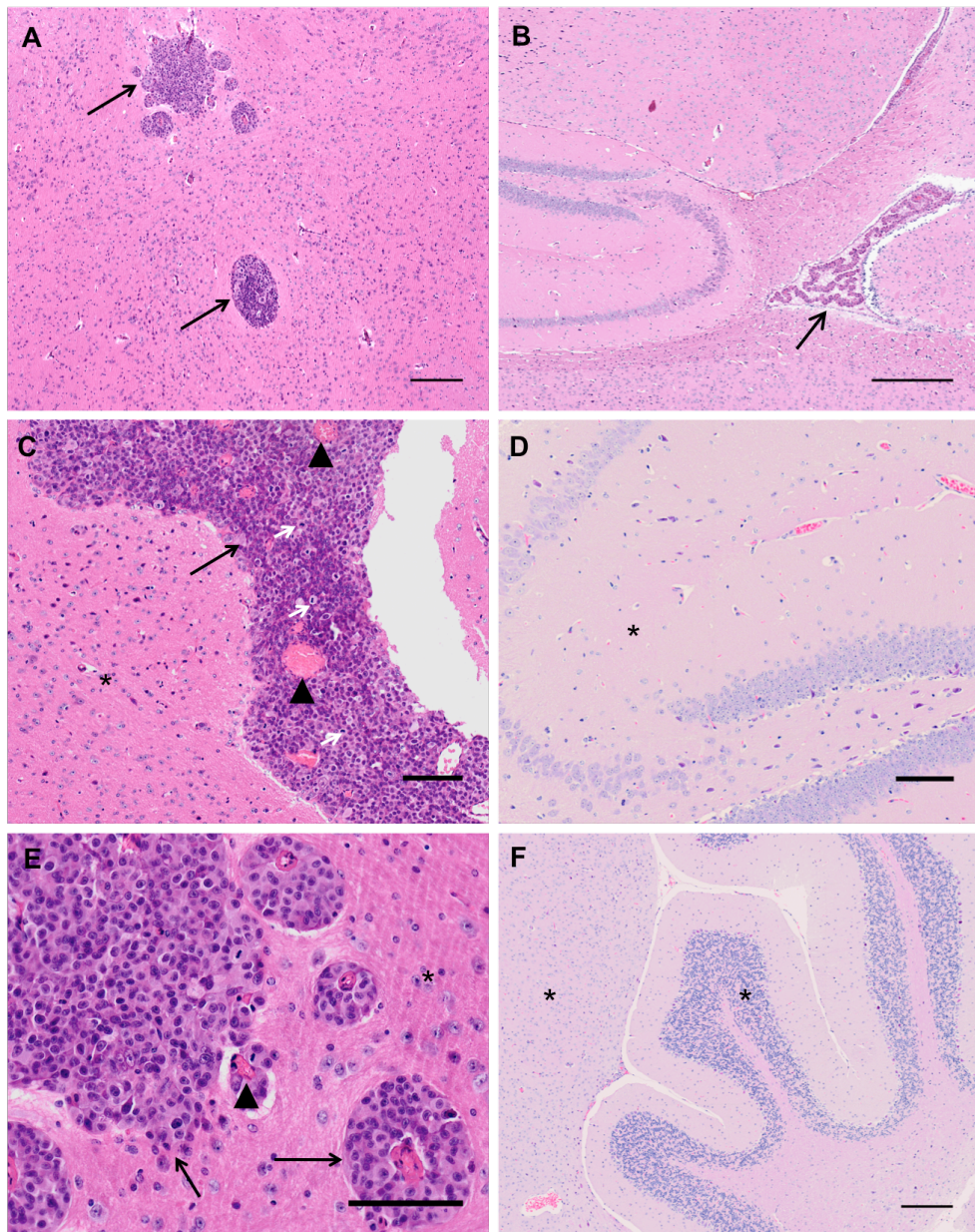


Figura R43: Metástasis cerebrales representativas del grupo control y tejido cerebral sin metastásis representativo del grupo tratado. (A) Cerebro. Estructura histológica infiltrada por nódulos de diferentes tamaños de células tumorales atípicas (flechas). HE 4x. Barra de escala: 100 μ m. (B) Cerebro. Estructura histológica conservada sin infiltración por células tumorales atípicas. Hipocampo. Tercer ventrículo con plexos coroides (flecha). HE 4x. Barra de escala: 200 μ m. (C) Cerebro. Estructura histológica sustituida por una masa de células tumorales atípicas (flechas) con las mismas características morfológicas que las descritas en la figura anterior. Mitosis (flechas blancas). HE 10x. Barra de escala: 100 μ m. (D) Cerebro. Hipocampo. Estructura histológica conservada (asterisco) sin infiltración por células tumorales atípicas. HE 10x. Barra de escala: 100 μ m. (E) Mayor aumento. Cerebro. Células tumorales (flechas) con signos de atipias, núcleos de diferentes tamaños, nucleolos evidentes y escasos citoplasmas eosinófilos, rodeadas de células neuronales (asterisco) sin hallazgos. Vaso (cabeza de flecha). HE 20x. Barra de escala: 50 μ m. (F) Cerebro. Cerebelo. Estructura histológica conservada (asterisco) sin infiltración por células tumorales atípicas. HE 10x. Barra de escala: 100 μ m.

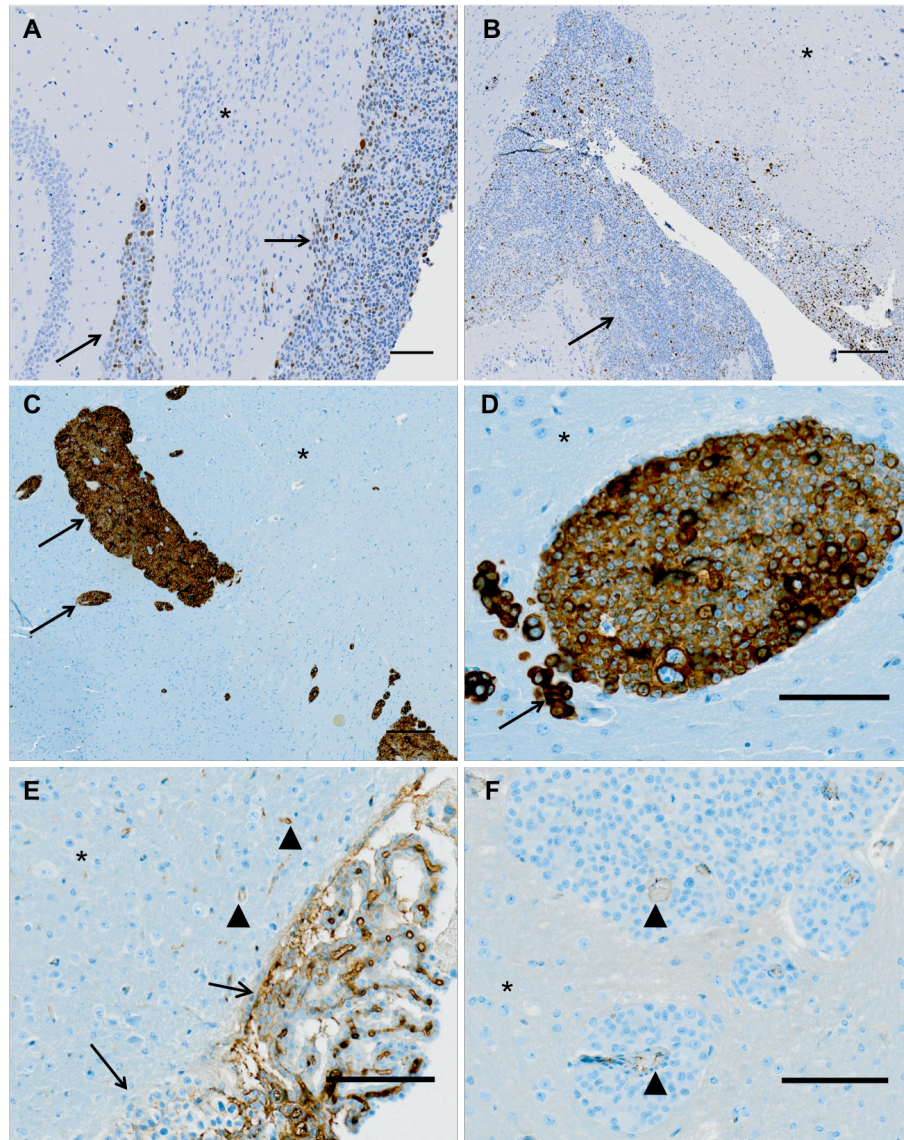


Figura R44: Expresión de Ki67, vimentina y CD31 en cortes histológicos de animales control. (A, B) Cerebro. Células tumorales atípicas (flechas) infiltrando tejido cerebral (asterisco). Expresión nuclear de Ki67 en células en proliferación. IHQ Ki67, 10x. Barra de escala: 100 μm . (C) Cerebro. Estructura histológica con proliferación de células tumorales atípicas dispuestas en nódulos de diferentes tamaños (flechas), con expresión citoplasmática de vimentina. IHQ 10x. Barra de escala: 100 μm . (D) Mayor aumento. Vimentina, IHQ 20x. Barra de escala: 50 μm . (E) Cerebro. Estructura histológica parcialmente sustituida por células tumorales atípicas (flecha esquina izquierda). Vasos sanguíneos en plexos coroideos (flecha corta) con expresión de CD31. Vasos (cabeza de flecha). Neuronas (asterisco). IHQ 20x. Barra de escala: 50 μm . (F) Cerebro. Células tumorales atípicas alrededor de estructuras vasculares (cabeza de flecha), con expresión de CD31 en células endoteliales vasculares. Neuronas conservadas (asterisco). IHQ 20x. Barra de escala: 50 μm .

4.3 Análisis histológico del tejido hepático

Con el objetivo de estudiar la afectación hepática por el tratamiento o por la existencia de metástasis, se realizó un estudio mediante tinción de HE. No se encontraron metástasis hepáticas. Los animales del grupo control presentaban una estructura hepática conservada con una ligera inflamación de tipo crónico a nivel de los espacios porta. En cambio los animales del grupo tratado presentaban un mayor infiltrado inflamatorio en estas estructuras. Los hepatocitos y la estructura histológica estaban conservados sin presentar ningún tipo de alteración. Estos resultados sugieren una ligera inflamación en los espacios porta debido al tratamiento con edelfosina, sin mayores alteraciones.

