

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA



**EFECTO ANTIPROLIFERANTE Y
ANTIFIBRÓTICO DE LA FLUVASTATINA EN
CÉLULAS DE TUMORES EPITELIALES:
IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS
ANTICANCEROSAS**

Rebeca Núñez Lozano

2011

MEMORIA PRESENTADA POR
REBECA NÚÑEZ LOZANO
PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE DOCTOR
POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Salamanca, a 22 de Diciembre de 2010

Fdo. Rebeca Núñez Lozano



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

DR. D. RAFAEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, elaborado por la Lda. Rebeca Núñez Lozano para optar al Grado de Doctor, con el título: “EFECTO ANTIPROLIFERANTE Y ANTIFIBRÓTICO DE LA FLUVASTATINA EN CÉLULAS DE TUMORES EPITELIALES: IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS ANTICANCEROSAS”, ha sido realizado bajo la dirección del Doctor D. José Miguel López Novoa y el Doctor D. Francisco J. López Hernández, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca, a 22 de Diciembre de 2010.

Fdo: Dr. Rafael Jiménez Fernández



**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

DR. D. JOSÉ MIGUEL LÓPEZ NOVOA, PROFESOR CATEDRÁTICO DE FISIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA Y EL DR. D. FRANCISCO LÓPEZ HERNÁNDEZ, CONTRATADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, titulado “EFECTO ANTIPROLIFERANTE Y ANTIFIBRÓTICO DE LA FLUVASTATINA EN CÉLULAS DE TUMORES EPITELIALES: IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS ANTICANCEROSAS” presentado por Dña. Rebeca Núñez Lozano para optar al Grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, y considero que cumple las condiciones necesarias, autorizando su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Salamanca, a 22 de Diciembre de 2010.

Fdo: Dr. José Miguel López Novoa

Fdo: Dr. Francisco J. López Hernández

• INTRODUCCIÓN	1
1. EL CÁNCER: ASPECTOS ETIOPATOGÉNICOS	1
1.1. Definición y tipos de cáncer	1
1.2. Epidemiología de los tumores sólidos	3
1.3. La célula cancerosa	5
2. TERAPÉUTICA ANTICANCEROSA ACTUAL	12
2.1. Prevención	12
2.2. Detección temprana	12
2.3. Tratamiento	13
3. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS	17
3.1. Descubrimiento de nuevos fármacos	18
3.2. Inmunoterapia antitumoral	18
3.3. Terapia génica	20
3.4. Farmacología dirigida	20
4. LA MATRIZ EXTRACELULAR TUMORAL COMO DIANA TERAPÉUTICA	22
4.1. La matriz extracelular	23
5. SUPERFAMILIA RAS. GTPASAS RHO	31
5.1. Modificaciones post-traduccionales de la familia Ras y Rho	33
5.2. Regulación de la actividad de las proteínas Rho	37
5.3. Importancia de Ras y Rho en carcinogénesis	38
5.4. Efectores de Rho y sus funciones en la transformación celular	40
6. FARMACOLOGÍA DE LAS ESTATINAS	43
6.1. Descripción química de las estatinas	43
6.2. Mecanismo de acción y utilidad terapéutica	43
6.3. Efecto antifibrótico	46

6.4. Efecto antitumoral: antiproliferante y proapoptósico	48
• OBJETIVOS	51
• MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. REACTIVOS MATERIALES Y EQUIPOS	55
1.1. Reactivos	55
1.2. Materiales y equipos	57
2. CULTIVO CELULAR	58
2.1. Manejo de las células	58
2.2. Conservación y reconstitución del cultivo: congelación y descongelación	58
2.3. Recuento del número de células	59
3. CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO	60
4. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR	64
4.1. Fundamento	64
4.2. Condiciones específicas de tratamiento	64
4.3. Procedimiento	65
5. ESTUDIOS DE VIABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR	65
5.1. Estudios de viabilidad celular	65
5.1.1. Fundamento	65
5.1.2. Condiciones específicas de tratamiento	65
5.1.3. Tinción con yoduro de propicio	66
5.2. Detección de ADN fragmentado en el citosol celular mediante ELISA	66
5.2.1. Fundamento	66
5.2.2. Condiciones específicas de tratamiento	67

5.2.3. Obtención de extractos celulares citosólicos	67
5.2.4. Cuantificación de la concentración de proteínas	67
5.2.5. ELISA	68
5.3. Detección de la fragmentación nuclear: tinción con Hoestch 33258	69
5.3.1. Fundamento	69
5.3.2. Procedimiento	70
6. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO	71
6.1. Fundamento	71
6.2. Condiciones específicas tratamiento	72
6.3. Procesado de las células	72
7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES POR RT-PCR	73
7.1. Fundamento	74
7.2. Condiciones específicas de tratamiento	74
7.3. Extracción del ácido ribonucleico (ARN) total	74
7.4. Medida de la concentración de ARN	75
7.5. <i>Retrotranscripción</i> (ARNm \rightarrow ADNc)	76
7.6. Determinación de la concentración de ADNc	76
7.7. PCR (amplificación de secuencias específicas de ADNc)	77
7.8. Electroforesis en gel de agarosa	79
8. ESTUDIO DE LA PRENILACIÓN DE RHO Y RAS	79
8.1. Fundamento	79
8.2. Condiciones específicas de tratamiento	80
8.3. Separación con Tritón X-114	80
9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	81
9.1. Fundamento	81
9.2. Condiciones específicas de tratamiento	82

9.3. Electroforesis y transferencia	82
9.4. Incubación con los anticuerpos	83
10. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RHOA (RHOA-GTP)	85
10.1. Fundamento	85
10.2. Condiciones específicas de tratamiento	87
10.3. Obtención de lisados celulares	87
10.4. Cuantificación de la concentración de proteínas	87
10.5. ELISA	88
11. INFECCIÓN CELULAR CON RHOA CONSTITUTIVAMENTE ACTIVO: RHOA(Q63L)	88
11.1. Fundamento	88
11.2. Construcción de los vectores retrovirales	89
11.3. Infección	90
12. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	94
12.1. Transplante de tumores y protocolo experimental	95
12.1.1. Fundamento	95
12.1.2. Procedimiento	95
13. ANÁLISIS DE LOS DATOS	97
• RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
1. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN EL CRECIMIENTO DE TUMORES TRANSPLANTADOS	99
2. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR	101
2.1 Papel de la ruta del mevalonato en la acción antiproliferante de la fluvastatina	103
2.2 Papel de la farnesilación y geranilación en la acción de la fluvastatina	104
2.2.1 Cotratamiento con GG y FOH a la vez	107

3. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN EL FENOTIPO CELULAR	109
3.1 Papel de la ruta del mevalonato en la inhibición del a adhesión por la fluvastatina	110
3.2 Papel de la farnesilación y geranilación en la inhibición de la adhesión por la fluvastatina	112
3.2.1 Cotratamiento con limitación y exceso de GG y FOH	114
4. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR	116
4.1. Estudio de la viabilidad celular mediante citometría de flujo	117
4.2. Caracterización fenotípica de la muerte: morfología nuclear	121
4.3. Detección de ADN fragmentado en el citosol	123
5. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN EL CICLO CELULAR	125
6. EFECTO DEL CISPLATINO SOBRE LAS CÉLULAS PREVIAMENTE “SENSIBILIZADAS” POR LA FLUVASTATINA	132
6.1 Efecto del cisplatino en la proliferación de células previamente “sensibilizadas” por la fluvastatina	132
6.2 Efecto del cisplatino en la proliferación de células previamente desadheridas por la fluvastatina	135
7. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	137
7.1 Papel de la farnesilación y geranilación en la inhibición de la expresión de la MEC por la fluvastatina	139
8. SÍNTESIS, PRENILACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LAS FAMILIAS DE PROTEÍNAS G INTRACELULARES, RHO Y RAS	144
8.1 Estudio de la cantidad GTPasas “totales” de la superfamilia Ras	145
8.1.1 Estudio de las proteínas Ras en las MDA-MB-231	145
8.1.2 Estudio de las proteínas Ras en las 3LL	148
8.2 Estudio de la prenilación de la GTPasas de la superfamilia Ras	149

8.2.1 Estudio de las GTPasas Rho y Ras en las MDA-MB-231	150
8.2.2 Estudio de las GTPasas Rho y Ras en las 3LL	153
8.3 Estudio de la activación de RhoA (RhoA-GTP)	154
9. PAPEL DEL EFECTOR DE RHOA, RHO KINASA (ROCK) EN LAS CÉLULAS TUMORALES MDA-MB-231 y 3LL	159
9.1 Papel de ROCK en la proliferación de las células MDA-MB-231 y 3LL	160
9.2 Papel de ROCK la adhesión celular de las células MDA-MB-231 y 3LL	161
9.3 Papel de ROCK en la matriz extracelular de las células MDA-MB-231 y 3LL	162
10. ACCIÓN DE LA SOBREENPRESIÓN DE RHOA CONTITUTIVAMENTE ACTIVO (RHOA-Q63L) SOBRE LOS EFETOS PRODUCIDOS POR LA FLUVASTATINA	164
10.1 Acción de RhoA(Q63L) en la inhibición de la proliferación producida por la fluvastatina	166
10.2 Acción de RhoA(Q63L) en la inhibición de la adhesión producida por la fluvastatina	168
10.3 Acción de RhoA(Q63L) en la inhibición de la expresión de los elementos de la MEC producida por la fluvastatina	169
• DISCUSIÓN FINAL	171
• CONCLUSIONES	177
• BIBLIOGRAFÍA	179

1. EL CÁNCER: ASPECTOS ETIOPATOLÓGICOS.

1.1. Definición y tipos de cáncer.

Cáncer es un término genérico para un grupo de más de 100 enfermedades neoplásicas invasoras que pueden originarse en cualquier parte del organismo y que terminan afectándolo en su conjunto. Una de las características que define el cáncer es la generación rápida de células transformadas que proliferan ilimitadamente insensibles a los mecanismos de control homeostático del tejido en el que se originan, y que pueden invadir zonas adyacentes del organismo o diseminarse a otros órganos en un proceso que da lugar a la formación de nuevos focos tumorales llamados metástasis (American Cancer Society, 2007; OMS, 2010).

Por su parte, se puede definir un tumor o neoplasia como la masa resultante de la proliferación descontrolada de un grupo de células (figura 1). Los principales tipos de tumores son los siguientes (Asociación Española Contra el Cáncer, 2010):

- Los carcinomas, que proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y de los tejidos glandulares de la mama y de la próstata (adenocarcinoma). Comprenden el 80% de los tumores e incluyen algunos de los cánceres más frecuentes y deletéreos.
- Los sarcomas, que proceden del tejido conectivo, como el de los huesos (osteosarcoma), los cartílagos (condrosarcoma), los nervios, los vasos sanguíneos (angiosarcoma), los músculos y el tejido adiposo (liposarcoma).
- Las leucemias y los linfomas, que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras.

El cáncer es una enfermedad monoclonal. Una única célula inicial se divide descontroladamente y da lugar a la masa tumoral primaria, de la que parten las células invasoras que producen las metástasis. Por lo tanto, todas las células de un cáncer provienen de una única célula transformada original. Sin embargo, esto no significa que todas las células de un cáncer o de un tumor sean genética y fenotípicamente idénticas. Al contrario, en un tumor pueden diferenciarse poblaciones celulares con características fenotípicas y funcionales propias (Al-Hajj y Clarke, 2004). De hecho, se

ha comprobado en diferentes tumores experimentales y humanos que tan solo una subpoblación celular retiene propiedades tumorigénicas y es capaz de desarrollar un nuevo tumor. Por ello (entre otros motivos), a las células de esta población se les denomina *células madre cancerosas* (CMCs), y se cree que son las responsables del crecimiento y el progreso del tumor. Sin embargo, todavía se discute si son realmente células madre transformadas del tejido en el que apareció el tumor, o simplemente células de cualquier otro origen que, por el proceso de transformación han adquirido ciertas características de células madre (Lobo y cols., 2007).

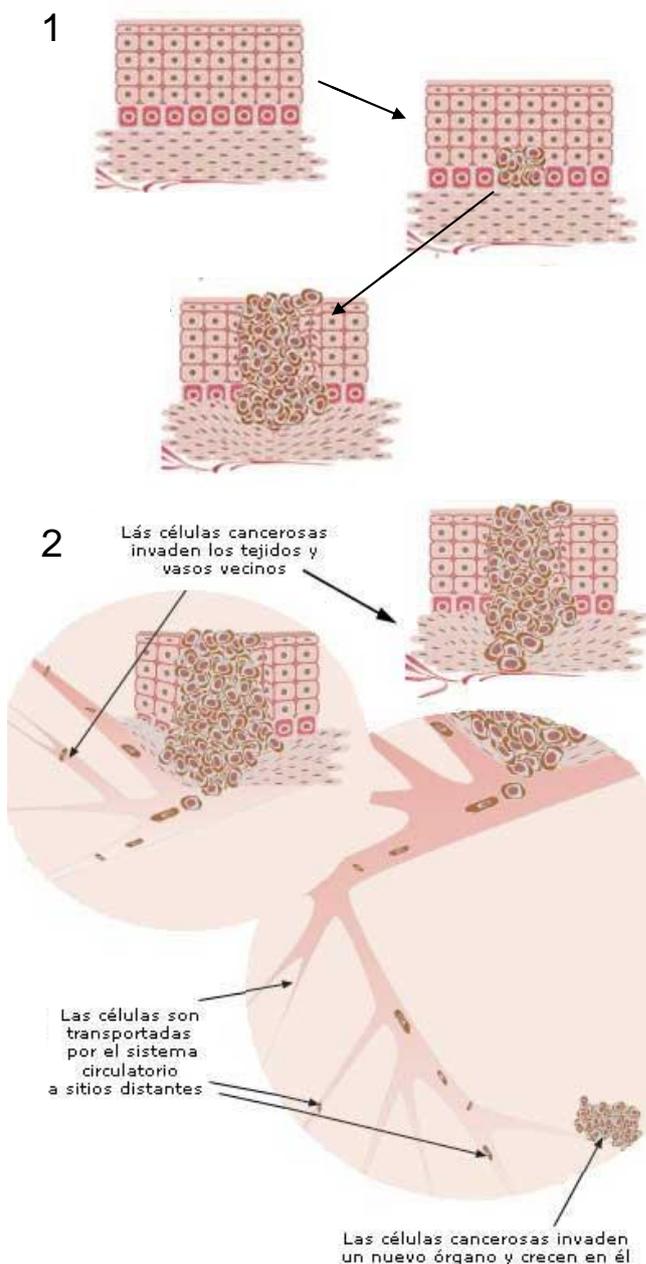


Figura 1. Representación esquemática de la carcinogénesis. La aparición de un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: 1) el aumento descontrolado de la proliferación de un grupo de células que da lugar a un tumor o neoplasia, y 2) la posterior adquisición de la capacidad invasora, que les permite diseminarse desde su sitio natural en el organismo, colonizar otros tejidos y proliferar en ellos (metástasis) (Asociación Española Contra el Cáncer, 2010). Los tumores benignos no tienen capacidad invasora y se quedan retenidos en el lugar de origen, donde crecen empujando a los tejidos que los rodean. Solo excepcionalmente comprometen la vida de los pacientes. Por el contrario, los tumores malignos son capaces de invadir otros tejidos, formar focos tumorales secundarios en órganos distantes, comprometer el funcionamiento general del organismo y acabar con la vida de los pacientes (American Cancer Society 2007; Asociación Española Contra el Cáncer, 2010; OMS, 2010).

Por otra parte, el cáncer es una enfermedad poligénica, en la que numerosos genes deben verse afectados (por herencia genética o mutación posterior) para que en una célula aparezcan, entre otras, las características de proliferación ilimitada y descontrolada y la capacidad de migración y colonización de otros tejidos que se necesitan para el surgimiento de la enfermedad (Hanahan y Weinberg, 2000; Vogelstein y Kinzler, 2004). Estas alteraciones genéticas se van acumulando progresivamente en células individuales del organismo hasta que una, en un determinado momento, adquiere todas las necesarias para formar un tumor. A medida que algunas de las células de ese tumor inicial (y no necesariamente maligno desde el principio), siguen acumulando alteraciones que les proporcionan nuevas características cancerígenas, el tumor se va transformando hacia fenotipos más agresivos con las habilidades que le proporcionan las nuevas características (Hanahan y Weinberg, 2000).

En todo este proceso, denominado *transformación celular*, unas células tumorales toman un camino biológico y otras otro diferente, lo que contribuye a crear poblaciones celulares distintas. Probablemente, la población en la que se concentran las características más favorables para la generación de un tumor sea la que finalmente se corresponda con las denominadas CMCs. Sin embargo, una característica de las células tumorales es su inestabilidad genética (Hanahan y Weinberg, 2000) y cuyos responsables son los defectos genéticos o adquiridos en la maquinaria de reparación del ADN. Sin estas alteraciones, la capacidad de acumular mutaciones en una célula y pasarlas a su descendencia se ve muy disminuida. La inestabilidad genética de las células cancerosas podría explicar, al menos parcialmente, la heterogeneidad y la deriva genética observada en las poblaciones celulares de un tumor, y podría ser responsable también de la pérdida de alguna de las características adquiridas y, por tanto, de la desactivación tumoral en determinados linajes celulares tumorales. Estos fenómenos también podrían explicar que, en un tumor formado a partir de CMCs aisladas procedentes de un tumor previo, aparezca nuevamente una heterogeneidad celular semejante a la del tumor original (Al-Hajj y Clarke, 2004; Lobo y cols., 2007).

1.2. Epidemiología de los tumores sólidos.

El cáncer es la segunda causa de muerte por enfermedad en todo el mundo con 7,9 millones de defunciones ocurridas en 2007 (el 13% de las defunciones mundiales), solo superada por las enfermedades cardiovasculares. Los tumores sólidos constituyen

el tipo de cáncer más agresivo en términos de mortalidad absoluta. Los que más contribuyen a esta mortalidad anual son: el cáncer de pulmón (1,4 millones de muertes anuales), el de estómago (casi 1 millón de muertes anuales), hígado (653.000 muertes anuales), colon (677.000 muertes anuales) y mama (549.000 muertes anuales). Se prevé que el número de muertes por cáncer siga aumentando en todo el mundo y alcance los 12 millones en 2030 (Asociación Española Contra el Cáncer, 2010; OMS, 2010). Según el Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU., se estima que durante la próxima década el cáncer pasará a ser la primera causa de muerte en los países desarrollados (Etzioni y cols., 2003; Leaf, 2004).

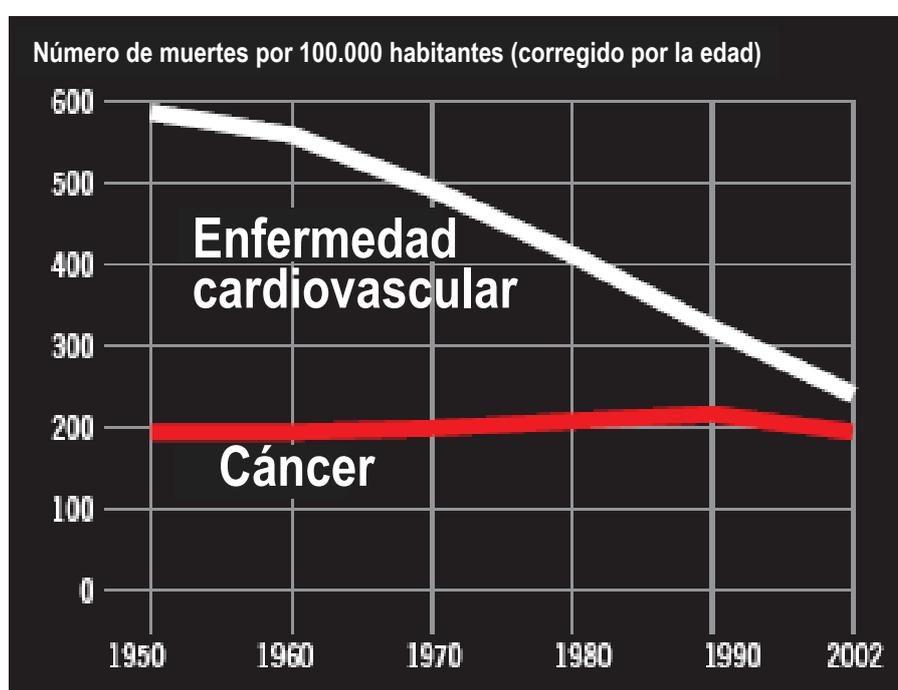


Figura 2. La tasa de mortalidad por cáncer apenas se ha modificado desde 1950. Sin embargo, la de las enfermedades cardiovasculares se ha reducido a la mitad en el mismo periodo (Etzioni y cols., 2003; Leaf, 2004).

Aunque la esperanza de vida de los pacientes de cáncer considerada globalmente ha aumentado significativamente en las últimas décadas lo cual refleja los avances en el diagnóstico precoz, el tratamiento y el conocimiento de la biología del cáncer, la incidencia de la enfermedad se ha disparado, entre otras razones, por el envejecimiento de la población y la supervivencia cada vez mayor de los enfermos de cáncer (OMS, Sociedad Española de Oncología Médica, 2010).

A pesar de que la mortalidad por cáncer ha disminuido en la última década, esta tendencia es muy leve si comparamos con las enfermedades cardiovasculares, primera causa de muerte en el mundo, cuya mortalidad ha disminuido a la mitad desde que se realizan estadísticas, es decir, desde 1950 (Figura 2) (Etzioni y cols., 2003; Leaf, 2004; Sociedad Española de Oncología Médica, 2010).

1.3. La célula cancerosa.

La célula cancerosa es una célula transformada que ha sufrido un cambio en los genes que controlan los mecanismos de regulación de la diferenciación, la proliferación, la muerte celular y la reparación del ADN. Tiene la capacidad de proliferar descontroladamente, penetrar en tejidos adyacentes y migrar a otros territorios. Aunque existen más de 100 tipos de cáncer distintos, hay ciertas alteraciones esenciales comunes que caracterizan la transformación celular, cada una de las cuales puede ocurrir por la mutación o alteración de diferentes genes (Hanahan y Weinberg, 2000). Estas alteraciones son las siguientes:

- **Autosuficiencia en señales de proliferación.**

Las células normales requieren señales mitogénicas para pasar de un estado quiescente a un estado proliferante. Estas señales llegan a la célula mediante factores de crecimiento, componentes de la matriz extracelular, moléculas de adhesión e interacción intercelular, etc. que se unen a receptores específicos de la membrana celular y ponen en marcha señales intracelulares específicas. Muchos oncogenes actúan “imitando” esta señalización de crecimiento normal que permanece activa constantemente, independientemente de los factores extracelulares. Las células cancerosas generan de forma autónoma sus propias señales de crecimiento, lo que reduce significativamente su dependencia de la estimulación por parte del entorno (Hanahan y Weinberg, 2000).

Varias estrategias moleculares les permiten alcanzar esta autonomía:

- Alteraciones relacionadas con las señales extracelulares de proliferación, como auto o transactivación permanente de los receptores de factores de crecimiento por *sobreexpresión*, mutación, etc. (Di Fiore y cols., 1987; Slamon y cols., 1987; Alimandi y cols., 1995).

- Modificación de la transmisión de las señales generadas por éstos en el interior celular (Medema y Bos, 1993).

- Interferencia con las rutas de señalización intracelulares en diferentes pasos de la cascada de señalización, para que estén activadas o inactivadas de forma independiente de sus moduladores (Rommel y Hafen, 1998; McCormick, 1999; Vogelstein y Kinzler, 2004).

- Síntesis desregulada (por las células cancerosas) de factores de crecimiento que da lugar a una estimulación autocrina autónoma (Alimandi y cols., 1995).

- **Insensibilidad a las señales de inhibición de la proliferación.**

Las células cancerosas evaden las señales inhibitorias de la proliferación que operan para mantener a la célula quiescente y la homeostasis de los tejidos. Estas señales incluyen inhibidores de crecimiento solubles (p.e. TGF- β) y otros que forman parte de la matriz extracelular (MEC) y de la superficie de las células (p.e. integrinas y cadherinas; Hanahan y Weinberg, 2000). Muchos de los mecanismos que llevan a las células normales a responder a las señales inhibitorias de la proliferación, y que están alterados en las células cancerosas, están asociados con el control del ciclo celular, especialmente con los componentes que regulan el paso a través de la fase G1 (Weinberg, 1995). Las estrategias moleculares que proporcionan esta característica son muy similares a las de adquisición de la autosuficiencia proliferante.

- **Evasión de la muerte celular programada.**

La alteración de la apoptosis es característica de muchos, si no todos, los tipos de cáncer. La capacidad de un conjunto de células para expandirse no está determinada sólo por la tasa de proliferación sino también por la de apoptosis. Además, la inhabilitación de la apoptosis, o de ciertas vías de su ejecución, proporciona a la célula cancerosa un permiso de supervivencia mediante un mecanismo de escape de la muerte inducida por eventos celulares relacionados con la transformación celular, como la existencia de mutaciones no reparadas que, en condiciones normales activarían el programa de muerte para evitar la multiplicación de células defectuosas.

La maquinaria de la apoptosis se encuentra latente en todos los tipos celulares del organismo. Una vez disparado por una variedad de señales fisiológicas y patológicas, este programa se desarrolla en una serie de pasos precisos, como la reducción del volumen celular, la desorganización de su membrana, la rotura del citoesqueleto, la proteólisis controlada y específica, la degradación de los cromosomas, la fragmentación del núcleo y, finalmente, el desmantelamiento de la célula en fragmentos vesiculares más pequeños rodeados por membrana celular, que contienen los restos celulares y las

organelas (Nuñez y cols., 2010). Estas vesículas, denominadas *cuerpos apoptóticos*, son reconocidas y fagocitadas por las células adyacentes y, en su caso, por las del sistema inmunológico, lo que permite una retirada limpia, efectiva e inocua de las células muertas (Wyllie y cols., 1980).

Las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a la apoptosis mediante varios mecanismos. Uno de los más comunes es la pérdida funcional por mutación del gen oncosupresor p53, un regulador proapoptótico e inhibidor del ciclo celular (Levine, 1997), cuya función es inducir la maquinaria proapoptótica en respuesta a anomalías como el daño al ADN no reparado, la hipoxia o la *hiperexpresión* de oncogenes (Harris, 1996). La inactivación de la proteína p53 se ha detectado en más del 50% de los cánceres humanos (Harris, 1996). Otro mecanismo es la activación de la ruta de la PI3 kinasa-AKT/PKB, que limita la apoptosis en una fracción importante de los tumores humanos. Esta ruta de señalización de la supervivencia puede activarse por factores extracelulares como el IGF-1/2 o la IL-3, o por mediadores intracelulares como Ras (Evan y Littlewood, 1998). Éste último es el primer oncogén humano descrito, una de cuyas mutaciones produce su constante autoactivación, y que también está presente en un 30% de cánceres humanos y experimentales (Balmain, 1985; Serrano y cols., 1997; Sahai y Marshall, 2002) (figura 3).

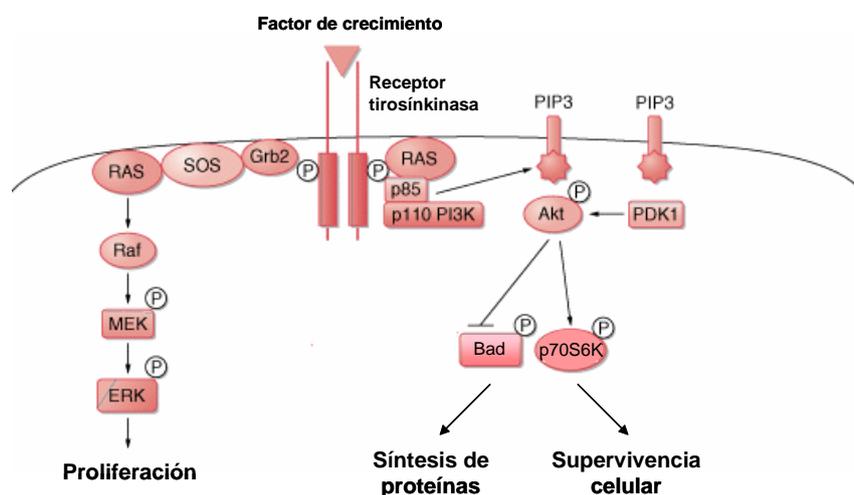


Figura 3. Vías de señalización intracelular activadas por la unión de factores de crecimiento a receptores con actividad tirosina-kinasa (RTK). La señalización iniciada por los factores de crecimiento al unirse a sus RTKs está mediada por proteínas adaptadoras como Grb2, que permiten la activación de cascadas de señalización como la de Ras y Akt, que a su vez inactiva por fosforilación al miembro pro-apoptótico Bad de la familia Bcl-2, y favorece así las señales de supervivencia celular (adaptada de Bafico y Aaronson, 2003).

- **Potencial proliferante ilimitado.**

Las tres capacidades descritas anteriormente -autosuficiencia proliferante, insensibilidad a las señales de inhibición de la proliferación y resistencia a la apoptosis- conducen a un desacoplamiento del programa de crecimiento celular con su entorno. Sin embargo, esto no es suficiente para que un conjunto de células forme un tumor macroscópico, ya que existe un programa autónomo intrínseco en las células de los organismos pluricelulares que limita la multiplicación y que establece un número máximo de divisiones [límite de Hayflick (Hayflick y Moorhead, 1961)] antes de que la célula deje de proliferar, envejezca y, eventualmente, muera. Este programa opera independientemente de la señalización intercelular y constituye un reloj biológico autónomo que, entre otras funciones, protege del cáncer y, por lo tanto, debe deteriorarse para permitir el desarrollo de un tumor macroscópico (Hanahan y Weinberg, 2000).

El envejecimiento celular puede estar asociado al acortamiento de los telómeros cromosómicos (Shay y Bacchetti, 1997) que ocurre de forma acumulativa en cada ciclo de división celular, o por las señales de crecimiento conflictivas que fuerzan a las células aberrantes a permanecer en el estado G0 y les impide proliferar (Serrano y cols., 1997). La evasión del envejecimiento y la adquisición de la capacidad de proliferación ilimitada (inmortalidad) son esenciales para la progresión del tumor. De hecho, una característica de la gran mayoría de los tumores es la presencia de la telomerasa, una enzima ausente en la mayoría de las células diferenciadas, que repara el acortamiento de los telómeros, y que se ha relacionado con la inmortalidad celular (Bryan y Cech, 1999).

- **Angiogénesis mantenida.**

El oxígeno y los nutrientes suministrados por la vasculatura son cruciales para la función y supervivencia celular, lo que obliga a las células de los tejidos a vivir a menos de 100 μm de un capilar. La angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos a partir de los existentes, es un proceso altamente regulado (Folkman y D'Amore, 1996). Una vez que un tejido se ha formado, la angiogénesis se detiene. Se conocen inhibidores endógenos de la angiogénesis, como la trombospondina-1 y la endostatina, que mantienen el proceso inactivo en las circunstancias apropiadas (Folkman, 2004). Por el contrario, cuando un tejido se hipertrofia, sus necesidades metabólicas aumentan, lo que estimula la formación de nuevos vasos que irrigan la nueva masa celular. En muchas circunstancias, la hipoxia (la bajada de la tensión parcial de oxígeno local) es

un potente inductor de la síntesis de mediadores de angiogénesis (como el factor inducido por la hipoxia, HIF, y el factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF) por parte de las células deficitarias de oxígeno (Folkman y D'Amore, 1996). El balance entre la cantidad de factores pro y antiangiogénicos presentes en un determinado entorno en una circunstancia particular, determina el destino del proceso (Hanahan y Weinberg, 2000).

Las células de tejidos con lesiones que dan lugar a una proliferación aberrante, inicialmente carecen de capacidad angiogénica efectiva, lo cual restringiría sus posibilidades de expansión (Hanahan y Weinberg, 2000). Por eso, las neoplasias incipientes deben adquirir la capacidad angiogénica para superar ese límite volumétrico y progresar a un tamaño mayor (Hanahan y Folkman, 1996). Los factores de crecimiento angiogénicos, como el factor fibroblástico ácido y básico (FGF1/2), el transformante beta (TGF- β) y el vascular endotelial (VEGF), se unen a sus correspondientes receptores de la superficie de las células endoteliales (Veikkola y cols., 2000). Esta unión da lugar a la fosforilación, dimerización y activación catalítica de la tirosina kinasa de los dominios citoplasmáticos de los receptores, e inicia el proceso de señalización intracelular. Como consecuencia, las células endoteliales de los capilares preexistentes forman brotes vasculares que progresan hasta convertirse en nuevos capilares sanguíneos. Este proceso implica la desconexión de las células de la matriz extracelular y de las células colindantes (mediante la síntesis de colagenasas y metaloproteasas), la migración celular, la proliferación, la síntesis de nueva MEC y la formación de la membrana basal (Folkman y D'Amore, 1996).