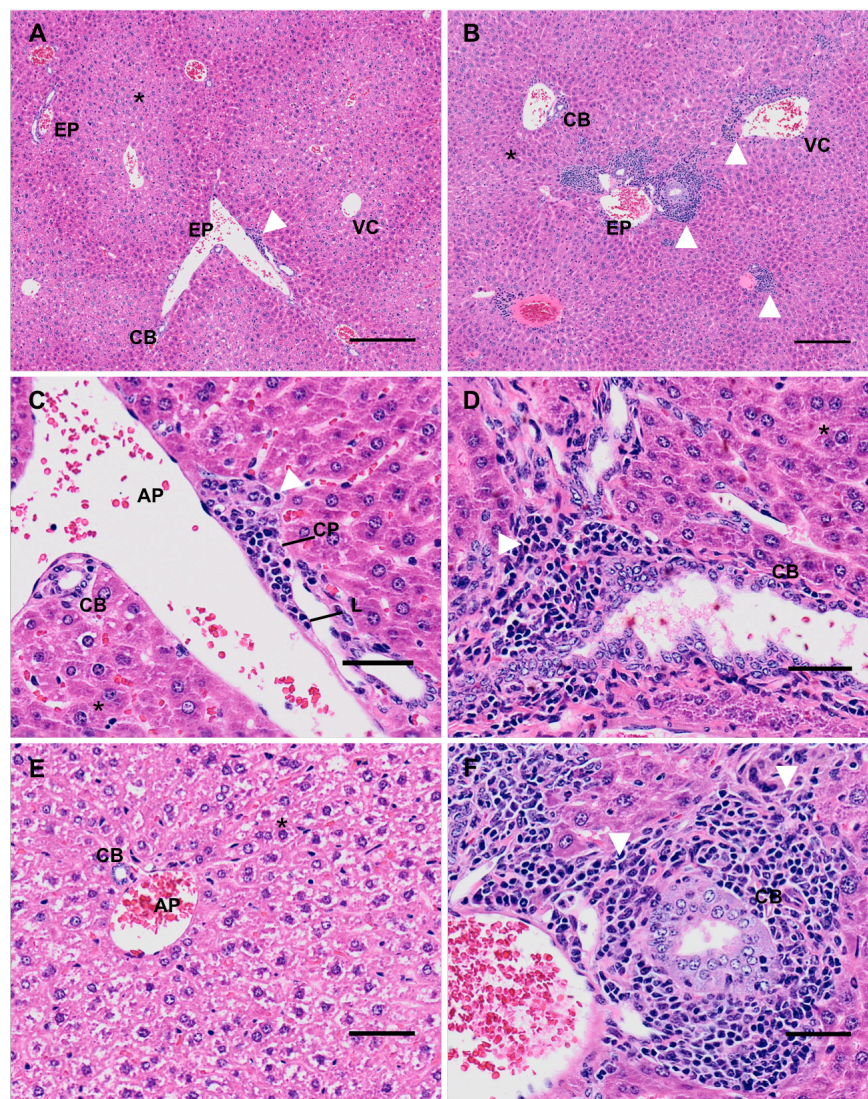


Figura R45: Estructura hepática en animales control y tratados. (A) Hígado. Tejido hepático con estructura histológica conservada (asterisco). Vena centrolobulillar (VC) y espacio porta (EP) con escaso infiltrado inflamatorio crónico (cabeza de flecha blanca), ambos rodeados por hepatocitos morfológicamente conservados. Conducto biliar (CB). HE 4x. Barra de escala: 100 μ m. (B) Hígado. Tejido hepático con estructura histológica

conservada. Infiltrado inflamatorio crónico linfoplasmocitario (cabeza de flecha blanca) de diferente intensidad en los espacios porta (EP). Hepatocitos conservados (asterisco). Conducto biliar (CB). Vena centrolobulillar (VC). HE 4x. Barra de escala: 100 μm . (C) Hígado. Espacio porta con infiltrado inflamatorio de tipo crónico. Linfocitos (L). Células plasmáticas (CP). Hepatocitos conservados. HE 20x. Barra de escala: 50 μm (D) Hígado. Detalle de espacio porta con infiltrado inflamatorio crónico. Conducto biliar (CB). HE 20x. Barra de escala: 50 μm . (E) Hígado. Hepatocitos conservados. Detalle de espacio porta (EP). Conducto biliar (CB) y arteria porta (CB). HE 20x. Barra de escala: 50 μm . (F) Hígado. Detalle de conducto biliar (CB) rodeado por infiltrado inflamatorio crónico linfoplasmocitario (cabeza de flecha blanca) y hepatocitos conservados. HE 20x. Barra de escala: 50 μm .

Capítulo 5:

DISCUSIÓN

Sección I: Caracterización de la muerte celular

Estudios previos indican que la edelfosina activa la apoptosis en distintos tumores sólidos y hematológicos gracias a la señalización inducida desde los *lipid rafts* de la membrana plasmática, a la que se incorpora posiblemente en parte, gracias a su afección por el colesterol.¹⁷⁶ Dado que los rafts lipídicos son de radical importancia en la señalización oncogénica del cáncer de mama,¹⁸⁰ hipotetizamos que el tratamiento con edelfosina podría ser efectivo induciendo muerte celular en este tipo de cáncer. Con el objetivo de estudiar si esto era posible, realizamos un estudio con distintas líneas celulares. Uno de los objetivos de este estudio era caracterizar la muerte celular en cáncer de mama en el caso de ser sensible al tratamiento con el éter-lípido.

La edelfosina induce muerte celular regulada en líneas de cáncer de mama

En nuestro estudio la edelfosina causó muerte celular en gran parte de las líneas estudiadas, siendo generalmente un tipo de muerte celular dilatada en el tiempo que se manifestó a las 48 h de tratamiento para las líneas sensibles y a partir de las 72 o 96 h en las más resistentes. La muerte celular implicó la permeabilización de la membrana plasmática y/o la degradación del DNA en las líneas sensibles, siendo esta última dependiente de caspasas. La inhibición de su actividad y en consecuencia, de la degradación del DNA, no inhibió la muerte celular en ningún caso limitándose a retrasarla en líneas celulares concretas, en las que disminuyó la permeabilidad de la membrana plasmática. Estos resultados sugieren que la activación de caspasas es un proceso que contribuye a la muerte celular pero que no es imprescindible, pareciendo indicar la coexistencia de distintos procesos de muerte celular que se darían en paralelo. Estos procesos tendrían distinto peso en el destino final de la célula, en función de la línea celular.

En un estudio sobre las características morfológicas resultantes tras el tratamiento, se vieron rasgos tradicionalmente apoptóticos como son la disminución del tamaño y la complejidad celular.¹⁶⁷ Estas características apoptóticas se dieron en parte de las líneas estudiadas. Sin embargo, otras líneas presentaron un aumento de la complejidad celular tras el tratamiento, característico de un proceso necrótico pero, sin un aumento del tamaño celular, característica de estos procesos.¹⁶⁷ Estas líneas no sufrieron degradación del DNA o lo hicieron a unos niveles muy bajos, al tiempo que presentaban altos porcentajes de permeabilidad de la membrana plasmática tras el tratamiento.

Estos resultados apuntarían a dos tipos de muerte celular o dos tipos de sensibilidad al compuesto, en función de la línea celular y su contexto genético. Uno de los grupos estaría formado por las líneas del subtipo molecular HER2, Luminal y Triple Negativo (*Basal-like*), en el que todas las líneas HER2 y las líneas sensibles de los grupo Luminal y *Basal-like* compartirían un mismo tipo de muerte celular de características apoptóticas, incluyendo, degradación del DNA, activación de caspasas y disminución del tamaño y la complejidad celular. Las líneas resistente en el grupo Luminal (T-47-D) y medianamente resistente en el grupo *Basal-like* (MDA-MB-468), presentarían las mismas características en menor proporción pero de forma retrasada en el tiempo, y favorecida con la inhibición de la autofagia.

Otro grupo lo formarían las líneas sensibles del subtipo molecular Triple Negativo (Claudin-low), MDA-MB-231 y MDA-MB-435, que compartirían rasgos necróticos como son la permeabilidad de la membrana plasmática sin degradación del DNA ni activación de caspasas o muy débil, y aumento de la complejidad celular, pero no del tamaño celular (típico rasgo de una muerte necrótica). Las líneas medianamente resistentes (BT-549 y 435-Lung) y resistentes (Hs-578-T) de este grupo presentarían características apoptóticas al sensibilizarse al tratamiento tras la inhibición de la autofagia, como comentaremos más adelante, o con tiempos más largos de tratamiento, condiciones ambas en las que aumenta la degradación del DNA.

En principio, podríamos hablar así de dos tipos de muerte celular, una que implica la permeabilización de la membrana plasmática con degradación del DNA y activación de caspasas y, otra que no implica las dos últimas. Sin embargo, no podemos descartar que se esté produciendo otro tipo de degradación del DNA de fragmentos de mayor tamaño a los producidos por las endonucleasas activadas por caspasas, ya que seríamos incapaces de detectarlos con los ensayos realizados.²⁶⁰ De esta forma, si hubiera fragmentación del DNA de gran tamaño (50 kB) no podríamos detectarla con el análisis de células fijadas con etanol, tal y como se realizaron los estudios de ciclo celular por citometría de flujo. Esto es debido a que la fijación con etanol permeabiliza las células con un tamaño de poro suficiente para dejar salir los pequeños fragmentos internucleosomales de DNA, pero estos poros no son lo suficientemente grandes para permitir el paso de fragmentos de mayor tamaño. Sin la realización de otro estudio como por ejemplo un ensayo TUNEL²⁶¹ que permitiría ver los extremos del DNA independientemente del tamaño de sus fragmentos, no podemos descartar la existencia de degradación de DNA en éstas líneas celulares. En este sentido no podemos descartar que este tipo de degradación de gran tamaño contribuya a la muerte celular.

En resumen, las características observadas en la muerte celular inducida por edelfosina confirmarían la existencia de varios tipos de muerte celular regulada,¹⁶⁷ ya que se trata de procesos dilatados en el tiempo y en los que están implicados procesos regulados genéticamente. Estos procesos implicarían la activación de caspasas y la degradación de DNA en el caso de la muerte con rasgos apoptóticos, y un tipo de muerte celular necrótica o con rasgos necróticos, alejada de la visión tradicional de la necrosis como una muerte de tipo accidental.

La inhibición de la autofagia sensibiliza las líneas resistentes a edelfosina

Los resultados de nuestro estudio mostraban la implicación de procesos apoptóticos y necróticos en la muerte celular inducida por edelfosina. Ambos procesos corresponden a distintos tipos de muerte celular regulada, y quisimos saber si podía existir un tercer tipo de muerte celular implicada como sería la muerte autofágica.¹⁶⁷ Para analizar la inducción de autofagia como consecuencia del tratamiento, estudiamos la expresión de la proteína LC3B, asociada a la formación de autofagosomas.²⁴³ Después de comprobar que el tratamiento inducía la acumulación de autofagosomas, analizamos si esto era debido a una inducción de la autofagia o a un bloqueo en los pasos finales de la vía. Estudiando la lipidación de LC3 con y sin inhibidores lisosomales comprobamos que, efectivamente el tratamiento con edelfosina inducía autofagia.²⁴⁴ Con el objetivo de elucidar el papel de la autofagia en la muerte celular, analizamos la muerte celular con y sin inhibidores lisosomales. La inhibición química de la autofagia no inhibió la muerte celular en ninguna de las líneas estudiadas, sugiriendo que la autofagia no tiene un papel en la muerte celular.

Estos resultados apuntarían a la inducción de autofagia como una respuesta adaptativa al estrés y no como un proceso de muerte celular. Esta hipótesis se vería reforzada por los resultados de la inhibición de la autofagia en las líneas medianamente resistentes (435-Lung, BT-549 y MDA-MB-468) y resistentes (T-47-D y Hs-578-T), dado el aumento de la muerte celular resultante. En este sentido, los resultados apuntarían a que las líneas resistentes se sensibilizan al tratamiento con la inhibición de la autofagia. En estas células, la autofagia podría estar inhibiendo o retrasando de alguna forma los procesos de muerte inducidos por la edelfosina, ya sea degradando orgánulos dañados como podría ser la mitocondria o contribuyendo a la eliminación del éter-lípido.

A pesar de no tener datos sobre la incorporación de edelfosina en las distintas líneas celulares, estos resultados parecen indicar que el éter-lípido debe haberse incorporado a la célula ya que es capaz de inducir muerte celular al inhibirse la autofagia. En este sentido,

tendríamos dos posibilidades dados los resultados obtenidos y la forma de realizar el experimento. En primer lugar, la autofagia podría estar inhibiendo o retrasando la incorporación de la edelfosina de alguna forma y en segundo lugar, podría ocurrir que la autofagia estuviera inhibiendo la acción de la edelfosina debido al reciclaje de orgánulos dañados o a su eliminación. Dado que pretratamos las células con los inhibidores lisosomales 1 h antes de añadir la edelfosina al medio de cultivo, la autofagia estaría inhibida, teóricamente, en el momento de añadir la edelfosina. De esta forma, podría suceder que la autofagia impidiese de algún modo la incorporación de la edelfosina a la célula en las líneas resistentes. Sería necesario comprobar en primer lugar que los inhibidores lisosomales inhiben la autofagia después de 1 h de tratamiento, y cuál es grado de incorporación de la edelfosina en las distintas líneas, sensibles y resistentes. En este sentido, estudios previos en otras líneas celulares han demostrado que el inhibidor lisosomal cloroquina no afecta a la incorporación de edelfosina.²⁶²

Por otra parte, el análisis de incorporación del compuesto en las líneas sería de gran ayuda ya que revelaría si existe alguna relación entre la sensibilidad o resistencia a edelfosina y su incorporación en líneas de cáncer de mama.