Las células cancerosas de los tumores que progresan han adquirido la capacidad de activar la angiogénesis. Esta capacidad se basa en desequilibrar el balance de inductores e inhibidores angiogénicos a favor de los inductores mediante el aumento de la expresión génica de VEGF o FGF1/2 o la disminución de la de trombospondina-1 (Hanahan y Folkman, 1996).

- **Invasión tisular y metástasis.**

Durante el desarrollo del cáncer, algunas células de la masa del tumor primario migran, invaden tejidos adyacentes y viajan a sitios más alejados donde pueden iniciar nuevas colonias tumorales. Estos asentamientos distantes del tumor -metástasis- causan el 90% de las muertes por cáncer (Sporn, 1996). Diferentes familias de proteínas proporcionan el anclaje de las células a su entorno tisular. Para que se produzcan las

metástasis, estas uniones deben deshacerse para permitir que las células migren, alcancen el torrente circulatorio o el circuito linfático y, desde ellos, colonicen otros tejidos. Algunas de estas proteínas son (i) las *moléculas de adhesión celular* (CAMs), miembros de la familia de las inmunoglobulinas y cadherinas calcio-dependientes, que median las interacciones célula-célula; y (ii) las integrinas; que unen las células a la matriz extracelular (Hanahan y Weinberg, 2000).

Los detalles moleculares de la adquisición de la habilidad metastásica es una de las características más desconocidas de la biología tumoral. Una de las proteínas más estudiadas en el cáncer es la E-cadherina, cuya desaparición está relacionada no solo con la adhesión celular, sino también con el proceso desdiferenciador denominado transición epitelio-mesenquimal que proporciona a las células algunas de las características mesenquimales asociadas con el cáncer, como la capacidad de invasión y la inmortalidad (Christofori y Semb, 1999). Las proteasas extracelulares (que degradan los componentes de la matriz extracelular) constituyen otro aspecto importante en la metástasis. En muchos tipos de cáncer, los genes que codifican las proteasas están *sobreexpresados*, los genes de inhibidores endógenos de estas proteasas se encuentran *infraexpresados* y los zimógenos inactivos de estas enzimas se activan (Coussens y Werb, 1996). Recientemente se ha comenzado a conocer el patrón de expresión génica asociado a la adquisición de las características que permiten a las células cancerosas invadir otros tejidos y formar metástasis. Concretamente, se está empezando a comprender la relación de los genes identificados con el estadio de la transformación en el que se adquieren estas competencias, y la relación de las células metastásicas con el tejido de origen y de destino (Nguyen y Massagué, 2007).

- **Inhabilitación de los sistemas reparadores del ADN.**

Como se ha comentado, una de las características fundamentales de las células cancerosas es su inestabilidad genética (Thoms y cols., 2007). Esta inestabilidad se ha asociado a una deficiente capacidad de reparación del ADN, que permite que algunas mutaciones pasen a la descendencia celular (Sanford y cols., 1989; Boyer y cols., 1995; Chang y cols., 2000; Fan y cols., 2004). Estas mutaciones se producen como consecuencia de la acción de radiaciones y sustancias químicas sobre las células, del propio proceso de división celular y de otras causas. En condiciones normales los sistemas de reparación son altamente eficaces, y las mutaciones que consiguen consolidarse en el genoma son muy escasas. De hecho, como se ha comentado

anteriormente, cuando una célula normal no es capaz de reparar los daños en el ADN, automáticamente pone en marcha el programa de muerte celular para asegurar que los errores adquiridos no se transmitan a las células hijas (Shannan y cols., 2006).

Así, la herencia o adquisición de alteraciones en los genes responsables de los mecanismos de reparación del ADN predispone a la aparición de cáncer (Felton y cols., 2007; Spry y cols., 2007). Por otra parte, la eficacia terapéutica de los fármacos que producen daño en el ADN es superior en individuos con alteraciones genéticas en los genes reparadores (Zorbas y Keppler, 2005; Thoms y cols., 2007; Spry y cols., 2007). Por último, existen correlaciones entre determinados polimorfismos genéticos de los genes responsables de los mecanismos de reparación del ADN y una mayor incidencia de cáncer (Camps y cols., 2007). Todos estos datos indican que las alteraciones en la reparación del ADN tienen un papel muy importante en la transformación celular, que permite la transmisión de mutaciones responsables de la dicha transformación.

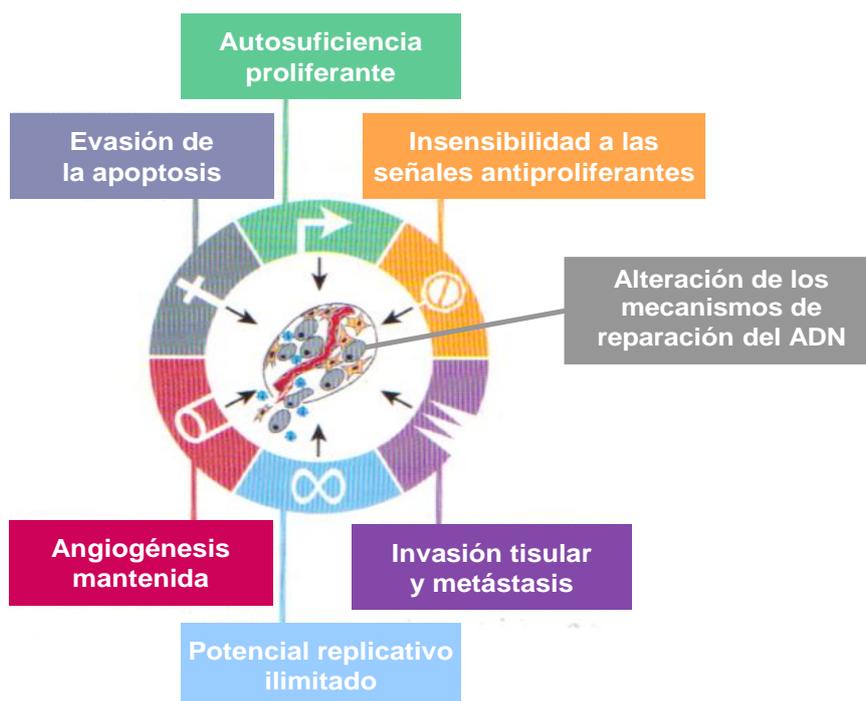


Figura 4. Capacidades adquiridas por la célula cancerosa. Casi todos, si no todos, los cánceres adquieren el mismo conjunto de capacidades durante su desarrollo (adaptada de Hanahan y Weinberg, 2000).

2. TERAPÉUTICA ANTICANCEROSA ACTUAL.

Las directrices de salud pública para el control del cáncer incluyen la aplicación sistemática y equitativa de estrategias de prevención, detección temprana y tratamiento de la enfermedad (OMS, 2010).

2.1. Prevención.

Cerca de un tercio de los cánceres podrían evitarse mediante la aplicación de estrategias preventivas destinadas a reducir la exposición a los factores de riesgo a través de cambios en la dieta, en el consumo de tabaco, en la actividad física, reducción de la exposición al sol, inmunización contra la infección por papilomavirus humano (PVH), etc. (Asociación Española Contra el Cáncer, 2010; OMS, 2010).

2.2. Detección temprana.

Otro tercio de los casos podría curarse gracias a su diagnóstico temprano. El tratamiento es más eficaz cuanto más tempranamente se detecta la enfermedad (OMS, 2010). El objetivo consiste en detectar el cáncer mientras está localizado, antes de que se produzcan las metástasis. Como demuestran claramente estudios recientes (Etzioni y cols., 2003), la mejora en la esperanza de vida de los pacientes de cáncer lograda en las últimas décadas, se debe principalmente al progreso de los métodos y las estrategias de detección precoz, más que al descubrimiento de herramientas terapéuticas más efectivas (figura 5). De hecho, la esperanza de vida asociada a cuatro de los cánceres más frecuentes y que más muertes producen (mama, pulmón, próstata y colorrectal), una vez corregida por el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico, no ha variado significativamente desde la década de 1970 (figura 5). El desarrollo de nuevas herramientas diagnósticas tempranas y la identificación de biomarcadores de enfermedad incipiente constituyen dos asignaturas pendientes en la terapéutica anticancerosa (Etzioni y cols., 2003; Leaf, 2004).

Los programas de detección temprana del cáncer tienen dos componentes (OMS, 2010; Asociación Española Contra el Cáncer, 2010):

- La educación del paciente para que reconozca signos como los nódulos, las úlceras o las hemorragias, y busque rápidamente atención médica en caso de que se presenten estas manifestaciones.

- La identificación de las personas con cánceres incipientes o lesiones precancerosas mediante la realización de pruebas de detección antes de que aparezcan los primeros signos. Actualmente, entre esas pruebas se encuentran, por ejemplo, la mamografía y la citología, para detectar los cánceres de mama y cuello del útero, respectivamente.

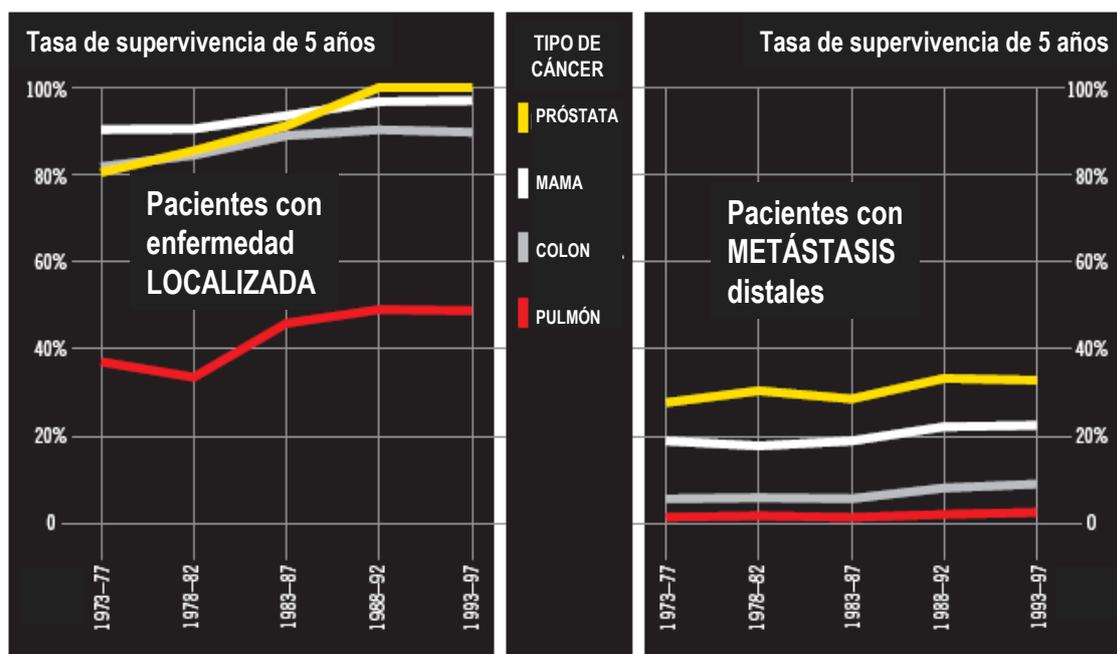


Figura 5. Evolución de la tasa de supervivencia de 5 años tras el diagnóstico de los cánceres de próstata, de mama, colorrectal y de pulmón, corregida por el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico. El panel izquierdo muestra el caso de cánceres en un estadio inicial, y el de la derecha el de aquellos en estado avanzado (Etzioni y cols., 2003).

2.3. Tratamiento.

El **tratamiento paliativo** se desarrolla cuando la neoplasia no está localizada, la extirpación completa o erradicación es imposible o cuando ya existen metástasis. Consiste en disminuir el número de células cancerosas o el tamaño de los tumores, aliviar los síntomas, prolongar la supervivencia y mejorar la calidad de vida del paciente (OMS, 2010).

El **tratamiento eficaz** del cáncer debe dirigirse no sólo al tumor principal, sino también a los tumores que, por extensión, puedan aparecer en otras partes del organismo (metástasis). Por ello, la cirugía o la radioterapia que se aplican en áreas específicas del cuerpo a menudo se combinan con la quimioterapia, que actúa en todo el

organismo. El tratamiento concreto para cada paciente y las perspectivas (pronóstico) se determinan principalmente por el estudio de la gravedad del cáncer, la facilidad de acceso físico a los tumores, su extensión a otros órganos y la existencia de indicadores bioquímicos (OMS, 2010).

2.3.1. Cirugía.

La extirpación quirúrgica de la masa o masas tumorales es una de las formas más antiguas de tratamiento del cáncer y, todavía hoy en día, la de elección para el tratamiento inicial en la mayoría de los casos. Las grandes desventajas de este método terapéutico son el trauma fisiológico y psicológico asociado, y la incapacidad para retirar tumores y metástasis inferiores a un determinado tamaño. Por ello, en muchos casos, la cirugía se combina con tratamientos basados en la radioterapia y la quimioterapia, que se describen a continuación, con la intención de acabar con aquellos núcleos y células tumorales que no han podido extirparse (Manual de Merck, 2007, Asociación Española Contra el Cáncer, 2010).

2.3.2. Radioterapia.

La radioterapia es un tratamiento con radiaciones ionizantes que persigue destruir las células cancerosas en el área en la que se administra. En general, destruye principalmente las células que se dividen rápidamente. Mayoritariamente, ataca a las células cancerosas, pero la radiación puede también dañar los tejidos normales, especialmente aquellos en los cuales las células tienen una tasa de división elevada, como las células blásticas de la médula ósea, las células gonadales y las de diversos epitelios (mucosa gastrointestinal, piel, uñas o folículo piloso) (Manual de Merck, 2007; Asociación Española Contra el Cáncer, 2010).

2.3.3. Quimioterapia.

La quimioterapia es el uso de fármacos como forma de tratamiento frente al cáncer. Existen multitud de fármacos empleados en el tratamiento del cáncer que se describen en los párrafos siguientes. En general (aunque no en todos los casos), todas estas sustancias actúan con una moderada especificidad sobre células que están en proceso de división. En el organismo, la mayoría de las células están en fase G₀, aunque existen tejidos y epitelios con una elevada tasa de recambio celular, que constituyen dianas indeseables para estos fármacos, lo que da lugar a graves efectos secundarios que limitan decisivamente la ventana terapéutica y la eficacia de los tratamientos.

Raramente pues, la quimioterapia es el método único o de elección para el tratamiento del cáncer. Como se ha comentado, normalmente se utiliza en combinación con la cirugía. En muchos casos, el tratamiento farmacológico de tumores malignos requiere la asociación de varios fármacos activos, que dan lugar a los llamados cócteles farmacológicos. Los antineoplásicos utilizados en combinación actúan por mecanismos bioquímicos diferentes o en fases celulares distintas, tienen distinta toxicidad orgánica o ésta se manifiesta a tiempos diferentes, de forma que sus efectos combinados produzcan sinergia entre sí. Los fármacos antineoplásicos frenan la proliferación celular mediante mecanismos diversos. Generalmente afectan a la maquinaria reproductora (ADN, ARN o mitosis) pero otros inhiben la síntesis proteica. Un mismo antineoplásico puede actuar por distintos mecanismos y así resulta más eficaz en tumores de rápido crecimiento.

Según su mecanismo de acción, los fármacos antineoplásicos se clasifican en los siguientes grupos (Rang y Dale, 1992; Flórez y cols., 2003):

- **Fármacos que actúan sobre el ADN.** Afectan a la integridad del ADN y, por ello, impiden la replicación normal. La acción puede ser específica de una fase o, más generalmente, puede ocurrir en cualquier momento del ciclo celular. En cualquier caso, el efecto suele hacerse patente en el paso de la fase G1 a la S. En ese punto de control del ciclo, las células con cadenas defectuosas sufren un proceso de apoptosis si el gen p53 (que controla dicho proceso) permanece intacto. A este grupo pertenecen la mayoría de los anticancerosos clásicos.