Estos resultados, en su conjunto, sugieren que la inducción de autofagia tras el tratamiento tiene un papel de resistencia o respuesta adaptativa al estrés, sin contribución a la muerte celular. Sin embargo, para corroborar estos estudios sería necesario inhibir genéticamente la autofagia con el silenciamiento de genes clave como serían ATG5 y/o ATG7. Sin estos datos, no podemos tener la certeza de que la autofagia inducida por el tratamiento no participe de alguna forma en la muerte celular.

La edelfosina induce un aumento de células en fase G2/M sin afectar al DNA

Una de las características del tratamiento con edelfosina, tanto en cáncer de mama como en otros tipos tumorales, es la inducción de un aumento de la fase G2/M del ciclo celular en gran parte de las líneas estudiadas.¹⁷⁶ La fase G2 y la fase M del ciclo celular disponen de mecanismos de control que evitan la progresión del ciclo celular en caso de daños en el DNA o fallos en la unión de los cromosomas al huso mitótico respectivamente.²⁴⁷ En este sentido, quisimos saber si la edelfosina inducía una parada en cualquiera de estas fases del ciclo. Para ello estudiamos, en primer lugar, un marcador del punto de control G2 como es la proteína CDK1,²⁴⁷ cuya forma fosforilada se acumula en caso de producirse una parada del ciclo celular en este punto. Nuestros estudios muestran una expresión de p-CDK1 oscilante como ocurre en un ciclo celular normal.

En segundo lugar, quisimos ver si el tratamiento con edelfosina inducía algún tipo de daño en el DNA como ocurre cuando el punto de control G2 detiene el ciclo celular.²⁴⁷ Para ello utilizamos la fosforilación de la histona H2AX como marcador de roturas en el DNA²⁴⁹ y estudiamos su expresión por microscopía confocal. A pesar de no tener análisis cuantitativos de la expresión de esta proteína tras el tratamiento, los resultados muestran que la edelfosina no induce la fosforilación de la histona H2AX, a diferencia del tratamiento con doxorubicina.²⁶³ Estos resultados sugerirían que el tratamiento no produce daño en el DNA y apoyarían los análisis sobre mutagénesis realizados con edelfosina en estudios previos.²⁶⁴ Nuestros resultados apoyarían así la tesis de que la edelfosina no actúa sobre el DNA sino a nivel de la membrana celular, a diferencia de otros compuestos utilizados en la quimioterapia convencional.

En resumen, nuestros resultados muestran que el tratamiento con edelfosina no induce una parada del ciclo celular en la fase G2. Quisimos estudiar entonces, si podía haber una parada de ciclo celular en la fase M. A pesar de haber marcadores para estudiar esta fase del ciclo por citometría y western blot, una manera fácil de ver si hay algún problema en esta fase serían observar si se produce la división nuclear con normalidad. Para analizar si los núcleos se dividían realizamos un estudio de microscopía confocal marcando en verde la tubulina, en rojo la actina y el núcleo con DAPI. En las imágenes correspondientes al tratamiento con edelfosina observamos como se producía la división nuclear y los cromosomas aparecían unidos al huso mitótico. Estos resultados sugieren que la edelfosina no está causando una parada de ciclo en fase M ya que los núcleos se dividen y, por tanto, el punto de control de esta fase se supera. En este sentido, estudios previos con otras líneas celulares han demostrado la división nuclear de las células y la aparición de células multinucleadas.²⁶⁵

Estos resultados en su conjunto parecen indicar que la edelfosina no induce un efecto a nivel de la división nuclear que justifique el aumento de células en la fase G2/M del ciclo, y sugerirían un fallo en la citocinesis como posible causa de acumulación de células en esta fase. En este sentido, dada la desestabilización creada en la membrana plasmática a consecuencia de la incorporación de la edelfosina y la reorganización de los rafts lipídicos²⁰², podríamos esperar fallos en la división celular ya que la citocinesis está regulada por GTPasas de la familia Rho,²⁶⁶ cuya activación ocurre en las plataformas lipídicas.¹⁸⁰ Además, distintos estudios muestran la implicación de lípidos específicos en la regulación de la citocinesis, que se verían afectados por la incorporación de la edelfosina a la membrana.²⁶⁷ Así en condiciones normales, PIP2 se acumula en la cara interna de la membrana plasmática y recluta a la GTPasa RhoA, produciéndose un fallo en la citocinesis por la desregulación de cualquiera de los dos.

El tratamiento con edelfosina inhibe mayoritariamente la fosforilación de AKT^{S473}

Uno de los problemas más importantes en el tratamiento del cáncer de mama son las resistencias a la terapia.¹²⁹ En este sentido, en los tumores dependientes de hormonas las resistencias a la terapia endocrina están relacionadas con las distintas vías de señalización activadas por el receptor de estrógeno (ER).⁹⁴ El ER puede activarse, además de por la vía clásica que inhibiría el tamoxifeno, por fosforilación a través de las quinasas ERK y AKT, siendo la vía PI3K-Akt-mTOR fundamental en estos mecanismos de resistencia y una importante diana terapéutica.⁶³ Al mismo tiempo, la sobreexpresión de receptores como HER2 serían clave activando esta misma vía, a la vez que la activación de la misma por otros receptores de la familia HER estaría implicada en la resistencia a la terapia dirigida frente a HER2.¹¹⁰

Quisimos estudiar si el tratamiento con edelfosina podía tener efectos sobre la señalización de la vía oncogénica PI3K-Akt-mTOR en cáncer de mama. Para ello analizamos la expresión de la forma fosforilada de AKT en su residuo serina 473. Los niveles de fosforilación de AKT en este residuo son más predictivos del estado de activación que los del residuo treonina 308, por lo que elegimos esta forma de la proteína para medir su estado de activación.²⁶⁸ Nuestros resultados muestran que el tratamiento disminuyó la fosforilación de AKT en la línea MCF-7, apoyando estudios previos en otros tipos tumorales, en los que la edelfosina produce también una inhibición de la proteína.¹⁹³ Para saber si este efecto era general o dependía de la línea celular, realizamos un estudio de la expresión de p-AKT(S473) en el resto de líneas celulares de mama. Además de p-AKT(S473), analizamos la expresión de la proteína AKT total, de p-mTOR y mTOR.

Los resultados preliminares del único estudio realizado con todas las líneas sugieren que, independientemente de la sensibilidad o resistencia de las líneas al tratamiento, la edelfosina disminuye los niveles de fosforilación de AKT en la mayoría de líneas estudiadas. En ninguna de las líneas se produjo un aumento de la fosforilación de AKT. Sin embargo, hubo un efecto desigual sobre la expresión de la proteína total (no fosforilada), aumentando o disminuyendo en función de la línea celular y sin ninguna relación con la sensibilidad o resistencia de las líneas. La línea AU565 no mostró fosforilación basal de AKT por lo que no sabemos cuál es el efecto del tratamiento en esta línea, ya que no analizamos proteínas activadas por AKT para estudiar su actividad. La fosforilación de mTOR y su expresión fueron desiguales tras el tratamiento, inhibiéndose o aumentando indistintamente en líneas sensibles y líneas resistentes.

Con respecto a la línea SUM-149-PT, no observamos expresión de la proteína Giantina en el estudio y no podemos utilizarla como control de carga, por lo que no podemos extraer conclusiones del efecto sobre la expresión de mTOR y su fosforilación. Con la línea BT-549 tampoco podemos analizar el papel de mTOR ya que la expresión de la proteína Giantina disminuyó con el tratamiento. En esta línea no podemos distinguir si la edelfosina disminuyó la expresión de Giantina o si había menos cantidad de proteína.

Nuestros resultados muestran, de forma preliminar, una disminución de la fosforilación de AKT mayoritaria en las líneas de cáncer de mama analizadas y esto se da, tanto en las líneas sensibles como en las líneas resistentes. Estos resultados apuntarían a que el tratamiento con edelfosina inhibiría AKT en líneas de cáncer de mama. Además este efecto se da en líneas con distinto subtipos molecular y grado de sensibilidad. Para corroborar estos resultados sería necesario analizar las vías de señalización activadas por AKT. En este sentido la inhibición de la señalización oncogénica de AKT en cáncer de mama, implicaría la inhibición de multitud de procesos que participan en la progresión de la enfermedad, la resistencia a la terapia y la metástasis.¹⁰²

En el grupo de líneas Luminales y el grupo de líneas HER2, la inhibición de AKT tendría implicaciones importantes ya que los fenómenos de resistencia a los tratamientos en estos subtipos moleculares, están mediados mayoritariamente o convergen en la señalización de AKT.¹¹¹ Por tanto, en estos subtipos moleculares la combinación de terapia hormonal y de terapia dirigida frente a HER2 con edelfosina sería de interés y fácilmente ensayable en estudios de terapia combinada.

También sería importante destacar que el tratamiento parece disminuir la fosforilación de AKT y por tanto, su activación, en líneas resistentes. Esto implicaría un efecto sobre esta vía de señalización independientemente de la inducción de muerte celular.

Sección II: Caracterización del fenotipo metastático

La edelfosina inhibe la adhesión celular

La adhesión celular es un punto fundamental en la cascada metastática ya que las células tumorales deben ser capaces de adherirse a los componentes de la matriz extracelular (ECM) y a otras células como las que forman el estroma mamario, en el caso del cáncer de mama, y el endotelio.²⁵⁶

La inhibición de la adhesión celular ha generado cierta controversia por la aparente contradicción entre la inhibición de esta como diana terapéutica, y la inhibición de la adhesión entre las células del tumor primario en la transición epitelio-mesénquima (EMT). Sin embargo, esta controversia no es tal ya que debe distinguirse entre la adhesión homotípica, entre células del mismo tipo, y la adhesión heterotípica, entre células de distinto tipo y entre células y ECM.²⁶⁹ Es decir, una célula tumoral que sufre EMT en el tumor primario pierde, efectivamente, sus uniones con las células del tumor primario pero estas son uniones homotípicas y debe ser capaz de generar uniones heterotípicas para unirse a otros tipos celulares en la ECM y el endotelio, y a componentes de la ECM y la membrana basal o subendotelial como el colágeno y la laminina.¹⁴²

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con edelfosina inhibe la adhesión de las células metastáticas de las líneas MDA-MB-231 y 435-Lung, al colágeno y a la laminina. Ambos sustratos se utilizan para mimetizar el ambiente del estroma mamario y de la membrana basal respectivamente.²⁵³ Estos resultados sugieren que la edelfosina podría ser eficaz inhibiendo la adhesión de las células tumorales a la ECM y a la membrana basal, lo que supondría la inhibición de la diseminación metastática porque las células se verían incapacitadas para traccionar sobre el sustrato y migrar a través del organismo.

En este sentido, las moléculas de adhesión se dividirían en 5 clases principalmente: superfamilia de las Ig, integrinas, cadherinas, selectinas y receptores *homing* de linfocitos.²⁷⁰ Estudios previos han mostrado que el tratamiento con edelfosina disminuye la expresión de distintas moléculas de adhesión celular de las familias de las integrinas, las selectinas y receptores homing de linfocitos.¹⁷⁶ Estas proteínas serían el CD44 (HCAM), CD54 (ICAM) y la integrina $\beta 1$ (CD29) en células endoteliales. La proteína CD44 es un receptor del ácido hialurónico de la ECM y está asociado a los lipid rafts, donde promueve la migración y la invasión metastática.²¹³ Se ha visto que la edelfosina inhibe la adhesión de los neutrófilos al endotelio e impide su migración a concentraciones no tóxicas para las células, debido a una inhibición de la expresión de CD44 y Selectina-L.¹⁷⁶ La proteína ICAM o CD54 es una molécula de adhesión intercelular implicada en la transmigración de neutrófilos y la inflamación y, la integrina $\beta 1$ (CD29) está implicada en la reparación de tejidos, la invasión y la metastásis tumoral. Todas estas proteínas estarían implicadas en la adhesión celular heterotípica, necesaria para la adhesión celular a la ECM y las células estromales y endoteliales, que permitirían la diseminación de las células metastáticas.¹⁶¹

La edelfosina inhibe la migración celular

Las células tumorales deben ser capaces de migrar desde el tumor primario a sitios distantes en el organismo para metastatizar. Para ello las células necesitan ser capaces de adherirse al sustrato como se expuso anteriormente, pero además la migración implica una serie de procesos que permiten el movimiento como son: la generación de una polarización celular, la formación de protrusiones y la retracción.²⁷¹ La suma y la coordinación de estos procesos va a permitir el avance de las células tumorales en una dirección determinada, y en todos estos procesos intervienen proteínas que son susceptibles de ser modificadas, disminuidas o inhibidas por el tratamiento con edelfosina y la desestructuración de los rafts lipídicos.

Las GTPasas Rho (Cdc42, Rac1 y RhoA) regulan el citoesqueleto de actina y los microtúbulos, la adhesión y la formación de lamelipodios y filopodios, y por tanto, cualquier proceso que requiera motilidad celular. Brevemente, en la migración celular estarían implicadas las siguientes proteínas principalmente:²⁷¹

En la fase inicial de polarización de la célula, están implicadas la GTPasa Cdc42 y el complejo PAR y aPKC que producen un tráfico de vesículas hacia el frente de avance y organizan los microtúbulos. En respuesta a un estímulo quimiotáctico, factores de crecimiento o señalización por componentes de la ECM, se produce una acumulación de PIP3 en el frente de avance a través de la acción localizada de PI3K y, de la acción de la fosfatasa PTEN en los laterales y el frente trasero.

En la fase de formación de protrusiones, estas se producen por proteínas efectoras de Rac1 y Cdc42 que regulan el reordenamiento del citoesqueleto de actina. Las adhesiones focales que regulan la estabilización de los filamentos de actina, requieren la activación de las integrinas que se reclutan a las estructuras nacientes de las adhesiones. En este proceso también intervienen proteínas como la Talina, PKC y PI3K y, todas ellas son reguladas por Rac1.

Durante la última fase de retracción, proteínas como Src, FAK, ERK, y Rho regulan el desensamblaje de las adhesiones en la zona lateral y trasera de la parte celular opuesta al frente de avance.

Estudios previos muestran que las GTPasas Rho como Rac1 y RhoA están asociadas a los rafts lipídicos²¹³ desde donde señalizan y activan a sus proteínas efectoras, por lo que una desestabilización de estas plataformas podría influir en su actividad y causar defectos en la motilidad y migración celular. Además de estas, las quinasas de la familia Src que integran

las señales de los receptores tirosin quinasa y los transmiten a PI3K, Ras, Akt y FAK, también necesitan estar localizadas en los lipid rafts, por lo que su activación podría ser afectada por la incorporación de la edelfosina.¹⁸⁰

Por otra parte, otros estudios han visto que la edelfosina inhibe la señalización de PI3K, Ras, ERK y Akt,¹⁷⁶ todas ellas importantes efectores de las GTPasas Rho en el proceso de migración celular.²⁷¹ En este sentido, la inhibición de estas vías podría estar causando también defectos en la motilidad y la migración celular.

Nuestros resultados muestran una inhibición de la motilidad celular en la línea MDA-MB-231 a las concentraciones de 5 y 10 μM de edelfosina, que no es debida a una disminución de la viabilidad ya que esta se mantuvo por encima del 90 %. A la concentración de 20 μM observamos una disminución hasta el 79 % de la viabilidad que podría estar influyendo en los resultados observados. Respecto a la línea 435-Lung, el efecto es menor y solo a las concentraciones de 10 y 20 μM , teniendo los controles de esta línea menor capacidad de cierre de la herida y necesitando tiempos más largos para realizar el experimento. En esta línea la viabilidad se mantuvo siempre por encima del 90 % al ser más resistente al tratamiento que la línea MDA-MB-231.

Nuestros resultados sugieren que el tratamiento disminuyó la motilidad celular en ambas líneas y que este efecto no fué debido a una disminución de la viabilidad. De igual manera, en el ensayo de migración en cámara de Boyden la edelfosina inhibió la migración de forma independiente a su efecto sobre la viabilidad celular. En este caso, la migración era en respuesta a un estímulo quimiotáctico imitando un posible estímulo soluble extracelular en el microambiente tumoral.

En su conjunto, estos resultados sugieren que la edelfosina inhibe la motilidad y la migración celular y, estos efectos podrían deberse a la inhibición o disminución de proteínas clave en estos procesos como se comentó anteriormente, o a la incapacidad para realizar sus funciones debido a una desestructuración de los rafts lipídicos.

La edelfosina inhibe la invasión

La invasión tumoral es el resultado de sumar la degradación local de la ECM y/o la membrana basal a los procesos de adhesión y migración descritos anteriormente.²⁵² El potencial invasivo de las células tumorales depende de su capacidad para unirse a la ECM y a la membrana basal, en primer lugar, y de degradar estos sustratos ligeramente y migrar a través de ellos.²⁵⁴ La degradación debería ser suficiente como para dejar pasar una célula

pero no excesiva, porque la célula perdería sus puntos de anclaje. En este sentido, se ha visto que los rafts lipídicos son muy importantes en la formación de invadopodios en cáncer de mama.¹⁸⁰ Proteínas localizadas en las plataformas raft como MMP14, MMP2 y MMP9, estarían implicadas en la degradación del sustrato y las dos últimas se ubicarían también aquí durante la migración.²¹¹ Estas proteínas podrían ser afectadas por el tratamiento con edelfosina de igual forma que las proteínas implicadas en la adhesión y la migración celular, debido a la desorganización de los rafts lipídicos. Varios estudios muestran que distintas proteinasas como MMP2 y MMP9 se unen a integrinas en la membrana celular para ejercer su actividad proteolítica, por lo que la afectación o reorganización de integrinas debido al tratamiento podría también tener un efecto en la invasión celular.

Se ha descrito que la edelfosina inhibe la invasión celular en varios estudios *in vivo* e *in vitro*²¹⁹. Nuestros resultados muestran que la edelfosina inhibe la invasión de matrigel en un ensayo con las células MDA-MB-231 a las concentraciones de 5 y 10 μ M sin afectar a la viabilidad, mientras que la inhibición a la concentración de 20 μ M implica la pérdida de un 21 % de viabilidad y en este último caso, no podemos descartar un efecto de la muerte celular sobre la inhibición de la invasión. Sin embargo, la inhibición de la invasión a concentraciones que no afectan a la viabilidad sugiere que la edelfosina disminuye la capacidad de las células tumorales para degradar el matrigel. Estos resultados podrían deberse a la inhibición de la actividad de enzimas proteolíticas como las descritas anteriormente y sería necesario estudiar la expresión de estas proteínas tras el tratamiento, o analizar su actividad con zimogramas.

La edelfosina inhibe la angiogénesis

La formación de vasos es crucial para el mantenimiento de los tumores, su diseminación y la formación de nuevas metástasis.²⁵⁸ En este sentido, la angiogénesis en los sitios de llegada de las células tumorales, es imprescindible para el crecimiento de los tumores secundarios y la colonización metastática. Por tanto, inhibir la angiogénesis en los sitios de metástasis sería clave para impedir la colonización y la progresión de la enfermedad.²⁵⁶

Ensayos de angiogénesis previos con la línea HMEC-1 (línea microvascular de células endoteliales), muestran la inhibición de la formación de túbulos con el tratamiento con edelfosina.²¹⁵ Otros estudios *in vivo*, muestran también una disminución de la neovascularización en ratas²²⁴.

Nuestros estudios muestran una disminución de la formación de redes y la longitud de los túbulos con las líneas endoteliales HUVEC y HBMEC. Estos resultados apoyan los resultados de estudios anteriores y sugieren que la edelfosina inhibe la angiogénesis sin afectar a la viabilidad de las células endoteliales. Una posible explicación la podemos buscar en los efectos de la edelfosina sobre las moléculas de adhesión celular, tal y como expusimos anteriormente. Un efecto del tratamiento sobre estas moléculas, por ejemplo sobre integrinas, podría disminuir la adhesión de las células endoteliales a la matriz de forma que éstas no pudiesen formar los túbulos correctamente.

Sección III: Estudio de la colonización metastática

La colonización metastática se define como el crecimiento de las células tumorales procedentes de un tumor primario en los sitios secundarios de metástasis hasta formar nuevos tumores.¹⁶⁴ Esta etapa supone la diseminación de la enfermedad y compromete la vida de los pacientes. En este sentido, teniendo en cuenta la importancia de la angiogénesis en la colonización metastática y los diversos estudios previos que indicaban un efecto antiangiogénico de la edelfosina,¹⁷⁶ quisimos ensayar el efecto del tratamiento con edelfosina en un estudio de colonización de órganos.

Para este estudio aprovechamos la generación, por el grupo de la Dra. Angels Sierra (IRO, Barcelona) de una línea altamente eficiente en la producción de metástasis pulmonares cuando era inyectada en la circulación como es la línea 435-Lung.²³⁹ Esta línea además tenía la ventaja de expresar GFP y el gen de la luciferasa, lo que permitía seguir la formación de metástasis de manera no invasiva a través de un sistema de detección de bioluminiscencia o BLI,²⁵⁹ o por fluorescencia gracias a la expresión de GFP.

Además de la línea 435-Lung, con tropismo hacia pulmón, se habían generado otras líneas procedentes igualmente de la línea MDA-MB-435 con tropismo hacia el cerebro, el hígado y huesos.²⁵⁹ Quisimos saber qué grado de sensibilidad a edelfosina tenían el grupo de sublíneas metastáticas y para ello realizamos un estudio de la viabilidad con Cristal Violeta.²⁷² En este ensayo, las células sin tratar y tratadas se lavan antes de teñirse con este colorante, y posteriormente se lisan y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro. La naturaleza del ensayo hace que las células que se han levantado de la placa sean eliminadas con los lavados en el experimento, obviándose del cálculo de la viabilidad. En este sentido, sabemos que las células tratadas con edelfosina se redondean y se levantan quedando en suspensión. Estas células no están necesariamente muertas en un principio

por lo que este ensayo podría subestimar la viabilidad celular. En este estudio, nuestros resultados muestran diferente grado de sensibilidad al tratamiento en función de la línea celular, siendo la 435-Lung la línea más resistente y la línea 435-Brain, la línea más sensible.

En el ensayo *in vivo*, las células 435-Lung se inyectaron en la vena de la cola por lo que el patrón de circulación hace que los pulmones sean el primer lecho que encuentren. Aún así, estas células han desarrollado mecanismos que les permiten crecer preferentemente en los pulmones frente a otras sublíneas con tropismo hacia otros órganos. Por tanto, además de las restricciones físicas de los capilares en los que quedan atrapados, las características de esta línea favorecen el crecimiento en pulmón preferentemente.²³⁹

En nuestro estudio, las células 435-Lung desarrollaron metástasis cerebrales además de metástasis pulmonares, observando una mayor diferencia entre los animales control y los tratados en el desarrollo de las metástasis cerebrales que las pulmonares. Este resultado, estaría en concordancia con los resultados de viabilidad observados en la línea 435-Brain frente a la línea 435-Lung. Esta diferencia podría reflejar una heterogeneidad en la línea 435-Lung procedente de la línea parental MDA-MB-435, de forma que coexistiesen todavía células con distintas características en esta línea. Una opción sería que una pequeña población mantuviera todavía características parentales que les permitiera colonizar distintos órganos o que, aún no hubiera adquirido las propiedades que restringiesen o fomentasen su crecimiento en pulmón como la mayoría de células 435-Lung. En este sentido, la diferencia entre la sensibilidad de las metástasis cerebrales y pulmonares sugiere una sensibilidad mayor a edelfosina de las células tumorales que han metastatizado a cerebro, que las que han metastatizado a pulmón.