- Agentes alquilantes (mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, etilenoiminas, alquilsulfonatos y triazenos). Forman enlaces covalentes por sustitución nucleofílica entre sus grupos alquilo y moléculas nucleofílicas de las células como las bases nitrogenadas del ADN, el N7 de la guanina, etc.
- Complejos del platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino). Al ser activados intracelularmente quedan libres dos valencias del ión platino, que forman dos enlaces estables con productos nucleofílicos del ADN, usualmente con dos moléculas de guanina adyacentes en la misma cadena, pero también formando puentes entre las cadenas. El resultado es la producción de errores de transcripción y la imposibilidad de que las cadenas de ADN se separen para la replicación.
- Antimetabolitos (análogos de bases púricas y pirimidínicas, de ácido fólico y de urea). Interfieren en la síntesis del ADN por un mecanismo complejo gracias a su semejanza con los sustratos normales.
- Antibióticos citostáticos (antraciclinas y otros). Son de origen bacteriano y provocan cortes en las hebras del ADN.
- Inhibidores de la topoisomerasa II (alcaloides del podófilo, doxorubicina, epirubicina y mitozantrona). Se unen covalentemente a la enzima e impiden la replicación del ADN (Zwelling, 1985).
- Inhibidores de la topoisomerasa I (camptotecinas) (Denny y Baguley, 2003).

- **Inhibidores de la mitosis (alcaloides de la vinca y taxanos).** Interactúan específicamente con la tubulina de los microtúbulos del huso acromático e impiden el proceso de la mitosis (Duflos y cols., 2002; Abal y cols., 2003).

- **Modificadores de la respuesta biológica.**

- Factores externos. Actúan sobre los factores que modulan la división celular. Se dividen en:
 - Inhibidores hormonales. Sólo tienen efecto en tumores de tejidos cuyo crecimiento depende de estímulo hormonal (algunos cánceres de próstata y de mama y tejido linfoide).
 - Interferones, todavía utilizados en el tratamiento de determinados tumores.
- Potenciadores de la respuesta inmunológica. Interleucinas, interferones y anticuerpos monoclonales si existen antígenos específicamente asociados a células tumorales. Son específicos para determinados receptores presentes en distintas líneas celulares tumorales (CD20, HER2, CD33 o CD52).
- Bloqueantes de los receptores de los factores de crecimiento. La división y proliferación celular están controladas por vías de señalización que se inician con la unión de los factores de crecimiento con los receptores correspondientes. En la transformación cancerosa, los receptores de los factores de crecimiento de tipo epidérmico están sobreexpresados y corresponden a 4 grupos: ErbB-1 o Her1 (EGFR, propiamente dicho); el ErbB-2 (Her2-neu); el ErbB-3 (Her3), y el ErbB-4 (Her4). Se han desarrollado anticuerpos monoclonales que impiden la unión de los factores de crecimiento con los receptores correspondientes e inhibidores específicos de tirosina kinasas. Ejemplos: Trastuzumab (Herceptin) -un anticuerpo monoclonal dirigido frente al receptor transmembrana de tirosina kinasa, el receptor Her-2 (c-erbB-2 o neu)-, Cetuximab (Erbix) dirigido frente al EGFR y Bevacizumab (Avastin) frente al VEGF (Grim y cols., 2005).
- Inhibidores de tirosina kinasas. Por otra parte, nuevos fármacos como el mesilato de imatinib (Gleevec) poseen actividad inhibitoria razonablemente selectiva por ciertas enzimas con actividad tirosina kinasa que tienen un papel muy importante en las células tumorales, especialmente la enzima Abl que se encuentra constitutivamente activada en ciertos tipos de leucemia dependientes de una mutación recombinante entre los genes Bcr y Abl (Druker, 2002).
- Antiangiogénicos. En la década de 1990 se creó una gran esperanza sobre la posibilidad de encontrar un tratamiento anticanceroso universal basado en el infarto del tumor mediante la inhibición de la formación de su red vascular (antiangiogénesis) o la destrucción del existente (vasculolisis) (Maione y Sharpe, 1990). Numerosos fármacos antiangiogénicos (endógenos y sintéticos) han sido aprobados para su uso en los últimos años, aunque su eficacia no ha respondido a las expectativas iniciales.

3. PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS: DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS.

La eficacia de la terapia anticancerosa está condicionada por diversos factores, como (i) la heterogeneidad bioquímica, inmunológica y morfológica de las células de un tumor y sus metástasis, (ii) su sensibilidad a los fármacos y a la fase del ciclo celular, (iii) la aparición de resistencias a los fármacos, (iv) el diagnóstico tardío, ya que en esos casos las células están en crecimiento desacelerado y no se dividen o lo hacen muy lentamente, lo que las hace menos sensibles a los fármacos, etc. (Flórez y cols., 2003).

Como se ha expuesto en el apartado 2.2., la eficacia terapéutica anticancerosa casi no ha mejorado desde la década de 1950 (Etzioni y cols., 2003; Leaf, 2004). Por este motivo, junto con el desarrollo de técnicas de diagnóstico que permitan la detección muy temprana de la enfermedad, la gran asignatura pendiente es el desarrollo de nuevas terapias efectivas. En los próximos apartados se resumen las líneas de investigación más activas en estos momentos.

3.1. Descubrimiento de nuevos fármacos.

Aunque los nuevos fármacos, algunos de los cuales fueron considerados teóricamente revolucionarios en un principio, no han dado el resultado esperado, no se puede descartar que en algún momento se descubra una nueva molécula que cambie la terapéutica anticancerosa, como ha ocurrido con otras enfermedades, como las infecciosas (con la penicilina), las enfermedades cardíacas (con los beta bloqueantes), las alergias (con los antihistamínicos H1), las úlceras gastroduodenales (con los antihistamínicos H2), el dolor (con el ácido acetilsalicílico y los opiáceos) o el rechazo de los trasplantes (con la ciclosporina), por citar algunos ejemplos.

Las fuentes de nuevos fármacos son los compuestos naturales obtenidos de plantas y animales, o la síntesis de nuevas moléculas al azar o basada en el conocimiento de la estructura de las dianas terapéuticas. En este sentido, el descubrimiento de los mecanismos genéticos responsables del cáncer contribuye al desarrollo de fármacos que actúan en la diana molecular responsable de la neoplasia. Tras la identificación de una diana molecular potencial, hoy día es posible establecer ensayos para estudiar sobre ella el efecto de miles de fármacos candidatos (Carnero, 2006).

3.2. Inmunoterapia antitumoral.

La terapia anticancerosa ideal podría estar constituida por la activación del sistema inmunológico para que, haciendo uso de su especificidad y eficacia, reconozca como extraño el tumor y lo destruya. La activación de una respuesta antitumoral específica sería consecuencia de la expresión de nuevos antígenos específicos por las células cancerosas (Dawson y Moore, 1991).

La inmunoterapia puede llevarse a cabo bajo diferentes enfoques terapéuticos: (i) la inmunoterapia adoptiva, consistente en la transferencia de anticuerpos entre individuos; (ii) la inmunoterapia pasiva, mediante la administración de anticuerpos monoclonales; y (iii) la inmunoterapia activa, donde se intenta estimular los

componentes del sistema inmunológico responsables de la respuesta antitumoral y donde quedaría englobada la administración de vacunas terapéuticas y profilácticas (inmunización activa específica) y de los interferones, interleukina-2 y la vacuna de bacilo de Calmette-Guérin (inmunización activa inespecífica) (Dawson y Moore, 1991). Una vacuna constituiría cualquier modo de mostrar un antígeno al sistema inmunológico, de tal forma que éste lo reconozca como extraño y desencadene una respuesta inmunológica hacia las células que lo expresen (Zwiebel y cols., 1993; Baltz, 1995).

El desarrollo de las vacunas antitumorales se fundamenta en tres características básicas del sistema inmunitario (Schirmacher, 1995):

- La existencia de diferencias cualitativas y cuantitativas en la expresión de los antígenos entre la mayoría de las células no cancerosas y cancerosas.
- El sistema inmunológico es potencialmente capaz de detectar estas diferencias, y poner en marcha una respuesta celular.
- La respuesta inmunológica es capaz de producir la regresión tumoral con alta selectividad e inocuidad para el resto del organismo.

La vacunación terapéutica se ha planteado como forma de curar un tumor existente. Los principales problemas de la inmunoterapia son la dificultad de aislar antígenos tumorales específicos que puedan ser reconocidos como extraños y con la suficiente capacidad para estimular el sistema inmunológico. La escasa capacidad inmunogénica de los tumores se ha intentado solucionar mediante la conjugación del antígeno tumoral con adyuvantes, y mediante la introducción de los genes responsables de la codificación de estos antígenos en el interior de vectores víricos o bacterianos (Cohen, 1993; Balz, 1995). En la década pasada se han llevado a cabo multitud de ensayos clínicos con vacunas y otras formas de inmunoterapia anticancerosa, aunque la mayoría de ellos no han producido resultados clínicos claros, más allá de la prueba del concepto básico de acción (Dalglish y Welan, 2006; Keilholz, 2007).

La vacunación también se ha planteado en oncología como prevención de la aparición de la enfermedad. El 8 de junio de 2006 las autoridades sanitarias norteamericanas (FDA) aprobaron la primera vacuna preventiva contra un tipo de cáncer de origen vírico, el de cuello de útero, para mujeres de entre 9 y 26 años de edad (Chan y Berek, 2007). La Unión Europea aprobó su comercialización en septiembre del 2006.

3.3. Terapia génica.

Se han están desarrollado diferentes estrategias en la lucha contra el cáncer basadas en la terapia génica con el fin de conseguir vacunas o tratamientos antitumorales más eficaces. Una de las líneas de investigación consiste en lograr la optimización del tratamiento quimioterapéutico para cada paciente y en potenciar la selectividad de la quimioterapia administrada. Para ello se basan en la identificación de genes que expresen proteínas capaces de transformar profármacos en fármacos activos y en la restricción de estos procesos a las células cancerosas (Mastrangelo y cols., 1996). También se puede actuar suprimiendo la expresión de los oncogenes. Es posible desarrollar sistemas de silenciamiento de la expresión génica que permitan la inserción de genes que codifiquen una cadena de ARNm complementaria a la sintetizada por el oncogén deteniendo la producción anormal de la proteína (Cohen, 1993).

Otra posibilidad consiste en la restitución de algún gen perdido, necesario para el funcionamiento normal de la célula, y cuya ausencia tenga consecuencias oncogénicas (Mastrangelo y cols., 1996). Un ejemplo de este tipo de terapia lo constituyen los estudios realizados para restablecer en la célula el gen oncosupresor p53, funcionalmente inactivo por mutación en muchos cánceres. p53 controla la división celular. Cuando p53 está activo detecta la aparición de daño celular y detiene la división. Si el daño es irreparable o muy intenso, la célula, gobernada por p53, activa la apoptosis. La pérdida de función de esta proteína está relacionada con el desarrollo tumoral. Por ello, se está estudiando la posibilidad de introducir mediante terapia génica el gen funcional de p53 en las células que tienen este gen mutado. El principal problema de esta metodología es conseguir que los vectores lleguen a todas las células tumorales. Las células que se escapan del tratamiento pueden reconstituir el proceso canceroso (Zhang y Chen, 2007).

3.4. Farmacología dirigida.

Otra línea de investigación atractiva es la llamada farmacología dirigida, que consiste en enviar selectivamente el fármaco a las células tumorales, con el fin de evitar su acción indiscriminada en otros territorios del organismo y reducir significativamente su toxicidad. Los efectos tóxicos de los agentes anticancerosos son una de las limitaciones más importantes de su uso a dosis efectivas.

La farmacología dirigida utiliza construcciones químicas o genéticas que tienen dos dominios. Uno de ellos, llamado dominio *vectorial*, que se encarga de dirigir el conjunto a su diana específica; el otro, el dominio terapéutico, porta la actividad biológica que, en este caso, se trata de una molécula capaz de inducir la muerte de las células dianas. El dominio vectorial suele ser un anticuerpo que reconoce un antígeno expresado con una cierta selectividad en la membrana de la célula diana, aunque puede ser cualquier molécula con afinidad selectiva por otra localizada en la membrana de la célula diana. Cuando el dominio vectorial es un anticuerpo (o un fragmento de un anticuerpo), el conjunto se denomina inmunoconjugado. Los inmunoconjugados que llevan asociada una toxina como dominio terapéutico se denominan inmunotoxinas, que son los conjugados más ampliamente utilizados para el desarrollo de estas formas de terapia anticancerosa (Press, 1991; Frankel, 1993; Reiter, 2001; Khandare y Minko, 2006; Kreitman, 2006; Nevozhay y cols., 2007).

Las inmunotoxinas generadas contra antígenos tumorales se conocen desde hace décadas y han mostrado una gran eficacia terapéutica y una gran selectividad en estudios *in vitro* con células en cultivo. Concretamente, dosis de las inmunotoxinas que son capaces de eliminar un cultivo de células tumorales, no ejercen ningún efecto sobre las células normales. Sin embargo, estos resultados prometedores se han visto frustrados con su uso *in vivo*, donde las inmunotoxinas no ejercen el efecto esperado (Pirker, 1988; Kemshead y Hopkins, 1993). Este hecho se ha asociado, entre otros, a la incapacidad de estas moléculas de gran tamaño para atravesar las barreras tisulares interpuestas entre la sangre (su vía de administración más eficaz) y las células tumorales. Aunque en el resto de los lechos vasculares el endotelio capilar supone una barrera insalvable para la mayoría de las macromoléculas, el endotelio tumoral, por su deficiente formación, por los procesos inflamatorios que ocurren en el tumor y por la continua angiogénesis, es mucho más permeable que el normal y permite el paso de las inmunotoxinas (Dvorak, 1990). Sin embargo, éstas no penetran mucho más, y quedan retenidas fundamentalmente en el espacio perivascular y, en menor medida, en el estroma. El parénquima tumoral resulta impermeable para estas moléculas que, como consecuencia, no acceden a sus dianas en cantidades efectivas (Pirker, 1988; Van Horsen y cols., 2000, Li y cols., 2005). Esto se debe a que la matriz extracelular (MEC) del estroma, y especialmente la del parénquima tumoral, son lo suficientemente densas como para impedir el paso de moléculas de un determinado tamaño. A esto hay que

añadir que, en general, el compartimento extracelular de los tumores es un espacio fibroso (Comoglio y Trusolino, 2005).

Por todo ello, una asignatura pendiente para el desarrollo de formas efectivas de tratamiento es encontrar conjugados mucho más pequeños que penetren en el tumor (Kreitman, 2006), o, alternativamente, utilizar un cotratamiento que inhiba la síntesis de la matriz extracelular y haga el parénquima tumoral más permeable a las macromoléculas. Esta última opción es abordada en este trabajo, como se detallará más adelante.

4. LA MATRIZ EXTRACELULAR TUMORAL COMO DIANA TERAPÉUTICA.

Tradicionalmente se ha considerado a la MEC como un compartimento que simplemente permitía el desarrollo tumoral. Según esta visión, la MEC es un medio complejo desde el punto de vista molecular que proporciona a las células el andamiaje necesario para la formación de estructuras tridimensionales. Además, la MEC constituye una reserva de moléculas insolubles que integran estímulos y los convierten en señales celulares implicadas en la proliferación, diferenciación, supervivencia, migración, etc. (Giancotti y Tarone, 2003). Este equilibrio normal de los constituyentes de la matriz con las respuestas celulares que desencadenan se encuentra alterado en los tumores. Según el papel tradicional que se otorga a la MEC, en el microambiente caótico inicial en el que empieza a desarrollarse el tumor, las células cancerosas adquieren la capacidad de superar las limitaciones que la MEC impone sobre su multiplicación, para proliferar y sobrevivir de forma autónoma (Hanahan y Weinberg, 2000). En este contexto, la MEC proporcionaría el sustrato básico para la adherencia y migración celular, y moléculas que fomentarían las habilidades malignas adquiridas por la célula transformada y, por todo ello, facilitaría la progresión neoplásica. (Borg, 2004; DeClerck y cols., 2004).

Sin embargo, una serie de estudios recientes sugieren que la MEC podría tener un papel mucho más activo en la biología tumoral, e incluso participar en la transformación de la célula normal a cancerosa y en los estadios iniciales de la génesis tumoral. Según estos estudios, determinadas alteraciones físicas (p.e. fibrosis y rigidez de la matriz) o moleculares (p.e. incremento de la expresión de la metaloproteinasa 3 – MMP-3- y la matriptasa) de la MEC que se observan en los tumores podrían participar

en la transformación celular maligna mediante la activación de vías de señalización intracelular oncogénicas (Comoglio y Trusolino, 2005). De hecho, la fibrosis tisular incrementa el riesgo de aparición de un tumor (Radisky y cols., 2007).