Por otra parte, el diseño del experimento permitió que las células estuviesen ya en los sitios de metástasis cuando empezó el tratamiento. En este sentido, se calcula que pueden pasar horas desde que una célula entra en la circulación hasta que extravasa en el sitio de metástasis.²⁷³ Respecto al tratamiento, se necesitan unos 3 ó 4 días aproximadamente hasta que se alcanzan niveles óptimos de edelfosina en plasma desde que se empieza a tratar a los animales,¹⁷⁶ por lo que habrían pasado unos 8 días desde que las células se inyectaron hasta que el tratamiento empezó a actuar a la máxima concentración sobre el organismo. Dada esta sucesión temporal, la edelfosina empezó a actuar presumiblemente en las fases iniciales de la colonización metastática, sugiriendo que el tratamiento actuó sobre la proliferación de micrometástasis y los procesos de angiogénesis iniciales. En este sentido, los resultados de bioluminiscencia y los estudios histológicos apuntan a una inhibición de la colonización metastática con el tratamiento. Los resultados de inhibición *in*

vitro de la adhesión y migración celular en la línea 435-Lung, junto con los resultados de inhibición de la angiogénesis en células endoteliales sugieren que la edelfosina podría haber afectado estos procesos en el animal. Dado que estos procesos son fundamentales en el establecimiento de las metástasis y el crecimiento de nuevos tumores, podríamos considerar la suma de todos estos efectos como la causa de la inhibición metastática observada en el estudio *in vivo*, y en consecuencia del efecto drástico sobre la supervivencia de los animales.

Finalmente, dado que no se produjo disminución del peso de los animales ni síntomas adversos en el comportamiento y, no se encontraron alteraciones en el estudio histológico realizado en ambos grupos, podemos concluir que el tratamiento con edelfosina no causó toxicidad de importancia tal y como se ha reportado en diferentes estudios en la literatura.¹⁷⁶

Capítulo 6:

CONCLUSIONES

1. La edelfosina presenta actividad antitumoral en líneas celulares humanas de cáncer de mama.
2. La edelfosina induce muerte celular regulada independientemente del subtipo molecular de cáncer de mama, encontrándose líneas celulares sensibles en todos los subtipos.
3. La muerte celular inducida por edelfosina implica distintos tipos de muerte celular que podrían darse en paralelo. La inducción de autofagia en las líneas resistentes parece jugar un papel de resistencia al tratamiento.
4. La sensibilidad a edelfosina no depende de la activación oncogénica mediada por AKT . Sin embargo, la edelfosina induce una inhibición de la fosforilación de AKT de forma generalizada.
5. El tratamiento con edelfosina no induce daño en el DNA.
6. La edelfosina inhibe los procesos esenciales en el fenotipo metastático como son la adhesión celular, la migración y la invasión, además de la angiogénesis. Además, el tratamiento con edelfosina es efectivo inhibiendo la colonización metastática.

Bibliografía

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Torre, L. A. *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* (2015). doi:10.3322/caac.21262
4. Ferlay J, S. I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. (2013). at <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>
5. Coleman, M. P. *et al.*, CONCORD Working Group. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* **9**, 730–756 (2008).
6. Shah, R., Rosso, K. & Nathanson, S. D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 283–298 (2014).
7. Berrington de Gonzalez, A. *et al.* Second solid cancers after radiotherapy for breast cancer in SEER cancer registries. *Br. J. Cancer* **102**, 220–226 (2010).
8. Hartmann, L. C. *et al.* Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 229–237 (2005).
9. Dupont, W. D. *et al.* Breast cancer risk associated with proliferative breast disease and atypical hyperplasia. *Cancer* **71**, 1258–1265 (1993).
10. Colditz, G. A., Kaphingst, K. A., Hankinson, S. E. & Rosner, B. Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 1097–1104 (2012).
11. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* **358**, 1389–1399 (2001).
12. Lalloo, F. & Evans, D. G. Familial Breast Cancer. *Clin. Genet.* **82**, 105–114 (2012).
13. Buckland, G. *et al.* Adherence to the mediterranean diet and risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort study. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*

132, 2918–2927 (2013).

14. Chlebowski, R. T. Nutrition and physical activity influence on breast cancer incidence and outcome. *Breast Edinb. Scotl.* **22 Suppl 2**, S30–37 (2013).
15. Sobin, L. H. TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. *Semin. Surg. Oncol.* **21**, 19–22 (2003).
16. Escobar, P. F., Patrick, R. J., Rybicki, L. A., Weng, D. E. & Crowe, J. P. The 2003 Revised TNM Staging System for Breast Cancer: Results of Stage Re-classification on Survival and Future Comparisons among Stage Groups. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 143–147 (2006).
17. Rakha, E. A. *et al.*, others. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* **12**, 207 (2010).
18. Althuis, M. D. *et al.* Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **13**, 1558–1568 (2004).
19. Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 631–643 (2009).
20. De Abreu, F. B., Wells, W. A. & Tsongalis, G. J. The Emerging Role of the Molecular Diagnostics Laboratory in Breast Cancer Personalized Medicine. *Am. J. Pathol.* **183**, 1075–1083 (2013).
21. Onitilo, A. A., Engel, J. M., Greenlee, R. T. & Mukesh, B. N. Breast Cancer Subtypes Based on ER/PR and Her2 Expression: Comparison of Clinicopathologic Features and Survival. *Clin. Med. Res.* **7**, 4–13 (2009).
22. Dowsett, M. *et al.* Relationship Between Quantitative Estrogen and Progesterone Receptor Expression and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2) Status With Recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination Trial. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1059–1065 (2008).
23. Viale, G. *et al.*, others. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. *J. Clin. Oncol.* **25**, 3846–3852 (2007).
24. Slamon, D. *et al.* Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1273–1283 (2011).
25. Fornaro, L. *et al.* Anti-HER agents in gastric cancer: from bench to bedside. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **8**, 369–383 (2011).
26. Kittaneh, M., Montero, A. J. & Glück, S. Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Biomark. Cancer* **5**, 61–70 (2013).
27. Li, C. I., Uribe, D. J. & Daling, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br. J. Cancer* **93**, 1046–1052 (2005).
28. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
29. Sørlie, T. *et al.*, others. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor

- subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10869–10874 (2001).
30. Carey, L. A. Through a glass darkly: advances in understanding breast cancer biology, 2000–2010. *Clin. Breast Cancer* **10**, 188–195 (2010).
 31. Albain, K. S. *et al.*, with Goldhirsch, A. *et al.*, Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **24**, 2206–2223 (2013).
 32. Kennecke, H. *et al.* Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28**, 3271–3277 (2010).
 33. Polyak, K. & Metzger Filho, O. SnapShot: Breast Cancer. *Cancer Cell* **22**, 562–562.e1 (2012).
 34. Ades, F. *et al.* Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 2794–2803 (2014).
 35. Creighton, C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biol. Targets Ther.* **6**, 289–297 (2012).
 36. Hu, Z. *et al.* The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* **7**, 96 (2006).
 37. Gutierrez, C. & Schiff, R. HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**, 55–62 (2011).
 38. Moasser, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* **26**, 6469–6487 (2007).
 39. Sørlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 8418–8423 (2003).
 40. Reis-Filho, J. S. & Tutt, A. N. J. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* **52**, 108–118 (2008).
 41. Anders, C. K. & Carey, L. A. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **9**, S73–S81 (2009).
 42. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121**, 2750–2767 (2011).
 43. Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* **12**, R68 (2010).
 44. Morrow, M. Personalizing extent of breast cancer surgery according to molecular subtypes. *Breast Edinb. Scotl.* **22 Suppl 2**, S106–109 (2013).
 45. Kiess, A. P. *et al.* Adjuvant trastuzumab reduces locoregional recurrence in women who receive breast-conservation therapy for lymph node-negative, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Cancer* **118**, 1982–1988 (2012).
 46. Wood, W. C. Close/positive margins after breast-conserving therapy: additional resection or no resection? *Breast Edinb. Scotl.* **22 Suppl 2**, S115–117 (2013).
 47. Nijenhuis, M. V. & Rutgers, E. J. T. Who should not undergo breast conservation? *Breast*

Edinb. Scotl. **22 Suppl 2**, S110–114 (2013).

48. Galimberti, V. *et al.*, International Breast Cancer Study Group Trial 23-01 investigators. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **14**, 297–305 (2013).
49. Ozyigit, G. & Gultekin, M. Current role of modern radiotherapy techniques in the management of breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 425–439 (2014).
50. Hubenak, J. R., Zhang, Q., Branch, C. D. & Kronowitz, S. J. Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plast. Reconstr. Surg.* **133**, 49e–56e (2014).
51. Lomax, M. E., Folkes, L. K. & O'Neill, P. Biological Consequences of Radiation-induced DNA Damage: Relevance to Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **25**, 578–585 (2013).
52. Jonathan, E. C., Bernhard, E. J. & McKenna, W. G. How does radiation kill cells? *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 77–83 (1999).
53. Clarke, M. *et al.*, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **366**, 2087–2106 (2005).
54. Haviland, J. S. *et al.*, START Trialists' Group. The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised controlled trials. *Lancet Oncol.* **14**, 1086–1094 (2013).
55. Whelan, T. J. *et al.* Long-term results of hypofractionated radiation therapy for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **362**, 513–520 (2010).
56. Orecchia, R. & Leonardi, M. C. Partial breast irradiation: targeting volume or breast molecular subtypes? *Breast Edinb. Scotl.* **22 Suppl 2**, S137–140 (2013).
57. Smith, B. D. *et al.* Accelerated partial breast irradiation consensus statement from the American Society for Radiation Oncology (ASTRO). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **74**, 987–1001 (2009).
58. Polgár, C. *et al.*, GEC-ESTRO breast cancer working group. Patient selection for accelerated partial-breast irradiation (APBI) after breast-conserving surgery: recommendations of the Groupe Européen de Curiothérapie-European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (GEC-ESTRO) breast cancer working group based on clinical evidence (2009). *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.* **94**, 264–273 (2010).
59. Sedlmayer, F., Zehentmayr, F. & Fastner, G. Partial breast re-irradiation for local recurrence of breast carcinoma: Benefit and long term side effects. *The Breast* **22**, S141–S146 (2013).
60. Pietras, R. J. Biologic Basis of Sequential and Combination Therapies for Hormone-Responsive Breast Cancer. *The Oncologist* **11**, 704–717 (2006).
61. Johnston, S. R. D. & Dowsett, M. Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 821–831 (2003).
62. Osborne, C. K., Wakeling, A. & Nicholson, R. I. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist

- with a novel mechanism of action. *Br. J. Cancer* **90**, S2–S6 (2004).
63. Ellis, M. Overcoming endocrine therapy resistance by signal transduction inhibition. *The Oncologist* **9 Suppl 3**, 20–26 (2004).
64. Kurebayashi, J. Endocrine-resistant breast cancer: underlying mechanisms and strategies for overcoming resistance. *Breast Cancer Tokyo Jpn.* **10**, 112–119 (2003).
65. Citri, A. & Yarden, Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 505–516 (2006).
66. *Holland-Frei Cancer Medicine*. (BC Decker, 2003).
67. Azim, H. A., Azambuja, E. de, Colozza, M., Bines, J. & Piccart, M. J. Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Ann. Oncol.* mdq683 (2011). doi:10.1093/annonc/mdq683
68. Peto, R. *et al.* with Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet* **379**, 432–444 (2012).
69. Turner, N. *et al.* The continued evidence from overviews: what is the clinical utility? *Breast Edinb. Scotl.* **22 Suppl 2**, S8–11 (2013).
70. Ernst, B. & Anderson, K. S. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* **17**, 1–10 (2015).
71. Shumway, N. M., Ibrahim, N., Ponniah, S., Peoples, G. E. & Murray, J. L. Therapeutic breast cancer vaccines: a new strategy for early-stage disease. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* **23**, 277–287 (2009).
72. Schneble, E. J. *et al.* The HER2 peptide nelipepimut-S (E75) vaccine (NeuVax™) in breast cancer patients at risk for recurrence: correlation of immunologic data with clinical response. *Immunotherapy* **6**, 519–531 (2014).
73. Antonarakis, E. S. & Carducci, M. A. Combining low-dose cyclophosphamide with GM-CSF-secreting prostate cancer immunotherapy enhances antitumor immune effects. *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 311–314 (2010).
74. Breast Cancer. *Cancer Research Institute* at <<http://cancerresearch.org/cancer-immunotherapy/impacting-all-cancers/breast-cancer>>
75. Disis, M. L. *et al.* Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 4685–4692 (2009).
76. Peoples, G. E. *et al.* Vaccine implications of folate binding protein, a novel cytotoxic T lymphocyte-recognized antigen system in epithelial cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **5**, 4214–4223 (1999).
77. Postow, M. A., Callahan, M. K. & Wolchok, J. D. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* (2015). doi:10.1200/JCO.2014.59.4358
78. Soliman, H. H. *et al.* A first in man phase I trial of the oral immunomodulator, indoximod, combined with docetaxel in patients with metastatic solid tumors. *Oncotarget* **5**, 8136–8146 (2014).

79. Curti, B. D. *et al.* OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res.* **73**, 7189–7198 (2013).
80. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–264 (2012).
81. Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 666–675 (2003).
82. Bendell, J. *et al.* Phase I/II study of the antibody-drug conjugate glembatumumab vedotin in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 3619–3625 (2014).
83. Amos, S. M. *et al.* Autoimmunity associated with immunotherapy of cancer. *Blood* **118**, 499–509 (2011).
84. Emens, L. A., Reilly, R. T. & Jaffee, E. M. Augmenting the potency of breast cancer vaccines: combined modality immunotherapy. *Breast Dis.* **20**, 13–24 (2004).
85. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
86. Partridge, A. H., Burstein, H. J. & Winer, E. P. Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in Women With Early-Stage Breast Cancer. *JNCI Monogr.* **2001**, 135–142 (2001).
87. Singal, P. K. & Iliskovic, N. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **339**, 900–905 (1998).
88. Xue, J. *et al.* Risk of Trastuzumab-Related Cardiotoxicity in Early Breast Cancer Patients: A Prospective Observational Study. *J. Breast Cancer* **17**, 363–369 (2014).
89. Schagen, S. B. *et al.* Cognitive deficits after postoperative adjuvant chemotherapy for breast carcinoma. *Cancer* **85**, 640–650 (1999).
90. Curtis, R. E. *et al.* Risk of Leukemia after Chemotherapy and Radiation Treatment for Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **326**, 1745–1751 (1992).
91. Godley, L. A. & Larson, R. A. Therapy-related myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* **35**, 418–429 (2008).
92. Osborne, C. K. & Schiff, R. Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1616–1622 (2005).
93. Yager, J. D. & Davidson, N. E. Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **354**, 270–282 (2006).
94. Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 631–643 (2009).
95. Arpino, G., Wiechmann, L., Osborne, C. K. & Schiff, R. Crosstalk between the Estrogen Receptor and the HER Tyrosine Kinase Receptor Family: Molecular Mechanism and Clinical Implications for Endocrine Therapy Resistance. *Endocr. Rev.* **29**, 217–233 (2008).

96. Dowsett, M. *et al.* Growth factor signalling and response to endocrine therapy: the Royal Marsden Experience. *Endocr. Relat. Cancer* **12 Suppl 1**, S113–117 (2005).
97. Yarden, R. I., Wilson, M. A. & Chrysogelos, S. A. Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: a possible mechanism to modulate growth. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **Suppl 36**, 232–246 (2001).
98. Dillon, R. L., White, D. E. & Muller, W. J. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* **26**, 1338–1345 (2007).
99. Kaufman, B. *et al.* Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5529–5537 (2009).
100. Huober, J. *et al.* Higher efficacy of letrozole in combination with trastuzumab compared to letrozole monotherapy as first-line treatment in patients with HER2-positive, hormone-receptor-positive metastatic breast cancer – Results of the eLEcTRA trial. *The Breast* **21**, 27–33 (2012).
101. Johnston, S. *et al.* Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 5538–5546 (2009).
102. Milani, A., Geuna, E., Mittica, G. & Valabrega, G. Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer: Current evidence and future directions. *World J. Clin. Oncol.* **5**, 990–1001 (2014).
103. Osborne, C. K. *et al.* Gefitinib or placebo in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive metastatic breast cancer: a randomized phase II study. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **17**, 1147–1159 (2011).
104. Bachelot, T. *et al.* Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **30**, 2718–2724 (2012).
105. Baselga, J. *et al.* Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 520–529 (2012).
106. Piccart, M. *et al.* Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2. *Ann. Oncol.* mdu456 (2014). doi:10.1093/annonc/mdu456
107. Wolff, A. C. *et al.* Randomized phase III placebo-controlled trial of letrozole plus oral temsirolimus as first-line endocrine therapy in postmenopausal women with locally advanced or metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **31**, 195–202 (2013).
108. Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20**,

719–726 (2002).

109. Romond, E. H. *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1673–1684 (2005).
110. Nahta, R., Yu, D., Hung, M.-C., Hortobagyi, G. N. & Esteva, F. J. Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **3**, 269–280 (2006).
111. Rexer, B. N. & Arteaga, C. L. Intrinsic and Acquired Resistance to HER2-Targeted Therapies in HER2 Gene-Amplified Breast Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. *Crit. Rev. Oncog.* **17**, 1–16 (2012).
112. Cortes, J. & Baselga, J. Targeting the microtubules in breast cancer beyond taxanes: the epothilones. *The Oncologist* **12**, 271–280 (2007).
113. Lee, J. J. & Swain, S. M. Development of novel chemotherapeutic agents to evade the mechanisms of multidrug resistance (MDR). *Semin. Oncol.* **32**, S22–26 (2005).
114. Kaufman, P. A. *et al.* Phase III Open-Label Randomized Study of Eribulin Mesylate Versus Capecitabine in Patients With Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer Previously Treated With an Anthracycline and a Taxane. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 594–601 (2015).
115. Sládek, N. E., Kollander, R., Sreerama, L. & Kiang, D. T. Cellular levels of aldehyde dehydrogenases (ALDH1A1 and ALDH3A1) as predictors of therapeutic responses to cyclophosphamide-based chemotherapy of breast cancer: a retrospective study. Rational individualization of oxazaphosphorine-based cancer chemotherapeutic regimens. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **49**, 309–321 (2002).
116. Bedard, P. L., Di Leo, A. & Piccart-Gebhart, M. J. Taxanes: optimizing adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 22–36 (2010).
117. Zhou, J. & Giannakakou, P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **5**, 65–71 (2005).
118. Drukman, S. & Kavallaris, M. Microtubule alterations and resistance to tubulin-binding agents (review). *Int. J. Oncol.* **21**, 621–628 (2002).
119. Paradiso, A. *et al.* Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **16 Suppl 4**, iv14–19 (2005).
120. Fedier, A. *et al.* Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **93**, 571–576 (2001).
121. Andersson, J. *et al.* Worse survival for TP53 (p53)-mutated breast cancer patients receiving adjuvant CMF. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **16**, 743–748 (2005).
122. Lizard-Nacol, S. *et al.* MDR1 and thymidylate synthase (TS) gene expressions in advanced breast cancer: relationships to drug exposure, p53 mutations, and clinical outcome of the patients. *Anticancer Res.* **19**, 3575–3581 (1999).
123. Trock, B. J., Leonessa, F. & Clarke, R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis

- of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 917–931 (1997).
124. Borst, P., Evers, R., Kool, M. & Wijnholds, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1295–1302 (2000).
125. Filipits, M. *et al.* Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **23**, 1161–1168 (2005).
126. Doyle, L. A. & Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **22**, 7340–7358 (2003).
127. Batista, N. *et al.* Phase II study of capecitabine in combination with paclitaxel in patients with anthracycline-pretreated advanced/metastatic breast cancer. *Br. J. Cancer* **90**, 1740–1746 (2004).
128. Thomas, E. S. *et al.* Ixabepilone plus capecitabine for metastatic breast cancer progressing after anthracycline and taxane treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 5210–5217 (2007).
129. Yardley, D. A. Drug Resistance and the Role of Combination Chemotherapy in Improving Patient Outcomes. *Int. J. Breast Cancer* **2013**, e137414 (2013).
130. Geyer, C. E. *et al.* Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2733–2743 (2006).
131. André, F. & Zielinski, C. C. Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Ann. Oncol.* **23**, vi46–vi51 (2012).
132. André, F. & Zielinski, C. C. Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. *Ann. Oncol.* **23**, vi46–vi51 (2012).
133. Récamier, J. C. A. *Recherches sur le traitement du cancer: par la compression méthodique simple ou combinée, et sur l'histoire générale de la même maladie ...* (Gabon, 1829).
134. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
135. Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res.* **70**, 5649–5669 (2010).
136. Gupta, G. P. & Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* **127**, 679–695 (2006).
137. Cardoso, F., Harbeck, N., Fallowfield, L., Kyriakides, S. & Senkus, E. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **23**, vii11–vii19 (2012).
138. Langley, R. R. & Fidler, I. J. The seed and soil hypothesis revisited - the role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **128**, 2527–2535 (2011).
139. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* **147**, 275–292 (2011).

140. Liotta, L. A. & Stetler-Stevenson, W. G. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res.* **51**, 5054s–5059s (1991).
141. Liotta, L. A., Rao, C. N. & Barsky, S. H. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **49**, 636–649 (1983).
142. Friedl, P. & Wolf, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 362–374 (2003).
143. Kawauchi, T. Cell Adhesion and Its Endocytic Regulation in Cell Migration during Neural Development and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 4564–4590 (2012).
144. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 417–427 (2011).
145. Giampieri, S. *et al.* Localized and reversible TGFbeta signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1287–1296 (2009).
146. Wyckoff, J. B. *et al.* Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res.* **67**, 2649–2656 (2007).
147. Meng, S. *et al.* Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10**, 8152–8162 (2004).
148. Joyce, J. A. & Pollard, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 239–252 (2009).
149. Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massagué, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 274–284 (2009).
150. Müller, A. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50–56 (2001).
151. Kang, Y. *et al.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**, 537–549 (2003).
152. Minn, A. J. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**, 518–524 (2005).
153. Bos, P. D. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* **459**, 1005–1009 (2009).
154. Tabariès, S. *et al.* Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes. *Oncogene* **30**, 1318–1328 (2011).
155. Brown, D. M. & Ruoslahti, E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell* **5**, 365–374 (2004).
156. Gupta, G. P. *et al.* Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* **446**, 765–770 (2007).
157. Padua, D. *et al.* TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* **133**, 66–77 (2008).
158. Qian, B.-Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour

metastasis. *Nature* **475**, 222–225 (2011).

159. Weis, S., Cui, J., Barnes, L. & Cheresch, D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J. Cell Biol.* **167**, 223–229 (2004).

160. Barkan, D. *et al.* Inhibition of metastatic outgrowth from single dormant tumor cells by targeting the cytoskeleton. *Cancer Res.* **68**, 6241–6250 (2008).

161. Shibue, T. & Weinberg, R. A. Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10290–10295 (2009).

162. Hiratsuka, S. *et al.* C-X-C receptor type 4 promotes metastasis by activating p38 mitogen-activated protein kinase in myeloid differentiation antigen (Gr-1)-positive cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 302–307 (2011).

163. McAllister, S. S. *et al.* Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. *Cell* **133**, 994–1005 (2008).

164. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 563–572 (2002).

165. Mazziere, R. *et al.* Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell* **19**, 512–526 (2011).

166. Eckhardt, B. L., Francis, P. A., Parker, B. S. & Anderson, R. L. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 479–497 (2012).

167. Galluzzi, L. *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* **22**, 58–73 (2015).

168. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**, 107–120 (2012).

169. Overholtzer, M. *et al.* A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* **131**, 966–979 (2007).

170. Denton, D. *et al.* Relationship between growth arrest and autophagy in midgut programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* **19**, 1299–1307 (2012).

171. Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 860–875 (2012).

172. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010).

173. Scheller, C. *et al.* Caspase inhibition in apoptotic T cells triggers necrotic cell death depending on the cell type and the proapoptotic stimulus. *J. Cell. Biochem.* **97**, 1350–1361 (2006).