Otra perspectiva desde la que la MEC tumoral adquiere relevancia terapéutica es la de la barrera física que supone para el paso de macromoléculas. Este es uno de los aspectos en el que se enmarca este trabajo de Tesis doctoral. La MEC, en términos generales, constituye en la mayoría de los tejidos una limitación decisiva para el paso de macromoléculas que, salvo en estados patológicos inflamatorios, no penetran fácilmente en los tejidos. Además, hay que considerar que, como se ha comentado en el apartado 3.4, la MEC tumoral es incluso más densa y rígida que la del tejido normal circundante, debido fundamentalmente a la mayor deposición de colágenos y otros constituyentes (Comoglio y Trusolino, 2005). El origen de la fibrosis tumoral es desconocido. En el estroma tumoral, las fuentes de sobreproducción de MEC podrían ser los miofibroblastos, que proceden de la transición epitelio-mesenquimal de células epiteliales (Radisky y cols., 2007). En el parénquima tumoral, los candidatos más lógicos son las propias células tumorales, aunque poco se sabe de su capacidad de síntesis de elementos de MEC. La fibrosis tumoral reduce aún más la permeabilidad del parénquima tumoral a moléculas de elevado tamaño, como las inmunotoxinas. Por ello, el conocimiento de los aspectos fisiopatológicos que regulan la producción y formación de la MEC en los tumores podría tener una gran relevancia terapéutica. La inhibición de la producción de MEC podría hacer más permeable el parénquima tumoral y, por lo tanto, accesible a las herramientas farmacológicas dirigidas, que de otra forma no acceden a las células diana. En este planteamiento hay que considerar que las características del lecho vascular tumoral hacen especialmente viable esta hipótesis terapéutica.

4.1. La matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional organizada, formada por el ensamblaje de una variedad de polisacáridos y de proteínas secretadas por las células, que actúa como elemento estructural en los tejidos y también influye en su desarrollo y su función (Alberts y cols., 1996). Supone un entorno molecular muy complejo que proporciona a las células el soporte elástico necesario para su unión adecuada en estructuras tridimensionales (Comoglio y Trusolino, 2005). Pero la MEC no sólo tiene una función mecánica en el mantenimiento de los tejidos. También

controla el flujo de nutrientes y señales a las células (Stetler-Stevenson y cols., 1993) ya que se comporta como reservorio de moléculas que, a su vez, actúan sobre las células y modifican algunas de sus funciones como la proliferación, la supervivencia y la migración. (Comoglio y Trusolino, 2005).

Existen dos tipos de MEC claramente identificables: la membrana basal, formada por una capa de matriz condensada que es sintetizada fundamentalmente por las células que se apoyan en ella, y la matriz intersticial. Ambos tipos de MEC tienen una base común formada por un esqueleto de fibras de colágeno. Los tipos de colágeno que forman parte de este esqueleto son diferentes y esto provoca que la estructura tridimensional de ambas sea distinta. En esta red de colágeno se van a incorporar moléculas de proteoglicanos o glicoproteínas y las células epiteliales, endoteliales, músculo liso y fibroblastos, además de otros tipos celulares (von der Mark y cols., 1992).

4.1.1. Composición de la MEC.

Lo que distingue a unas matrices extracelulares de otras es la cantidad, la proporción y el tipo de cada una de estas macromoléculas (Alberts y cols, 1996). Las principales moléculas que constituyen la MEC se describen a continuación:

- **Colágenos.** Es una proteína fibrosa altamente insoluble que supone el soporte ideal para el organismo debido a su alta flexibilidad y resistencia a la tensión y tracción. Son los componentes mayoritarios de la MEC. Tiene una estructura helicoidal de tres hebras, en la cual tres cadenas polipeptídicas de colágeno denominadas cadenas α , se enrollan sobre sí mismas formando una superhélice levógira. Las cadenas α contienen secuencias repetidas glicina-X-Y, donde X e Y son dos aminoácidos cualquiera, en general prolina o lisina. El centro de la hélice suele ocuparse por residuos de glicina debido a imposiciones estéricas y las cadenas laterales de X e Y se encuentran en el exterior de la cadena por lo que permiten las interacciones laterales, particularmente con otras hélices triples (van der Rest y Garrone, 1991). Las características de los colágenos también se deben a modificaciones *postranscripcionales*, como por ejemplo la hidroxilación de prolina que se encuentra en posición Y (Ezer y cols., 1999). Debido a su estructura, la función principal de estas proteínas es proporcionar a los tejidos resistencia a la distensión pero además están implicados en procesos de adhesión y migración celular, cáncer, angiogénesis, morfogénesis y reparación tisular. Se han clasificado varios tipos de colágeno en función de las distintas series de cadenas polipeptídicas que, a su vez pueden unirse formando homo o heterotrímeros. Existen

más de 34 miembros diferentes de cadenas α , que difieren en la estructura primaria, y hasta el momento se han identificado más de 27 tipos de moléculas de colágeno (Shaw y Olsen, 1991; van der Rest y Garrone, 1992; Brown y Timpl, 1995). La organización de las moléculas de colágeno en estructuras macromoleculares tridimensionales es variada.

Dependiendo de su organización y su función los colágenos se pueden clasificar en varios tipos:

- Colágenos que forman fibrillas (tipo I, II, V y XI). En los tejidos que están sometidos a numerosas fuerzas de tensión y extensión (como son el hueso, el cartílago, los tendones y la piel). El colágeno se sintetiza en el interior celular en forma de procolágeno, formado por 3 subunidades α inmaduras y posteriormente es excitado. Tras la liberación, sufre una modificación enzimática que elimina unas secuencias terminales de cada cadena α , transformando el procolágeno en colágeno. Tras ello las moléculas de colágeno se ensamblan automáticamente para formar fibrillas de colágeno (Kadler y cols., 1996; Van der Rest y Garrone, 1992). Son los más abundantes y el más frecuente es el colágeno tipo I que representa el 90% de todo el colágeno del organismo.
- Colágenos que forman redes o mallas (tipo IV, VIII y X). Las estructuras que forman no son tan evidentes como la de los colágenos fibrilares, sino que se encuentran rodeando los órganos o formando la base de los epitelios. Mención especial requiere el colágeno tipo IV, que es el principal componente estructural de la membrana basal, localizada entre el epitelio y el tejido conectivo. Es mucho más grande que el resto de los colágenos y procolágenos y apenas se procesa cuando se deposita en la matriz. Su triple hélice se interrumpe frecuentemente para ofrecer una mayor flexibilidad. Esta molécula también tiene un segmento en forma de triple hélice pequeña denominado dominio 7S (Timpl y cols., 1981; Van der Rest y Garrone, 1992). La membrana basal, por lo tanto estará formada por finas redes acordonadas de colágeno IV que se entrelazan todas juntas y atrapan grandes moléculas asociadas como laminina o el heparán sulfato (Van der Rest y Garrone, 1992).
- Colágenos que establecen conexiones (tipo IX, XII y XIV). Se denominan FACITs (del inglés, fibril-associated collagens with interrupted triple helices). Se encuentran en los tejidos en cantidades pequeñas. Forman puentes de unión entre moléculas de la MEC y el colágeno fibrilar o el colágeno que forma mallas. Por ejemplo, el colágeno tipo IX forma uniones entre los glicosaminoglicanos y las fibras de colágeno tipo II (Wu y cols., 1992; Van der Rest y Garrone, 1992). Otro ejemplo es el colágeno tipo VI, que une microfibrillas en forma de cuenta de rosario.
- Colágenos con dominios transmembrana: poseen secuencias de aminoácidos hidrofóbicos que pueden internarse en la membrana plasmática. Por ejemplo, el colágeno tipo XVII forma parte de la estructura de los hemidesmosomas (Maertens y cols., 2007). Actualmente, la identificación de colágenos transmembrana precursores de péptidos bioactivos con funciones paracrinas es una nueva fuente de estudio (Kadler y cols., 2007).

El colágeno es sintetizado mayoritariamente por fibroblastos, miofibroblastos, osteoblastos y condrocitos. Algunos tipos de colágenos, como el colágeno IV de las membranas basales, también son sintetizados por las células sobre las que se

encuentran depositados, como son las epiteliales, endoteliales y mesoteliales (Brown y Timpl, 1995; Kadler y cols., 2007; Shaw y Olsen, 1991; van der Rest y Garrone, 1991). En el tumor, la síntesis de la MEC en general es desconocida. Los miofibroblastos podrían ser los responsables de la sobreproducción de la MEC, que proceden de la transición epitelio-mesenquimal de células epiteliales (Radisky y cols., 2007). En el parénquima tumoral, las propias células tumorales podrían encargarse de la síntesis de elementos de MEC, pero esta afirmación está por estudiarse.

- **Glicosaminoglicanos.** Son polímeros no ramificados de azúcares que pueden formar cadenas muy largas. Están formados por repeticiones de parejas de azúcares donde uno de ellos tiene un grupo amino (N-acetilgalactosamina o N-acetilglucosamina) y el otro es normalmente la galactosa o el ácido glucurónico. Estos azúcares poseen grupos carboxilo (COO⁻) y grupos sulfato (SO₃⁻), cuyas cargas negativas permiten la asociación con moléculas de agua, hidratando así a la MEC. Los glicosaminoglicanos son poco flexibles por lo que ocupan un gran volumen y gracias a su fuerte hidratación hacen que la MEC se comporte como un gel. Esta propiedad de los glicosaminoglicanos capacita a la matriz para resistir a las fuerzas de compresión, de manera que constituyen un soporte mecánico para los tejidos y al mismo tiempo facilitan la difusión de moléculas hidrosolubles y la migración celular. Los tipos más comunes de glicosaminoglicanos son el ácido hialurónico y los glicosaminoglicanos sulfatados: condroitín sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato y heparán sulfato (Gandhi y Mancera, 2008).

- **Glicoconjugados:**

- Proteoglicanos: Los proteoglicanos son moléculas grandes constituidas por un núcleo proteico al que se unen una o varias cadenas de glicosaminoglicanos sulfatados. Los proteoglicanos son sintetizados en el interior celular, y la mayoría son exocitados al espacio intercelular, pero algunos pueden localizarse en la membrana plasmática gracias a que su parte proteica contiene secuencias de aminoácidos hidrófobos que se insertan entre las cadenas de ácidos grasos de la membrana (Ruoslahti, 1988). Los proteoglicanos se diferencian sobre todo en la secuencia y en la longitud de la cadena de aminoácidos (desde 100 a 4.000 aminoácidos). También se diferencian en el número y en el tipo de moléculas de glicosaminoglicanos que tienen unidos (Hardingham y Fosang, 1992).

Los proteoglicanos y los glicosaminoglicanos forman grandes polímeros que se asocian con proteínas fibrosas como el colágeno y con redes proteicas como la lámina basal que crean estructuras muy complejas (figura 6).. En principio los proteoglicanos son muy heterogéneos y es difícil agruparlos, aunque pueden dividirse en varias subfamilias atendiendo a la homología del núcleo proteico (Iozzo y Murdoch, 1996).

La mayoría de las funciones de los proteoglicanos se deben a las cadenas de glicosaminoglicanos: hidratación, resistencia a presiones mecánicas, lubricantes, todas ellas intervienen en la diferenciación, la movilidad y la fisiología celular, etc. (Kresse y Schonherr, 2001; Tumova y cols., 2000).

- Glicoproteínas multifuncionales: Son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios hidratos de carbono. Las principales encontradas en la matriz extracelular son: fibronectina, laminina, tenascina, trombospondina y otras glicoproteínas de adhesión presentes en la matriz extracelular como el fibrinógeno, que une receptores de superficie de las plaquetas y permite la coagulación sanguínea.

Fibronectina: Es una gran glicoproteína de “adhesión celular” constituida por dos subunidades (cadena A y B) unidas mediante puentes disulfuro cerca del extremo carboxi-terminal (von der Mark y cols., 1992). En su estructura se ha identificado el dominio RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), una secuencia tripeptídica específica que interviene en la unión de proteínas de la MEC con receptores de membrana como las integrinas (Hynes, 1986; Main y cols., 1992; Dickinson y cols., 1994). Es excretada por las células mesenquimales y se une en las matrices insolubles, interactúa con fibrina, colágenos y proteoglicanos, e interviene en importantes funciones biológicas en el desarrollo embriológico así como tejidos de respuesta al daño (Limper y Roman, 1992). Se ha visto que promueve la adhesión y “extensión” de las células epiteliales y mesenquimales, estimula la proliferación y migración de las células tumorales embrionarias, y controla la diferenciación, la forma celular y la organización del citoesqueleto mediante la deposición de matrices ricas en fibronectina en localizaciones específicas (von der Mark y cols., 1992; Limper y Roman, 1992).

Laminina: Son componentes α - β - γ -heterotriméricos (Miner, 2008; Colognato y Yurchenco, 2000) cuyo papel principal es el de organizar y estabilizar la membrana basal. Los diferentes monómeros dan lugar a hasta 15 trímeros con forma de cruz, de “Y” o de bastón (Miner, 2008). Es la glicoproteína de “adhesión” celular principal de la membrana basal y no sólo sirve como sustrato adhesivo de las células epiteliales y mesenquimales, sino que también es capaz de inducir y controlar varias actividades biológicas: potencia la proliferación y movilidad de las células tumorales, induce la polarización y la diferenciación de las células epiteliales mamarias, de melanoma, endoteliales, etc (von der Mark y cols., 1992). Se ha visto que algunas lamininas se asocian entre sí para formar redes poliméricas que interactúan con receptores celulares como distroglicano e integrinas (Miner, 2008; Cheng y cols., 1997; Colognato y cols., 1999). Esas redes reclutan otras proteínas de la MEC confiriéndole a la membrana basal sus características de insolubilidad y altamente entrecruzada (Miner, 2008). Su estructura presenta dominios de unión a otras proteínas de la MEC como colágeno IV y entactina, y a receptores de la superficie celular (Aumailley y Krieg, 1996).

El sistema elástico: Son agregados insolubles de proteínas que tienen la capacidad de estirarse en respuesta a las tensiones mecánicas y de contraerse para recuperar su longitud inicial en reposo. Están formados por la *elastina*, que es un polímero insoluble, constituido por moléculas solubles de tropoelastina, y por una glicoproteína denominada fibrilina. La elastina y la fibrilina son proteínas ubicuas del tejido conectivo encargadas de formar las fibras elásticas. La disposición en forma de red adoptada por estas fibras permite a los tejidos recobrar su conformación inicial después de una deformación transitoria (Cleary y Gibson, 1983), aportando sostén a los tejidos y regulando la actividad de los factores de crecimiento (Kielty, 2006). La tropoelastina está formada por cadenas de polipéptidos con 800 residuos pequeños no usuales, derivados de la lisina y denominados desmosina e isodesmosina. Esta composición de aminoácidos es la que le confiere las propiedades elásticas, ya que son hidrófobos y éstos pueden disponerse en estructuras enrolladas. La lisina facilita la formación de hélices donde se enlazan dos moléculas de elastina próximas (Kielty, 2006). Durante el proceso de desarrollo de una fibra elástica, el componente fibrilar es el primero en formarse, seguido de los depósitos de elastina. Ambas se asocian por interacción iónica entre la elastina y la superficie microfibrilar, ya que sus cargas son opuestas. Existen dos tipos de tropoelastina en función de la maduración del tejido y del animal y, por lo tanto, en función de su secuencia polipeptídica; tropoelastina A y B. Dentro de esta red elástica se encuentran intercaladas las fibras de colágeno, que limitan la capacidad de extensión.

4.1.2. Degradación de la matriz extracelular.

La MEC está sometida a una remodelación constante mediante un proceso continuo que implica un balance entre la degradación de los componentes existentes y la síntesis y deposición de nuevas proteínas (Stetler-Stevenson, 1996; Waller y Nicholson, 2001). La degradación de la MEC está mediada por proteasas específicas que son secretadas localmente por las células. Estas proteasas pertenecen

fundamentalmente a dos familias: la de las metaloproteasas de la matriz (MMPs) y la del plasminógeno y la plasmina (Ye y cols., 1998).

Es probable que los procesos fibróticos también sean debidos a un déficit en la degradación de la MEC, aunque se ha demostrado que la acumulación anormal de MEC está precedida por un aumento en la expresión de enzimas que la degradan ya que, probablemente, sea necesario incrementar la actividad proteolítica y así reemplazar los componentes de la MEC normal por moléculas que aparecen en situaciones patológicas (Stetler-Stevenson, 1996).