174. Wolf, B. B. *et al.* Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood* **94**, 1683–1692 (1999).

175. Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J. & Kroemer, G. Cell death assays for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 221–237 (2011).
176. Gajate, C. & Mollinedo, F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr. Drug Metab.* **3**, 491–525 (2002).
177. Mollinedo, F. Editorial (Thematic Issue: Antitumor Alkylphospholipid Analogs: A Promising and Growing Family of Synthetic Cell Membrane-Targeting Molecules for Cancer Treatment). *Anti-Cancer Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* **14**, 495–498 (2014).
178. Varela-M, R. E. *et al.* In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against Leishmania spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1612 (2012).
179. Van Blitterswijk, W. J., Hilkmann, H. & Storme, G. A. Accumulation of an alkyl lysophospholipid in tumor cell membranes affects membrane fluidity and tumor cell invasion. *Lipids* **22**, 820–823 (1987).
180. Babina, I., Donatello, S., Nabi, I. & Hopkins, A. Lipid Rafts as Master Regulators of Breast Cancer Cell Function. *Surg. Artic.* (2011). at <<http://epubs.rcsi.ie/surgart/10>>
181. Mollinedo, F. & Gajate, C., others. Lipid rafts, cholesterol and apoptosis in cancer and neurodegenerative diseases. (2012). at <<http://digital.csic.es/handle/10261/82750>>
182. Nosedá, A., Godwin, P. L. & Modest, E. J. Effects of antineoplastic ether lipids on model and biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **945**, 92–100 (1988).
183. Boggs, K. P., Rock, C. O. & Jackowski, S. Lysophosphatidylcholine and 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine inhibit the CDP-choline pathway of phosphatidylcholine synthesis at the CTP:phosphocholine cytidyltransferase step. *J. Biol. Chem.* **270**, 7757–7764 (1995).
184. Gajate, C. *et al.* Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene* **31**, 2627–2639 (2012).
185. Van der Sanden, M. H. M., Houweling, M., van Golde, L. M. G. & Vaandrager, A. B. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis induces expression of the endoplasmic reticulum stress and apoptosis-related protein CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP/GADD153). *Biochem. J.* **369**, 643–650 (2003).
186. Helfman, D. M. *et al.* Phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein phosphorylation system in various types of leukemic cells from human patients and in human leukemic cell lines HL60 and K562, and its inhibition by alkyl-lysophospholipid. *Cancer Res.* **43**, 2955–2961 (1983).
187. Teicher, B. A. Protein kinase C as a therapeutic target. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **12**, 5336–5345 (2006).
188. Powis, G. *et al.* Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. *Cancer Res.* **52**, 2835–2840 (1992).
189. Seewald, M. J. *et al.* Inhibition of growth factor-dependent inositol phosphate Ca²⁺ signaling by antitumor ether lipid analogues. *Cancer Res.* **50**, 4458–4463 (1990).

190. Zhou, X. *et al.* 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine inhibits the transduction of growth signals via the MAPK cascade in cultured MCF-7 cells. *J. Clin. Invest.* **98**, 937–944 (1996).
191. Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J. & Verheij, M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer. Drugs* **14**, 167–173 (2003).
192. Richardson, P. G., Eng, C., Kolesar, J., Hideshima, T. & Anderson, K. C. Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **8**, 623–633 (2012).
193. Reis-Sobreiro, M. *et al.* Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J.* **3**, e118 (2013).
194. Nieto-Miguel, T. *et al.* Endoplasmic Reticulum Stress in the Proapoptotic Action of Edelfosine in Solid Tumor Cells. *Cancer Res.* **67**, 10368–10378 (2007).
195. Gajate, C. *et al.* Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int. J. Cancer* **85**, 674–682 (2000).
196. Gajate, C. *et al.* Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH(3)-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **86**, 208–218 (2000).
197. Mollinedo, F. *et al.* Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH3 (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res.* **57**, 1320–1328 (1997).
198. Gajate, C. Intracellular Triggering of Fas Aggregation and Recruitment of Apoptotic Molecules into Fas-enriched Rafts in Selective Tumor Cell Apoptosis. *J. Exp. Med.* **200**, 353–365 (2004).
199. Mollinedo, F. *et al.* In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **16**, 2046–2054 (2010).
200. Tsutsumi, T., Tokumura, A. & Kitazawa, S. Undifferentiated HL-60 cells internalize an antitumor alkyl ether phospholipid more rapidly than resistant K562 cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1390**, 73–84 (1998).
201. Cabaner, C. *et al.* Induction of apoptosis in human mitogen-activated peripheral blood T-lymphocytes by the ether phospholipid ET-18-OCH3: Involvement of the Fas receptor/ligand system. *Br. J. Pharmacol.* **127**, 813–825 (1999).
202. Ausili, A. *et al.* Edelfosine is incorporated into rafts and alters their organization. *J. Phys. Chem. B* **112**, 11643–11654 (2008).
203. Li, Y. C., Park, M. J., Ye, S.-K., Kim, C.-W. & Kim, Y.-N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am. J. Pathol.* **168**, 1107–1118; quiz 1404–1405 (2006).
204. Freeman, M. R. & Solomon, K. R. Cholesterol and prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* **91**, 54–

69 (2004).

205. Duncan, R. E., El-Sohehy, A. & Archer, M. C. Mevalonate promotes the growth of tumors derived from human cancer cells in vivo and stimulates proliferation in vitro with enhanced cyclin-dependent kinase-2 activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 33079–33084 (2004).
206. Elhyany, S. *et al.* The integrity of cholesterol-enriched microdomains is essential for the constitutive high activity of protein kinase B in tumour cells. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 837–839 (2004).
207. Ravacci, G. R. *et al.* Lipid raft disruption by docosahexaenoic acid induces apoptosis in transformed human mammary luminal epithelial cells harboring HER-2 overexpression. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 505–515 (2013).
208. Sachdev, D., Singh, R., Fujita-Yamaguchi, Y. & Yee, D. Down-regulation of insulin receptor by antibodies against the type I insulin-like growth factor receptor: implications for anti-insulin-like growth factor therapy in breast cancer. *Cancer Res.* **66**, 2391–2402 (2006).
209. Hitosugi, T., Sato, M., Sasaki, K. & Umezawa, Y. Lipid raft specific knockdown of SRC family kinase activity inhibits cell adhesion and cell cycle progression of breast cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 8139–8148 (2007).
210. Yamaguchi, H. *et al.* Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res.* **69**, 8594–8602 (2009).
211. Patra, S. K. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1785**, 182–206 (2008).
212. Schabath, H., Runz, S., Joumaa, S. & Altevogt, P. CD24 affects CXCR4 function in pre-B lymphocytes and breast carcinoma cells. *J. Cell Sci.* **119**, 314–325 (2006).
213. Bourguignon, L. Y. W. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* **18**, 251–259 (2008).
214. Mollinedo, F. *et al.* Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **329**, 439–449 (2009).
215. Candal, F. J., Bosse, D. C., Vogler, W. R. & Ades, E. W. Inhibition of induced angiogenesis in a human microvascular endothelial cell line by ET-18-OCH₃. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **34**, 175–178 (1994).
216. Murai, T. *et al.* Low Cholesterol Triggers Membrane Microdomain-dependent CD44 Shedding and Suppresses Tumor Cell Migration. *J. Biol. Chem.* **286**, 1999–2007 (2011).
217. Boggs, K. P., Rock, C. O. & Jackowski, S. Lysophosphatidylcholine attenuates the cytotoxic effects of the antineoplastic phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *J. Biol. Chem.* **270**, 11612–11618 (1995).
218. Van Blitterswijk, W. J., Hilkmann, H. & Storme, G. A. Accumulation of an alkyl lysophospholipid in tumor cell membranes affects membrane fluidity and tumor cell invasion. *Lipids* **22**, 820–823 (1987).

219. Van Slambrouck, S. & FA Steelant, W. 1-O-Octadecyl-2-O-Methylglycero-3-phosphocholine (Edelfosine) and Cancer Cell Invasion: A Short Review. *Anti-Cancer Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* **14**, 539–544 (2014).
220. Engebraaten, O., Bjerkvig, R. & Berens, M. E. Effect of alkyl-lysophospholipid on glioblastoma cell invasion into fetal rat brain tissue in vitro. *Cancer Res.* **51**, 1713–1719 (1991).
221. Slaton, J. W., Hampton, J. A. & Selman, S. H. Exposure to alkyllysophospholipids inhibits in vitro invasion of transitional cell carcinoma. *J. Urol.* **152**, 1594–1598 (1994).
222. Steelant, W. F. *et al.* Alkyl-lysophospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycerophosphocholine induces invasion through episialin-mediated neutralization of E-cadherin in human mammary MCF-7 cells in vitro. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **92**, 527–536 (2001).
223. Taraboletti, G. *et al.* The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **14**, 1674–1676 (2000).
224. Vogler, W. R., Liu, J., Volpert, O., Ades, E. W. & Bouck, N. The anticancer drug edelfosine is a potent inhibitor of neovascularization in vivo. *Cancer Invest.* **16**, 549–553 (1998).
225. Andrade, S. P., Vieira, L. B., Bakhle, Y. S. & Piper, P. J. Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse. *Int. J. Exp. Pathol.* **73**, 503–513 (1992).
226. Berdel, W. E., Fink, U. & Rastetter, J. Clinical phase I pilot study of the alkyl lysophospholipid derivative ET-18-OCH₃. *Lipids* **22**, 967–969 (1987).
227. Drings, P. *et al.* Final Evaluation of a Phase II Study on the Effect of Edelfosine (an Ether Lipid) in Advanced Non-Small-Cell Bronchogenic Carcinoma. *Oncol. Res. Treat.* **15**, 375–382 (1992).
228. Berdel, W. E., Fink, U., Maubach, P. A., Permanetter, B. & Rastetter, J. Response of acute myelomonocytic leukemia to alkyl-lysophospholipids. *Blut* **44**, 177–186 (1982).
229. Berdel, W. E., Bausert, W. R., Fink, U., Rastetter, J. & Munder, P. G. Anti-tumor action of alkyl-lysophospholipids (Review). *Anticancer Res.* **1**, 345–352 (1981).
230. Munder, P. G. & Westphal, O. Antitumoral and other biomedical activities of synthetic ether lysophospholipids. *Chem. Immunol.* **49**, 206–235 (1990).
231. Magistrelli, A. *et al.* Fate of 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (ET18-OME) in malignant cells, normal cells, and isolated and perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **23**, 113–118 (1995).
232. Servicio de Patología Molecular Comparada y Nodo Coordinador BEOCyL:: Centro de investigación del Cáncer - Comprehensive Cancer Center Research. at <<http://www.cicancer.org/es/servicio-de-patologia-molecular-comparada-y-nodo-coordinador-beocyl>>
233. Galluzzi, L. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* **16**, 1093–1107 (2009).
234. Neve, R. M. *et al.* A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct

- cancer subtypes. *Cancer Cell* **10**, 515–527 (2006).
235. Chavez, K. J., Garimella, S. V. & Lipkowitz, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* **32**, 35–48 (2010).
236. Kao, J. *et al.* Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS ONE* **4**, e6146 (2009).
237. Stresing, V. *et al.* Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene* **32**, 724–735 (2013).
238. Berghe, T. V. *et al.* Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* **17**, 922–930 (2010).
239. Stresing, V. *et al.* Peroxiredoxin 2 specifically regulates the oxidative and metabolic stress response of human metastatic breast cancer cells in lungs. *Oncogene* **32**, 724–735 (2013).
240. PubMed entry. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10542247>>
241. Gajate, C. & Mollinedo, F. Lipid rafts, endoplasmic reticulum and mitochondria in the antitumor action of the alkylphospholipid analog edelfosine. *Anti-Cancer Agents Med. Chem. Former. Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* **14**, 509–527 (2014).
242. Candé, C., Vahsen, N., Garrido, C. & Kroemer, G. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ.* **11**, 591–595 (2004).
243. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* **140**, 313–326 (2010).
244. Mizushima, N. & Yoshimori, T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545 (2007).
245. Frieboes, H. B., Huang, J. S., Yin, W. C. & McNally, L. R. Chloroquine-mediated cell death in metastatic pancreatic adenocarcinoma through inhibition of autophagy. *JOP J. Pancreas* **15**, 189–197 (2014).
246. Boya, P. *et al.* Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1025–1040 (2005).
247. Lodish, H. *et al.* Checkpoints in Cell-Cycle Regulation. (2000). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21719/>>
248. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Publ. Online 12 Dec. 2002 Doi101038sjcdd4401130* **9**, (2002).
249. Sharma, A., Singh, K. & Almasan, A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **920**, 613–626 (2012).
250. Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. & Taylor, S. S. The Spindle Assembly Checkpoint. *Curr. Biol.* **22**, R966–R980 (2012).
251. Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Anil Kumar, K. & Reddanna, P. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front. Oncol.* **3**, (2013).