• **Metaloproteasas de la matriz (MMPs).** Pertenecen a una familia de metaloendopeptidasas que necesitan unirse a iones zinc (Zn^{2+}) o calcio (Ca^{2+}) para poder actuar. Se han identificado más de 20 miembros diferentes y todos presentan especificidad de sustrato. Con este criterio podemos dividirlos en 5 subgrupos: colagenasas, gelatinasas, estromielisinas, elastasas y metaloproteasas “tipo membrana” (MMPs-TM). Estas últimas permanecen unidas a la membrana celular y además de degradar proteínas de la MEC, son capaces de activar a otras MMPs (Nagase y Woessner, 1999). La actividad de las MMPs está estrictamente controlada ya que influyen de manera importante en la integridad del tejido. Este control se produce en tres niveles:

1. **Transcripcional:** Las MMPs tienen una baja expresión constitutiva en la mayoría de los tejidos. Numerosas citoquinas y factores de crecimiento como interleuquina 1 (IL-1), TGF- β y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) pueden inducir su expresión (Katsura y cols., 1989; Matrisian, 1990; Martin y cols., 1994).

2. **Activación extracelular:** A excepción de las MMPs-TM, todas las demás MMPs son secretadas de forma inactiva. Su activación requiere la liberación proteolítica de un propéptido por una proteinasa plasmática y un cambio de conformación de un motivo Cys- Zn^{2+} (Nagase, 1997). Existen varias enzimas proteolíticas encargadas de la activación de las MMPs, como el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA), la plasmina y la catepsina G (Carmeliet y cols., 1997). Una vez activadas, las MMPs son capaces de activar otras MMPs (Crabbe y cols., 1994).

3. **Inhibición:** Los inhibidores titulares de las metaloproteasas (TIMPs) son los inhibidores endógenos de la actividad de las MMPs más estudiados; se han descrito 4 TIMPs diferentes (Murphy y Willenbrock, 1995; Gómez y cols., 1997). Estos inhibidores son específicos de determinadas proteasas, se unen fuertemente a la enzima en forma latente o activada, y bloquean su actividad (Imai y cols., 1996).

• **Cascada plasminógeno/plasmina.** La plasmina es una serínproteasa sintetizada como un precursor, el plasminógeno. El paso de plasminógeno a plasmina es estimulado por los activadores del plasminógeno (activador del plasminógeno tipo tejido, t-PA y tipo uroquinasa, u-PA). A su vez la actividad de estas dos enzimas, t-PA y u-PA, es inhibida por el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y tipo 2 respectivamente (PAI-1 y 2). Además de su papel en la fibrinólisis, la plasmina tiene un papel importante en la degradación de proteínas de la matriz. Puede actuar directamente sobre componentes de la matriz como laminina, fibronectina, tenascina y colágeno IV y V; o indirectamente activando determinadas MMPs que degradan otros componentes de la MEC (McLennan y cols., 1999; Waller y Nicholson, 2001; Sternlicht y Werb, 2001).

4.1.3. Interacciones de la matriz extracelular con las células.

Las interacciones entre las células y la MEC están mediadas por las integrinas, aunque algunos proteoglicanos también pueden realizar esta función. La MEC desarrolla sus funciones a través de estas proteínas, por ello, la mayor o menor deposición de MEC regulará los procesos en los que intervienen las integrinas y que desarrollamos a continuación.

Las integrinas son una gran familia de proteínas de la membrana que reconocen su sustrato con mucha especificidad, de manera que cada tipo celular expresa una serie de integrinas adecuadas para el reconocimiento de la matriz que le rodea (Ruoslahti, 1991; Eckes y cols., 2000). Constituyen heterodímeros transmembrana formados por cadenas α y β unidas de forma no covalente con un dominio intracelular que interacciona con el citoesqueleto y otro extracelular globular que es capaz de unirse a colágeno, otras integrinas y lamininas (Hynes, 1992). Este enlace entre la MEC el y citoesqueleto aporta continuidad mecánica entre el exterior y el interior de la célula y es fundamental para modificar el comportamiento de ésta en función de las moléculas presentes en la MEC. Estas conexinas activan e inhiben mecanismos de señalización intracelular y provocan respuestas celulares relacionadas con la adhesión, la migración y la proliferación (Hynes, 1992).

Las integrinas suelen aparecer asociadas a la membrana plasmática formando las denominadas adhesiones focales que son las encargadas de interaccionar con el citoesqueleto de actina (figura 6). La unión de un ligando a las integrinas hace que se agrupen, se recluten moléculas de unión al citoesqueleto dentro de los complejos de adhesión y se anclen a fibras de estrés de actina, se reorganice el citoesqueleto y se produzca una cascada de señalización celular, que incluyen pequeñas GTPasas (Clark y Hynes, 1996; Price y cols., 1998) proteínas kinasas (Ferrell y Martin, 1989; Golden y Brugge, 1989; Lipfert y cols., 1992) y kinasas lipídicas (King y cols., 1997).

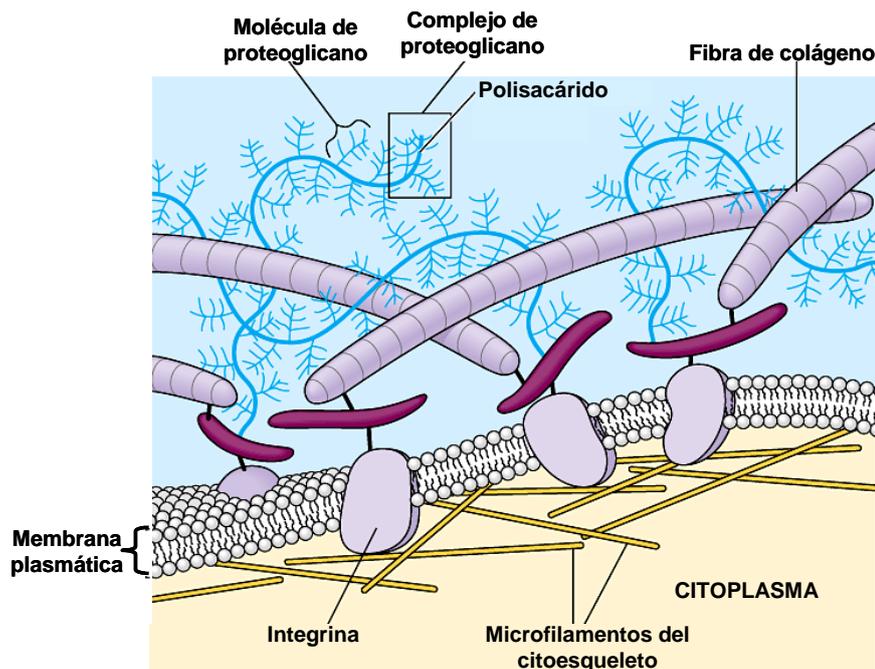


Figura 6. Estructura de la matriz extracelular.

5. SUPERFAMILIA RAS. GTPASAS RHO.

La superfamilia Ras es un grupo de proteínas G (proteínas de unión a nucleótidos de guanina) monoméricas con una masa molecular entre 20 y 40 kDa. Se caracterizan por tener actividad GTPasa intrínseca, es decir, que pueden unir e hidrolizar GTP. Son capaces de ciclar entre un estado activo (unidas a GTP), y uno inactivo (unidas a GDP). De este modo actúan como “interruptores” o transductores moleculares para controlar procesos celulares complejos (Etienne-Manneville y Hall, 2002; Konstantinopoulos y cols., 2007; Tang y cols., 2008).

La mayoría de los autores subclasifican a la superfamilia Ras en 5 familias: Ras, Rho/Rac, Rab, Arf y Ran (Wennerberg y cols., 2005; Konstantinopoulos y cols., 2007):

- **Familia Ras:** Está formada por cuatro proteínas que se traducen a partir de tres genes RAS: H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras 4B (estos dos últimos son las isoformas obtenidas por el *splicing* alternativo de un único gen). Las proteínas de Ras activan la cascada RAF/MEK/ERK que media el crecimiento celular y la entrada en el ciclo celular por fosforilación de factores de transcripción como c-FOS, ELK1 y MYC; también fosforila las kinasas RSK (kinasa de la proteína ribosomal S6) o MNK (serina – treonina kinasa relacionada con MAPK) y la cascada PI3K/AKT que controla la supervivencia, el crecimiento y el metabolismo celular (figura 3).

- **Familia Rab:** Aproximadamente hay 60 proteínas Rab codificadas en el genoma humano que en total suman aún más debido al *splicing* alternativo. Regulan la internalización celular mediada por receptores, la formación de vesículas y el tráfico de éstas a los diferentes lugares celulares, incluyendo el núcleo, los lisosomas y la membrana plasmática. Mediante la regulación del tráfico por endocitosis integran multitud de cascadas de señalización relacionadas con la proliferación, la apoptosis y la migración.

- **Familia Arf:** Se han identificado 6 proteínas Arf en mamíferos clasificadas en tres clases: la clase I (Arf 1, 2 y 3) están relacionadas con el ensamblaje de diferentes proteínas que forman vesículas activadoras de enzimas, la clase II (Arf 4 y 5) encargada del transporte en el aparato de Golgi y la clase III (Arf 6) relacionada con la organización de la superficie celular. Se sabe que tanto Arf 1 como Arf 6 están implicadas en la carcinogénesis ya que regulan la adhesión celular, la migración y la invasión tumoral.

- **Familia Rho:** Está formada aproximadamente por 25 miembros codificados por 20 genes y divididos en seis subfamilias diferentes en función de su secuencia y funciones: las proteínas relacionadas con RhoA (RhoA, RhoB y RhoC que son idénticas en un 85% de los aminoácidos), las relacionadas con Rac-1 y con Cdc42 y otros tres grupos más que carecen de actividad GTPasa: Rnd, RhoBTB y Miro (Sahai y Marshall, 2002; Wennerberg y cols., 2004).

RhoA fue descubierta en 1985 como una proteína relacionada con la superfamilia de proteínas Ras (Rho, del inglés, *Ras homologous*): (Madaule y Axel, 1985). A partir de ese momento diferentes estudios demostraron que Rho, Cdc42 y Rac (las proteínas Rho mejor estudiadas) estaban involucradas en vías de señalización a través de las cuales los receptores de membrana modificaban la organización de filamentos de actina, la motilidad y la adhesión celular. Por ello las proteínas Rho están involucradas en procesos celulares relacionados con el citoesqueleto como son la polaridad celular, el dinamismo microtubular y el transporte vesicular. Sin embargo, Rho también participa en diferentes procesos enzimáticos y en la regulación de la expresión génica, promueve la progresión del ciclo celular a través de la fase G1 regulando la ciclina D1 y los CDKs (inhibidores de las CDKs) p21 y p27. Además, está relacionado con la transición epitelio-mesenquimal y promueve la invasión y la metástasis (Konstantinopoulos y cols., 2007).

5.1. Modificaciones *post-traduccionales* de la familia Ras y Rho.

La superfamilia Ras, a su vez, es miembro de otra clase de proteínas denominadas proteínas CAAX. Éstas contienen un dominio CA_1A_2X en su extremo carboxilo, donde C = cisteína, $A_{1,2}$ = aminoácido alifático y X = cualquier aminoácido. El dominio CAAX sirve como sustrato para una serie de modificaciones *post-traduccionales* que tienen como fin conseguir un dominio lipídico en el extremo carboxi terminal que media en la unión a otras proteínas y a las membranas (Konstantinopoulos y cols., 2007). A continuación se describen las modificaciones *post-traduccionales* más importantes y sus aspectos biológicos:

5.1.1. Prenilación.

La prenilación es la unión covalente de uno o más isoprenoides a residuos de cisteína del extremo carboxilo de la proteína. Los isoprenoides pueden ser un grupo farnesilo con 15 átomos de carbono, obtenido a partir de tres entidades isoprenoides, o un grupo geranilo (geranilgeranilo) con 20 átomos de carbono, sintetizado a partir de cuatro unidades (Benetka y cols, 2006). Sus donadores son el farnesil pirofosfato (FPP) y el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) respectivamente, que son productos del metabolismo del mevalonato, como se describirá posteriormente. La GGPP sintasa cataliza la condensación de FPP e isopentilpirofosfato en geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Tanto el GGPP como el FPP son utilizados por las geranilgeranil transferasas (GGTasas I y II), y las farnesil transferasas (FTasas) respectivamente, para la isoprenilación *post-traduccional* de las proteínas cuyo extremo carboxilo termina en una secuencia CA_1A_2X . La FTasa “prefiere” que X sea una serina o una metionina, mientras que la GGTasa I “prefiere” que X sea una leucina o una isoleucina. La GGTasa II prenila proteínas Rab con un extremo XXCC o XCX, donde X es cualquier aminoácido, (McGuire y Sebtí, 1997; Sinensky, 2000).

Se piensa que los grupos isoprenoides asociados a las proteínas “CAAX” no sólo actúan como un “pegamento” hidrofóbico que mantiene anclada la proteína a la membrana, sino que participan en el reconocimiento específico en interacciones de tipo lípido-proteína (Cox y Der, 1992). Es aquí donde pueden existir más diferencias entre las proteínas farnesiladas y geraniladas (tabla 2).

PROTEÍNA	FUNCIONES PRINCIPALES	GRUPO PRENILO	TRANSFERASA
H-Ras	Crecimiento, diferenciación	15C	FT
K-Ras A	Crecimiento, diferenciación	15C	FT
K-Ras B	Crecimiento, diferenciación	15C	FT
N-Ras	Crecimiento, diferenciación	15C	FT
2',5' oligoadenylato synthetasa I	Crecimiento, diferenciación, y apoptosis	20C	GGT I
Rap1A I	Regulación de la adhesión celular	20C	GGT I
Rap1B	Activación de la cascada MEK-ERK	20C	GGT I
Rac1 I	Secreción de la membrana plasmática	20C	GGT I
RalA	Regulación del citoesqueleto de actina	20C	GGT I
RhoA	Ensamblaje de las fibras de actina de estrés y de los sitios de adhesión focal	20C	GGT I
RhoB	Ensamblaje de las fibras de actina de estrés y de los sitios de adhesión focal, transcripción genética	15C y 20C	GGT I
RhoC	Ensamblaje de las fibras de actina de estrés y de los sitios de adhesión focal	20C	GGT I
Rab1A, 1B, 2; 3a; 6	Tráfico vesicular	20C	GGT II
HDJ2	Proteína de importación a la membrana, co-capero de Hsp70	15C	FT
Proteína G heterotrimérica (subunidad γ)	Unido al receptor en serpentina	20C	GGT I
Laminina A y B	Componente de la membrana nuclear	15C	FT
Cenp-F	Proteína del centrómero (cinetocoro) para la transición a la fase G2/M	15C	FT
RhoE	Regulación del citoesqueleto de actina	15C	FT
Rap2a	Desconocido	15C	FT
Rap2b	Desconocido	20C	GGT I
Rheb	Desconocido	15C	FT

Tabla 2. Algunas de las proteínas preniladas. 15C = grupo prenilo de 15 átomos de carbono que corresponde al grupo farnesilo. 20C = grupo prenilo de 20 átomos de carbono que corresponde al grupo geranilgeranilo. FT= Farnesil transferasa. GGT I= Geranilgeranil transferasa I. GGT II= Geranilgeranil transferasa II (Benetka y cols., 2006).

En términos generales, las GTPasas Ras son farnesiladas por acción de la FTasa, aunque, cuando esta enzima es inhibida p.e. por acción de los inhibidores de FTasa

(FTIs)], N- y K-Ras pueden geranilarse alternativamente por acción de la GGTasa I. Los productos geranilados, al igual que los asociados al farnesilo, se localizan en la membrana y mantienen toda la actividad biológica (Philips y Cox, 2007). Esta es una causa de las resistencias observadas con el tratamiento con los FTIs (inhibidores de FTasa) estudiados como posibles agentes antitumorales. En cambio, H-Ras exclusivamente se farnesila.

Por su parte, las GTPasas Rho, son preniladas por acción de la GGTasa I, que incorpora un grupo geranilo a la cisteína del extremo carboxi-terminal. Mientras RhoA y RhoC exclusivamente se geranilan, RhoB principalmente se geranila, pero puede llegar a ser farnesilado (Turner y cols., 2007).