252. Steeg, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med.* **12**, 895–904 (2006).
253. Conklin, M. W. & Keely, P. J. Why the stroma matters in breast cancer. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 249–260 (2012).
254. Kleinman, H. K., Koblinski, J., Lee, S. & Engbring, J. Role of basement membrane in tumor growth and metastasis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **10**, 329–338, ix (2001).
255. Roussos, E. T., Condeelis, J. S. & Patsialou, A. Chemotaxis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 573–587 (2011).
256. Nguyen, D. X., Bos, P. D. & Massagué, J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 274–284 (2009).
257. Lamalice, L., Boeuf, F. L. & Huot, J. Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circ. Res.* **100**, 782–794 (2007).
258. Tumor Angiogenesis and Metastasis — Correlation in Invasive Breast Carcinoma — NEJM. at <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199101033240101>>
259. Sierra, A. *et al.* Astrocyte-derived cytokines contribute to the metastatic brain specificity of breast cancer cells. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* **77**, 357–368 (1997).
260. Giloh, H. in *Flow Cytometry* (ed. Jacquemin-Sablon, A.) 65–101 (Springer Berlin Heidelberg, 1993). at <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-84616-8_5>
261. Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. & Kioussi, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **887**, 41–47 (2012).
262. Kelley, E. E., Modest, E. J. & Burns, C. P. Unidirectional membrane uptake of the ether lipid antineoplastic agent edelfosine by L1210 cells. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 2435–2439 (1993).
263. Kurz, E. U., Douglas, P. & Lees-Miller, S. P. Doxorubicin Activates ATM-dependent Phosphorylation of Multiple Downstream Targets in Part through the Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* **279**, 53272–53281 (2004).
264. King, M. T. *et al.* Failure to detect mutagenic effects of anti-tumor alkyl-lysophospholipids. *Cancer Lett.* **12**, 217–222 (1981).
265. Pushkareva, M. Y., Janoff, A. S. & Mayhew, E. Inhibition of cell division but not nuclear division by 1-O- octadecyl-2-O-methyl-Sn-glycero-3-phosphocholine. *Cell Biol. Int.* **23**, 817–828 (1999).
266. Piekny, A., Werner, M. & Glotzer, M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol.* **15**, 651–658 (2005).
267. Cytokinesis: A New Lipid Aboard the Raft: Current Biology. at <[http://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822\(08\)01112-3?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982208011123%3Fshowall%3Dtrue](http://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822(08)01112-3?_returnURL=http%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982208011123%3Fshowall%3Dtrue)>
268. Kreisberg, J. I. *et al.* Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical

outcome in prostate cancer. *Cancer Res.* **64**, 5232–5236 (2004).

269. Canel, M., Serrels, A., Frame, M. C. & Brunton, V. G. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J. Cell Sci.* **126**, 393–401 (2013).

270. Bendas, G. & Borsig, L. Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, e676731 (2012).

271. Ridley, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704–1709 (2003).

272. Chiba, K., Kawakami, K. & Tohyama, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicol. In Vitro* **12**, 251–258 (1998).

273. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. at
<<http://jcs.biologists.org/content/123/13/2332.abstract>>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1: Tasas de incidencia y mortalidad por tipo de cáncer en el mundo en hombres y en mujeres.	13
Figura I2: Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en el mundo.	14
Figura I3: Incidencia y mortalidad por cáncer de mama en países europeos.	15
Figura I4: Incidencia y mortalidad del cáncer de mama en España.	15
Figura I5: Grado histológico en cáncer de mama.	18
Figura I6: Principales vías de señales reguladas por los cuatro miembros de la familia HER, EGFR (HER1), HER2, HER3 y HER4.	20
Figura I7: Forma de actuación de distintos fármacos anti-HER2.	29
Figura I8: Los “checkpoints” o puntos de control de la respuesta inmune regulan la evolución de la respuesta inmunitaria.	33
Figura I9: Vías de señalización a través de las cuales, el receptor de estrógeno regula la transcripción génica.	36
Figura I10: Mecanismos de resistencia frente a la inhibición de HER2.	39
Figura I11: Curvas de supervivencia en un ensayo clínico fase 3 con pacientes de cáncer de mama metastático, previamente tratadas con antraciclinas y taxanos.	40
Figura I12: Representación de los pasos sucesivos en el crecimiento del tumor primario y posterior diseminación metastática.	43
Figura I13: Eventos seleccionados en la historia de la investigación sobre la metástasis tumoral (parte 1)	44
Figuras I14, I15 y I16: Eventos seleccionados en la historia de la investigación sobre la metástasis tumoral (parte 2, 3 y 4).	46
Figura I17: Representación de los distintos pasos en la cascada metastática.	46
Figura I18: Invasión mediada por transición epitelio-mesénquima (EMT) e invasión colectiva durante la metástasis tumoral.	47
Figura I19: Potenciales barreras a la metástasis en diferentes órganos diana.	49
Figura I20: Representación de los distintos modelos en ratón para estudiar las fases de la cascada metastática.	53

Figura I21: Representación esquemática de los tipos de muerte celular.	55
Figura I22: Representación de la apoptosis intrínseca y extrínseca.	58
Figura I23: Representación de la necroptosis.	60
Figura I24: Representación de la muerte celular autofágica.	60
Figura I25: Características moleculares de autofagia, apoptosis y necrosis.	61
Figura I26: Estructura química de varios alquilfosfolípidos.	63
Figura I27: Modelo para la señalización en los lipid rafts mediada por Akt durante el tratamiento con edelfosina.	65
Figura R1: Efecto de la edelfosina sobre la metabolización del MTT.	96
Figura R2: Efecto de la edelfosina sobre la permeabilidad de la membrana plasmática.	97
Figura R3: Efecto de la edelfosina sobre la permeabilidad de la membrana plasmática en el panel de líneas celulares.	100
Figura R4: Efecto de la edelfosina sobre la degradación de DNA en el panel de líneas celulares.	102
Figura R5: Imágenes de microscopía óptica en campo claro de distintas líneas tratadas con edelfosina.	103
Figura R6: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo <i>Luminal</i>.	105
Figura R7: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo <i>HER2</i>.	106
Figura R8: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo <i>Triple Negativo (claudin-low)</i>.	107
Figura R9: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo <i>Triple Negativo (claudin-low)</i> continuación.	108
Figura R10: Efecto de la edelfosina sobre el tamaño, complejidad y ciclo celular en el grupo <i>Triple Negativo (basal-like)</i>.	109
Figura R11: Efecto de la edelfosina sobre la fragmentación de las caspasas 3 y 7 en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.	110
Figura R12: Efecto de la edelfosina sobre la fragmentación de PARP-1.	111

Figura R13: Efecto del pretratamiento con el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk sobre la degradación del DNA inducida por edelfosina.	112
Figura R14: Efecto del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk sobre la permeabilidad de la membrana plasmática inducida por edelfosina.	113
Figura R15: Efecto del tratamiento con edelfosina sobre la distribución subcelular de AIF en células MCF-7.	114
Figura R16: Efecto de la edelfosina sobre la conversión de LC3.	115
Figura R17: Efecto de la edelfosina sobre la inducción de LC3-II en células MCF-7, en presencia y ausencia de cloroquina.	116
Figura R18: Efecto de los inhibidores lisosomales sobre la incorporación de iouduro de propidio tras el tratamiento con edelfosina.	118
Figura R19: Efecto de los inhibidores lisosomales sobre la degradación del DNA inducida por edelfosina.	118
Figura R20: Efecto de los inhibidores lisosomales sobre el efecto del tratamiento con edelfosina en las líneas resistentes.	119
Figura R21: Comparación del efecto de edelfosina sobre el ciclo celular en las líneas MCF-7 y MDA-MB-231.	120
Figura R22: Efecto de la edelfosina sobre el ciclo celular a lo largo del tiempo en las células MCF-7 y MDA-MB-231.	121
Figura R23: Efecto de la edelfosina sobre la expresión de p-CDK1 y CDK1 a lo largo del tiempo.	122
Figura R24: Efecto de la edelfosina y la doxorrubicina sobre la fosforilación de la proteína γH2AX.	123
Figura R25: Efecto de la edelfosina sobre la división nuclear.	124
Figura R26: Efecto de la edelfosina sobre la fosforilación de AKT en el residuo Ser 473.	125
Figura R27: Efecto de la edelfosina sobre la expresión de p-mTOR, mTOR, p-AKT y AKT.	126
Figura R28: Efecto de la edelfosina sobre la adhesión al colágeno y a la laminina en las líneas MDA-MB-231 y 435-Lung.	133
Figura R29: Efecto de la edelfosina sobre el cierre de la herida en las células MDA-MB-231 y 435-Lung.	135

Figura R30: Efecto de la edelfosina sobre la migración quimiotáctica en células MDA-MB-231 y 435-Lung.	137
Figura R31: Efecto de la edelfosina sobre la invasión celular en la línea MDA-MB-231.	138
Figura R32: Efecto de la edelfosina sobre la angiogénesis en la línea endotelial HBMEC.	140
Figura R33: Efecto de la edelfosina sobre la angiogénesis en la línea endotelial HUVEC.	140
Figura R34: Efecto de la edelfosina sobre viabilidad de la línea MDA-MB-435 y sus líneas derivadas.	145
Figura R35: Diseño experimental e imágenes de BLI a fin de experimento para cada ratona.	146
Figura R36: Ejemplo de regiones para la cuantificación de metástasis cerebrales y pulmonares.	147
Figura R37: Efecto de la edelfosina sobre las metástasis cerebrales y pulmonares.	148
Figura R38: Efecto de la edelfosina sobre la carga tumoral total y curvas de supervivencia Kaplan-Meier.	148
Figura R39: Control de pesos de las ratonas en el grupo control y tratado al inicio y fin del estudio.	149
Figura R40: Panorámica de la afectación pulmonar en animal del grupo control.	150
Figura R41: Detalles de las metástasis pulmonares de la figura 33.	151
Figura R42: Estructura histológica conservada representativa de los animales tratados sin metástasis y metástasis pulmonares en el animal número 6 del grupo de tratamiento.	153
Figura R43: Metástasis cerebrales representativas del grupo control y tejido cerebral sin metástasis representativo del grupo tratado. .	154
Figura R44: Expresión de Ki67, vimentina y CD31 en cortes histológicos de animales control.	155
Figura R45: Estructura hepática en animales control y tratados.	156

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I1: Sistema TNM de estadiaje en cáncer de mama	18
Tabla I2: Definición de los subtipos intrínsecos en cáncer de mama.	25
Tabla I3: Datos de pacientes con cáncer de mama triple negativo metastático.	42
Tabla I4: Clasificación funcional de los tipos de muerte celular regulada.	56
Tabla M1. Líneas celulares	78
Tabla M2. Lista de anticuerpos.	83
Tabla R1: Clasificación de las líneas de cáncer de mama utilizadas.	98
Tabla R2: Clasificación de las líneas celulares en función de su sensibilidad a edelfosina.	101
Tabla R3: Efecto del tratamiento con edelfosina sobre la morfología celular y el DNA.	104
Tabla R4: Efecto de la edelfosina sobre la expresión o fosforilación de AKT y/o mTOR.	127