5.1.2. Modificaciones posteriores a la prenilación.

Tras la prenilación, las proteínas CAAX sufren nuevas modificaciones. Una endoproteasa las corta entre el residuo de cisteína y el A₁, lo que libera el tripéptido A₁A₂X y deja el grupo prenilcisteína en la última posición (Benetka y cols., 2006). Esta endoproteasa se encuentra en el retículo endoplásmico y es específica para las proteínas farnesiladas y geraniladas. A continuación, la cisteína prenilada del extremo carboxilo es metilada por una metil-transferasa denominada isoprenil carboximetil transferasa (ICMT), que utiliza la S-adenosinmetionina (SAM) como donador de un grupo metilo. La ICMT es común para sustratos farnesilados y geranilgeranilados (Sinensky, 2000; Benetka y cols., 2006; Konstantinopoulos y cols., 2007).

Tras esto, la familia Rho, no sufre ninguna modificación más ya que la hidrofobicidad que aporta el grupo geranilo con 20 átomos de carbono es suficiente para anclarse en la membrana. Rho se une a la proteína GDI (del inglés, *Guanosine nucleotide Dissociation Inhibitor*), que reconoce su grupo prenilo, lo que permite que el complejo Rho-GDI sea transportado por el citosol hasta llegar a la membrana plasmática (figura 7 a).

En cambio, la familia Ras sufre una serie de modificaciones adicionales ya que el grupo farnesilo es más pequeño y no aporta la suficiente hidrofobicidad para el anclaje funcional a la membrana (Hancock y cols., 1990) (figura 7 b). H-Ras, N-Ras, y la isoforma de K-Ras 4A, viajan al aparato de Golgi, donde sufren la palmitoilación (S-acilación) que da a la proteína mayor hidrofobicidad. Para su unión a la membrana son necesarias una serie de señales moleculares que determinan el tipo de transporte intracelular y su localización en balsas lipídicas (*rafts*, regiones ricas en colesterol), en

las caveolas, o en zonas desorganizadas de la membrana (Hancock y cols., 1990; Wright y Philips, 2006). Por el contrario, la isoforma K-Ras 4B no necesita ser palmitoilada ya que, cerca de la cisteína terminal, se une una cola polibásica rica en lisinas que le aporta la hidrofobicidad extra para el anclaje a la membrana (Benetka y cols., 2006). La isoforma K-Ras 4B probablemente se dirige a la membrana mediante la unión con los microtúbulos, aunque esto todavía no se ha confirmado (Plowman y Hancock, 2005; Plowman y cols., 2005).

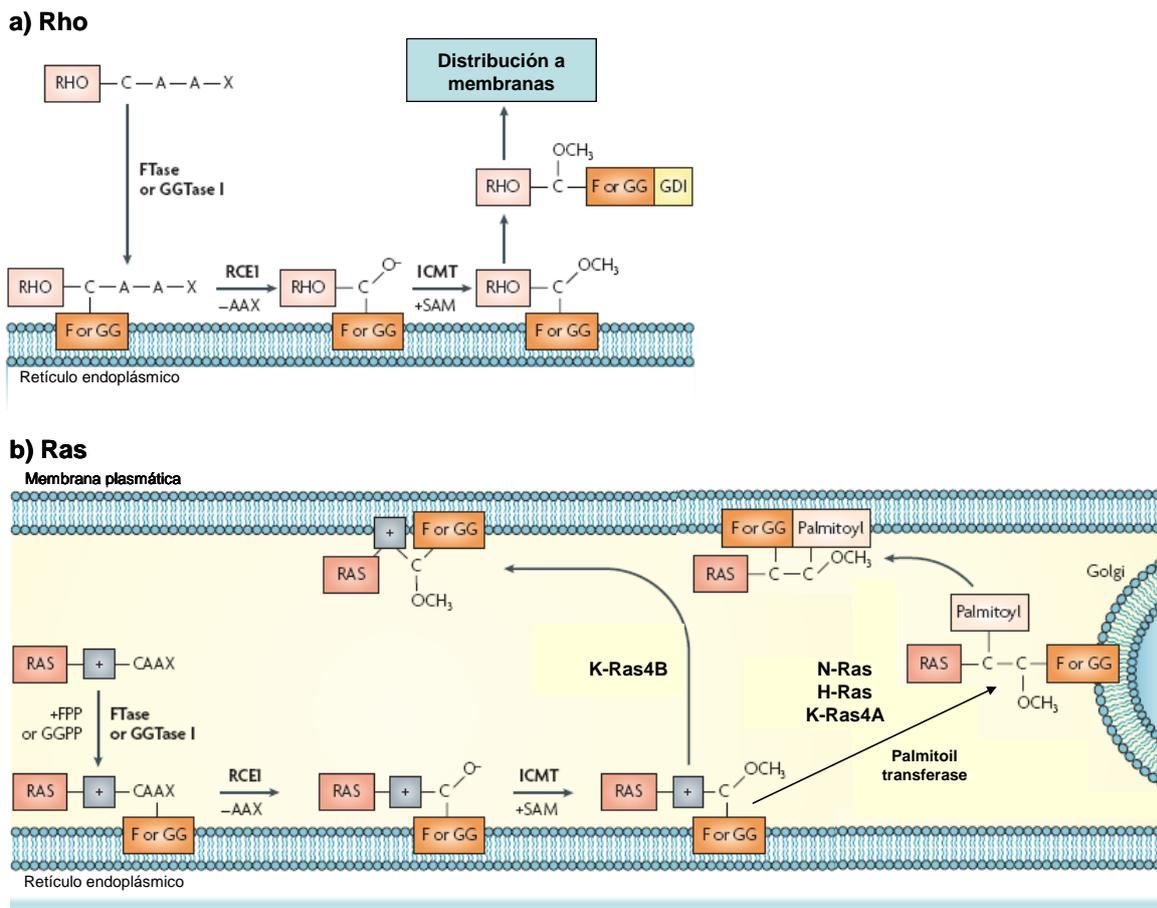


Figura 7. Esquema de las modificaciones posteriores a la traducción de las proteínas de la superfamilia Ras. La FTasa o la GGTasa I transfieren un grupo farnesilo o un grupo geranilgeranil al grupo tiol de la cisteína de la secuencia CAAX. El tri péptido C-terminal es eliminado por una endoproteasa específica en el retículo endoplásmico (RCEI). La isoprenil carboximetil transferasa (ICMT) une el grupo metilo procedente de la S-adenosinmetionina (SAM) a la cisteína carboxi-terminal. a) Familia Rho: Rho se une a GDI para poder ser soluble en el citosol y transportarse hasta la membrana plasmática b) Familia Ras: la isoforma K-Ras 4B, debido a su cola polibásica no necesita palmitoilación para localizarse en la membrana plasmática. El resto de las isoformas de Ras se palmitoilan por una palmitoil transferasa del aparato de Golgi que une los grupos palmitoil a las cisteínas cercanas al extremo carboxilo farnesilado (Konstantinopoulos y cols., 2007; Reuter y cols., 2000; Sinensky, 2000).

Se ha descrito que estas modificaciones realizadas tras la prenilación son necesarias para una correcta localización y realización de sus funciones en las proteínas farnesiladas como la familia Ras. En cambio, la inhibición de estas modificaciones en las proteínas geraniladas, como las de la familia Rho, no supone ninguna alteración de su correcta localización y función. Esto puede estar relacionado con la capacidad de GDI de reconocer al grupo geranilo de Rho sin necesidad de tener el extremo -AAX cortado y, por lo tanto, de transportarlo a las membranas. En cambio, aquellas GTPasas cuyo grupo isoprenilo no aporta suficiente hidrofobicidad requieren de las modificaciones *post-prenilación* para su tráfico hasta las membranas. Otra hipótesis se centra en el recambio de ambos tipos de proteínas para ser retiradas de la membrana: mientras las proteínas farnesiladas tienen una unión más débil a la membrana y un recambio más rápido, las proteínas que se geranilan, una vez localizadas en la membrana, incluso requieren chaperonas como las GDIs para ser retiradas (Michaelson y cols., 2005).

5.2. Regulación de la actividad de las proteínas Rho.

Las proteínas de la superfamilia Ras, *ciclan* entre la forma activa (unida a GTP) y la forma inactiva (unida a GDP). Para su activación requieren que la conformación inactiva se disocie y libere el GDP. Este es, generalmente, el paso limitante en el proceso de activación, tras el cual las proteínas están activas y son capaces de interactuar con sus efectores transmitiendo la señal. Concretando en las GTPasas Rho, el ciclo entre los estados activo e inactivo está controlado por cuatro proteínas (figura 8 y 23):

- **GEF** (del inglés, *Guanine nucleotide Exchange Factor*): factor de intercambio de nucleótidos de guanina, que cataliza el intercambio de GDP por GTP (Rossman y cols., 2005).

- **GAP** (del inglés, *GTPase-Activating Protein*): que estimula la actividad intrínseca de las GTPasas Rho, lo que conduce a su inactivación y evita su activación prolongada.

- **GDI** (del inglés, *Guanosine nucleotide dissociation Inhibitor*): inhibidor del intercambio de nucleótidos de guanina. Su nombre se debe a la capacidad de bloquear la disociación de GDP por las Rho GEFs y de extraer de la membrana las proteínas de Rho que se encuentran inactivas. Forma complejos solubles en el citoplasma en una proporción 1:1 con las proteínas de Rho preniladas e inactivas, es decir, unidas a GDP (Dransart y cols., 2005; Konstantinopoulos y cols., 2007). Así, las GDIs, actúan como

chaperonas aislando la parte hidrofóbica del extremo C-terminal de las proteínas Rho (Wright y Philips, 2006). Los complejos formados por Rho-GDI tienen toda la información necesaria para llevar a cabo el transporte preciso a las membranas. Suponen un nivel adicional de regulación que es exclusivo de las GTPasas Rho. En general las proteínas GDI se unen a Rho-GDP para bloquear el intercambio de GDP a GTP pero también se unen débilmente a Rho-GTP con un efecto inhibitorio en la actividad GTPasa intrínseca de la proteína. Es decir, que las GDIs son capaces de inhibir el ciclo GTP-GDP mediante dos mecanismos diferentes (Tang y cols., 2008).

- **GDF** (del inglés, *GDI Displacement Factor*): factor de reemplazo de GDIs. Reconoce específicamente las proteínas Rho, cataliza su disociación de las GDIs y subsecuentemente su envío a las membranas subcelulares específicas. Ejemplos de éstas son las proteínas EMR (erzina, moesina y radixina), que son los interconectores de la membrana plasmática y los filamentos de actina (Ivetic y Ridley, 2004; Konstantinopoulus y cols., 2007).

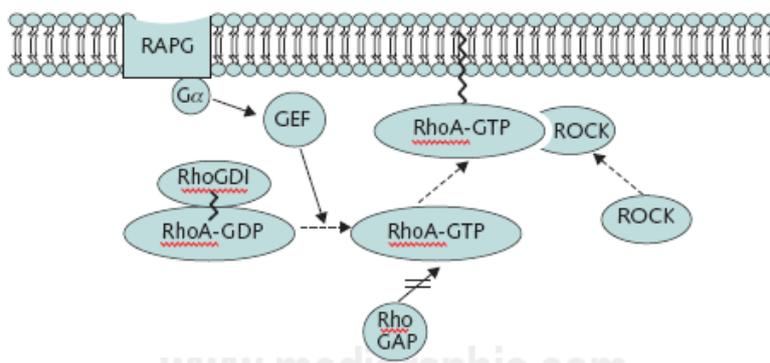


Figura 8. Regulación de la activación de Rho. Rho está en el citoplasma unido al inhibidor de la disociación de guanina (Rho-GDI) que la mantiene en su estado inactivo (unido a GDP). Cuando se activa algún receptor acoplado a proteínas G (RAPG), los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) promueven la separación de GDI y el intercambio de GDP por GTP. Éste es el estado activo de Rho y se transporta a la membrana citoplasmática para activar a sus efectores ahí, p.e. a ROCK. Finalmente, Rho-GTP cambia a Rho-GDP por la defosforilación realizada por la proteína activadora de GTPasa (GAP) (Sommer y Carbajal, 2009).

5.3. Importancia de Ras y Rho en la carcinogénesis.

Los genes RAS se identificaron por primera vez en los años 60 como oncogenes en el genoma de la cepa Harvey y Kirsten del virus del sarcoma de rata (Ras: Rat Sarcoma)(Harvey, 1964; Kirsten y Mayer, 1967). En 1981, Robert Weinberg, Michael

Wigler y Geoffrey Cooper descubrieron pequeños fragmentos de ADN en células cancerosas humanas que podían transformar fibroblastos normales de ratón en células malignas (Lane y cols., 1981; Perucho y cols., 1981; Shih y cols., 1981). Un año después, Barbacid y cols. establecieron que el elemento transformador era un homólogo de H-ras, el oncogen encontrado en el retrovirus causante del sarcoma de Harvey en ratas (Santos y cols., 1982).

Hasta la fecha se ha descrito que aproximadamente el 30% de los tumores humanos posee una mutación de Ras específica e identificable, y además, se ha detectado *sobreexpresión* y activación constitutiva de éstas (Tang y cols., 2008). El ciclo de las proteínas reguladoras GEFs y GAPs también está continuamente *desregulado* en la tumorigénesis. Todas las mutaciones de Ras oncogénico comprometen su actividad GTPasa y evitan que los GAPs hidrolicen el GTP manteniéndole, por tanto, constitutivamente activo (Konstantinopoulus y cols., 2007; Sahai y Marshall, 2002).

Como describiremos en el apartado siguiente, las funciones de la familia Rho están muy relacionadas con la transformación celular, la invasión y la metástasis. Es más, para la transformación mediada por Ras es necesario la implicación de muchas GTPasas Rho. Pero, a diferencia de la familia Ras, no se han descrito proteínas Rho mutadas o constitutivamente activas en tumores, algo que resulta curioso teniendo en cuenta que las alteraciones de sus funciones son cruciales para la tumorigénesis. En cambio sí se ha detectado su *sobreexpresión*, lo que se suele relacionar con cánceres altamente malignos (Sahai y Marshall, 2002; Tang y cols., 2008). Especialmente en el cáncer de mama, pulmón y colon se han encontrado niveles aberrantes de estas proteínas, particularmente de RhoA y RhoC, e *hiperactivación* de éstas (Tang y cols., 2008), ya que otro punto clave para la transformación relacionada con Rho es la alteración del ciclo entre las formas unidas a GDP y GTP (Sahai y Marshall, 2002; Tang y cols., 2008). Esto se produce por la alteración de las proteínas relacionadas con la regulación de la actividad y descritas en el apartado 5.2. Las Rho GAPs, que *bajorregulan* la actividad de Rho, frecuentemente se expresan en unos niveles menores de lo normal en varios carcinomas. Otro ejemplo son las mutaciones descritas en las RhoGEFs, las proteínas de la familia Dlb que dan lugar a las transformación maligna de las células (Rossman y cols., 2005; Narumiya y cols., 2009).

Todo ello apunta que la *sobreexpresión* y desregulación de estas proteínas es un punto clave en la transformación celular y, por tanto, se presupone que las GTPasas Rho son una diana tumoral potencial.

5.4. Efectores de Rho y sus funciones en la transformación celular

RhoA, B y C comparten el mismo grupo de efectores y la mayoría son kinasas, que controlan las funciones celulares por fosforilación. Dos de los principales efectores son ROCK (del inglés *Rho associated coiled-coil forming kinase*, también llamado ROK o Rho kinasa) y mDia (del inglés, *mammalian homolog of Drosophila diaphanous*). Se han identificado muchos otros, algunos de los cuales son proteínas de anclaje.

La acción principal de Rho a través de ROCK y mDia es la de inducir la conformación apropiada del citoesqueleto de actina; las fibras de estrés y el anillo contráctil formado durante la fase de citocinesis. Ambas estructuras están formadas por filamentos de actina antiparalelos entrecruzados con miosina. Es, por tanto, lógico que Rho induzca la producción de los filamentos de actina y la activación de la miosina y localice los haces de actomiosina en diferentes lugares de la célula en función de la fase del ciclo celular. mDia se encarga de catalizar la “nucleación” y polimerización de filamentos de actina largos y rectos (Goode y Erk, 2007) mientras que ROCK es una serina-treonina kinasa que puede fosforilar a la subunidad de unión a miosina de la miosina fosfatasa entre otros sustratos (Riento y Ridley, 2003), y directamente a la cadena ligera de la miosina (Narumiya y cols., 2009). Como consecuencia de ambas fosforilaciones se estimula el entrecruzamiento de las cadenas de actina por contractilidad de la actomiosina.

ROCK, en una acción tardía, también fosforila y activa la LIM-kinasa, que en cambio fosforila e inactiva la cofilina, factor despolimerizante de actina (Maekawa y cols., 1999; Narumiya y cols., 2009), lo que permite la estabilización de los filamentos de actina al evitar su despolimerización y corte. Es presumible que estas acciones se combinen con la inducción de la expresión de los haces de actomiosina posteriormente (Watanabe y cols., 1999; Narumiya y cols., 2000; Narumiya y cols., 2009).

La señalización activada por Rho que deriva del efector mDia da lugar a la activación de Rac a través de la activación de Src y posterior fosforilación de del complejo Cas/Crk/DOCK180. Precisamente este complejo es inhibido por la activación de ROCK. Por tanto, ambos efectores de Rho, ROCK y mDia tienen efectos antagónicos en la activación de Rac y el balance entre ambos determinará la forma y el patrón de las fibras de estrés (Tsuji y cols., 2002, Arakawa y cols., 2003; Narumiya y cols., 2009). Esta no es la única acción en la que ambos efectores de Rho tienen acciones apuestas. ROCK, a través de la contracción de actomiosina favorece la ruptura de las uniones adherentes,

mientras mDia es necesario para que conseguir una interfase dinámica entre las células y mantener las uniones adherentes (Sahai y Marshall, 2002; Narumiya y cols., 2009). Esta dualidad puede estar muy relacionada con el constante de disociación (K_d) de los dominios de unión a Rho de ambos efectores: Cuando hay altas cantidades de Rho-GTP, principalmente actúa ROCK dando lugar a la contracción de actomiosina mientras que, cuando los niveles de Rho-GTP son bajos, actúa mDia estabilizando la formación de uniones adherentes (Arakawa y cols., 2003).

- **Migración.** Las células que migran se adhieren a la MEC. Estas adhesiones son usadas como zonas para propulsar el cuerpo celular hacia adelante y posteriormente se desarticulan para permitir el movimiento de la célula. Tanto la actina como los microtúbulos actúan en esta sucesión de eventos para permitir la migración. La polimerización de actina se produce en la zona delantera dando lugar a la protusión de la membrana y la asociación del citoesqueleto de actina con las integrinas regula la unión a la MEC. Se ha demostrado que la migración está regulada por Cdc42, y Rac (Allen y cols, 1998; Nobes y Hall, 1999; Narumiya y cols., 2009). Pero la acción de Rho en la migración no está clara, entre otras razones porque la inhibición de Rho inhibe la adhesión celular casi completamente y esto dificulta el análisis (ver apartado 3 de Resultados y Discusión) (Nobes y Hall, 1999; Narumiya y cols., 2009). Se sabe que ROCK actúa en la retracción de la cola, es decir para la desadhesión de la célula al sustrato. mDia, en cambio, colabora con Cdc42 y Rac facilitando sus actividades.

- **Invasión y metástasis.** Teniendo en cuenta la implicación de Rho en la adhesión celular y la migración, es lógico pensar que también tiene un papel en la metástasis tumoral, Es más, aquellos cánceres altamente invasivos muestran *sobreexpresión* de RhoA y RhoC (Sahai y Marshall, 2002; Tang y cols., 2008). Pero es difícil extrapolar los resultados obtenidos en la migración al complicado escenario tumoral. La relación de RhoC con la metástasis se ha demostrado en varios estudios pero su mecanismo de acción no está claro todavía, aunque sí se conoce que RhoC interacciona con ROCK incluso más eficientemente que RhoA, lo que puede dar lugar a la rotura de las uniones adherentes existentes entre las células y desarrollar todos los mecanismos explicados anteriormente por la migración celular. En general la literatura relacionada con la progresión tumoral es confusa, y estudios diferentes han señalado acciones opuestas para las proteínas de Rho (Sahai y Marshall, 2002). Puede ser que las diferentes funciones que Rho se desarrollen en estadios del cáncer diferentes y en lugares diferentes de la célula. Se conoce la necesidad de la actuación de ROCK *in vitro*

para que las células adquirieran la capacidad de invasión (Itoh y cols., 1999), pero la acción de ROCK en el proceso de migración *in vivo* es más compleja, ya que la invasión debe hacerse en un entorno tridimensional formado por una red fibrilar de MEC. Por ello, otra función de ROCK es la de la degradación de la matriz extracelular mediante la activación de las metaloproteasas. Actualmente existen dos modelos para explicar el movimiento de las células tumorales en la invasión: uno más antiguo que se denomina *movimiento mesenquimal guiado por proteólisis* que se caracteriza por la activación de las MMPs de matriz, y el otro más moderno es el *movimiento ameboides conducido por actomiosina*, que se caracteriza por la fosforilación de la actomiosina por ROCK (Sahai y Marshall, 2002; Narumiya y cols., 2009). En el modelo antiguo se ha observado la formación de unas estructuras denominadas podosomas o invadopodia (Berdeaux y cols., 2004; Narumiya y cols., 2009): son profusiones de la membrana plasmática ricas en actina y asociados a la MEC, donde se acumulan las MMPs, siendo una zona con alta actividad proteolítica. Existen evidencias de la relación de Rho con la formación de estas estructuras a través de la activación de las quinasas Src.

- **Transformación de las células tumorales.** Como hemos señalado en el apartado anterior, a diferencia de Ras, no se han descrito mutaciones activas de las GTPasas Rho en tumores humanos, pero sí están *sobreexpresadas*. En el caso del cáncer de mama se han relacionado mayores niveles de RhoA con los grados más avanzados de la enfermedad (Tang y cols., 2008). RhoC también se ha relacionado con la mayor agresividad y capacidad metastásica en este tipo de cáncer (Tang y cols., 2008; Narumiya y cols., 2009). La *sobreexpresión* de las proteínas RhoA, Rac1 o Cdc42, ya sean sus formas nativas o los mutantes activados, solamente producen una transformación oncogénica débil. A parte de esto, se ha demostrado que cada proteína de la familia Rho es necesaria para la transformación inducida por Ras (Khosravi-Fa y cols., 1995; Tang y cols., 2008; Narumiya y cols., 2009). Se sabe que Ras utiliza sus tres cascadas de señalización, la de las MAPKs (Raf-MEK-ERK), la de PI-3-kinasa y las de Rac1GDS para inducir una transformación completa. Es probable que la señalización de Rho se concierte con cualquiera de las tres para complementar el proceso (Narumiya y cols., 2009; Zhang y cols., 2009). Es más, las GTPasas Rho, especialmente Rac1 y Cdc42 (aunque también se ha descrito para RhoA a través de ROCK) activan la vía de las MAPKs estimulando finalmente a ERK 1 y 2, principal promotor de la activación de la ciclina D1 (Sahai y Marshall, 2002).

6. FARMACOLOGÍA DE LAS ESTATINAS.

Las estatinas son una familia de compuestos ampliamente utilizados en la práctica clínica como anticolesterolemiantes por su capacidad de inhibir la síntesis de colesterol y, por tanto, reducir sus niveles plasmáticos (Farnier y Davignon, 1998; Pedersen, 2001; Davidson, 2001; Illingworth y Tobert, 2001). Actualmente se están estudiando otras posibles aplicaciones terapéuticas de estos compuestos, como el tratamiento del cáncer y de ciertas enfermedades que cursan con fibrosis intersticial, p.e. la nefropatía crónica o la cirrosis. Nuestro interés en las estatinas está basado en un efecto antitumoral y antifibrótico potencial sobre el parénquima tumoral, que pretendemos determinar. Este efecto antifibrótico podría tener una nueva aplicación terapéutica anticancerosa como coadyuvante de las terapias dirigidas, que facilitaría el acceso de estas últimas a sus dianas moleculares, como se ha descrito en el apartado 3.4.

6.1. Descripción química de las estatinas.

La familia de las estatinas está formada por compuestos naturales y sintéticos. La pravastatina, la simvastatina y la lovastatina son derivados de la fermentación fúngica, mientras que la fluvastatina, la atorvastatina, la cerivastatina, la rovastatina y la pitavastatina son compuestos sintéticos. La estructura común característica de todas las estatinas es una cadena lateral que contiene una lactona farmacológicamente inactiva (tabla 3). La forma activa se produce *in vivo* por la acción de ciertas carboxilasas del plasma y del hígado que rompen la lactona y dan lugar al ácido farmacológicamente activo (Plosker y McTavish, 1995; Bischoff y cols., 1997; Haria y McTavish, 1997; Plosker y Wagstaff, 1997; Malinowski, 1998; Kajinami y cols., 2000; McTaggart y cols., 2001; Wong y cols., 2002).

6.2. Mecanismo de acción y utilidad terapéutica.

Las estatinas inhiben la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (Istvan y Deisenhofer, 2001). Por analogía estructural consiguen el bloqueo del intermediario de la reacción que se forma en el sitio activo de la enzima que cataliza el paso limitante en el metabolismo del colesterol, la conversión de HMG-CoA en mevalonato (figura 9, Goldstein y Brown, 1990). Como consecuencia de ello disminuyen la cantidad plasmática de colesterol y de lipoproteína de baja densidad

(LDL), por lo que se han utilizado ampliamente para el tratamiento de la hipercolesterolemia durante los últimos 20 años.

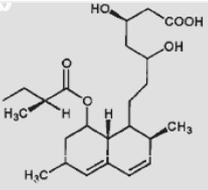
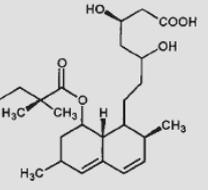
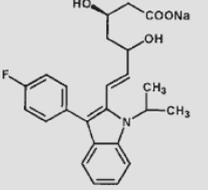
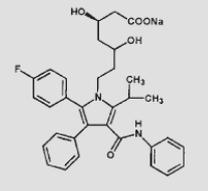
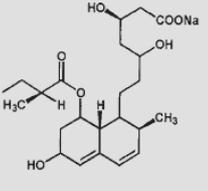
ESTATINA	ESTRUCTURA QUÍMICA	SOLUBILIDAD	FUENTE	K _i HMG-CoA REDUCTASA (mM)
LOVASTATINA		LIPOFÍLICA	FÚNGICA	0,6
SIMVASTATINA		LIPOFÍLICA	FÚNGICA	0,12
FLUVASTATINA		HIDROFÍLICA	SINTÉTICA	0,3
ATORVASTATINA		LIPOFÍLICA	SINTÉTICA	---
PRAVASTATINA		HIDROFÍLICA	FÚNGICA	2,3

Tabla 3. Estructura química y características de las estatinas más utilizadas como hipolipemiantes (Lennemas y Fager, 1997; Wong y cols., 2002).

El tratamiento con estatinas está asociado clínicamente a la inhibición de la formación de las placas de ateroma y a la reducción de aquellas preexistentes. Probablemente como consecuencia de ello, se ha constatado que su uso disminuye la incidencia de accidentes cardiovasculares como el infarto de miocardio, la apoplejía, la fibrilación atrial, la disfunción renal e incluso la muerte (Schartl y cols., 2001; Collins y cols., 2003). Diversos ensayos clínicos han demostrado que la administración de

estatinas está asociada a la disminución de la morbilidad y mortalidad cardiovascular, curiosamente incluso en pacientes con niveles plasmáticos normales de colesterol-LDL. Es decir, que los efectos beneficiosos del tratamiento con estatinas no están limitados a los pacientes con hipercolesterolemia, por lo que se supone que estos fármacos ejercen efectos *pleiotrópicos* desconocidos, independientemente de sus efectos sobre el colesterol (Sacks y cols., 1996; Downs y cols., 1998; Hindler y cols., 2006).

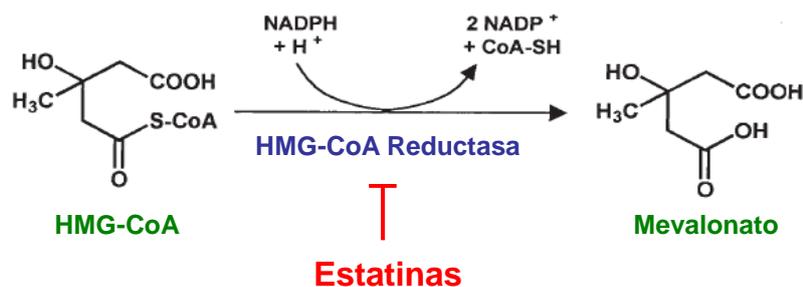


Figura 9. Los fármacos de la familia de las estatinas inhiben el paso limitante en la síntesis del colesterol: la conversión de HMG-CoA en mevalonato al inhibir la enzima implicada, la HMG-CoA reductasa (Corsini y cols, 1995; Farmer y Torre-Amione, 2000; Illingworth y Tobert, 2001; Wong y cols., 2002).

Los mecanismos por los cuales las estatinas producen estos efectos beneficiosos no están totalmente dilucidados, pero se sabe que el metabolito de la HMG-CoA reductasa, el mevalonato, no solo es el precursor del colesterol sino también de los isoprenoides dolicol, farnesil pirofosfato (FPP) y geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) (figura 10) (Rao y cols., 1990). El dolicol tiene efecto estimulante de la síntesis de ADN (Wejde y cols., 1998) y está asociado a varias proteínas celulares tumorales. El FPP y el GGPP son los sustratos de la prenilación (geranilación y farnesilación, respectivamente) de las proteínas “CAAX”, entre las que se encuentran las GTPasas monoméricas de la superfamilia Ras. Éstas regulan muchas funciones celulares: proliferación, apoptosis, adhesión, migración y control de la expresión de numerosos genes tales como las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) y factores de transcripción, como el factor nuclear- κB (NF- κB) (Hindler y cols., 2006), entre otras (ver apartado 5 de esta sección). Así pues, parte de los efectos farmacológicos no relacionados con el control de la síntesis de colesterol, podrían estar relacionados con la inhibición de la prenilación de estas GTPasas, o de otras proteínas modificadas por los metabolitos del mevalonato.

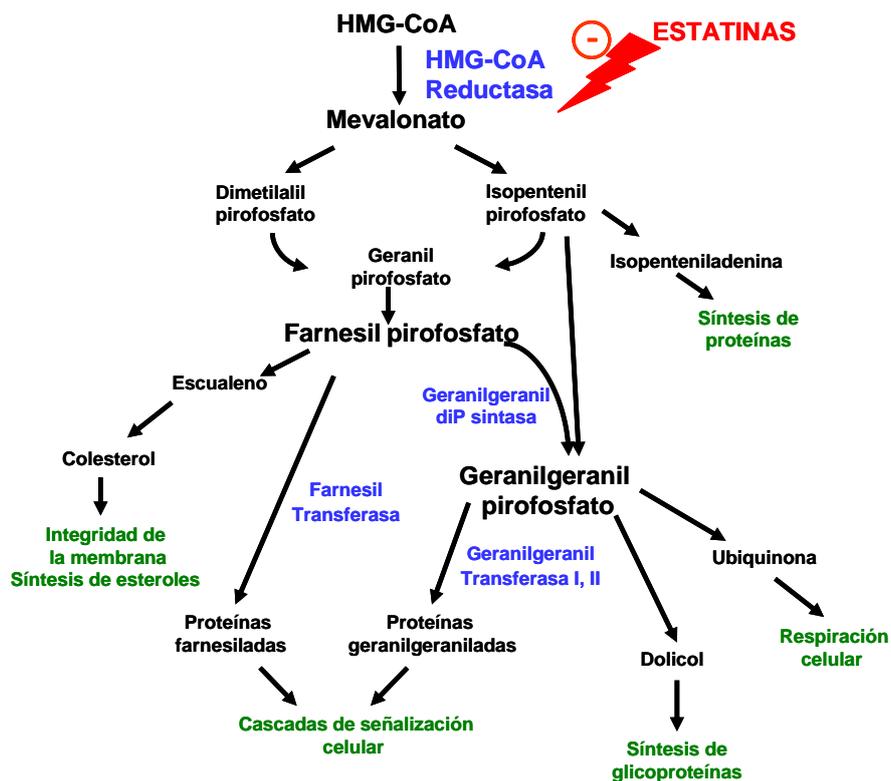


Figura 10. Ruta del mevalonato. Los productos de esta ruta son requeridos en numerosas funciones esenciales. Éstos incluyen esteroides, como el colesterol, relacionado con la integridad de la membrana y producción de esteroides; ubiquinona (Coenzima Q) relacionada con el transporte de electrones en la respiración celular; los isoprenoides farnesilo y geranilgeranilo, involucrados en la unión covalente a membranas de proteínas “CAAX”, como la superfamilia Ras; dolicol, que se requiere para la síntesis de glicoproteínas; e isopenteniladenina, esencial para la el correcto funcionamiento del ARNt y la síntesis proteica (Goldstein y Brown, 1990; Kabakoff y cols., 1990; Wong y cols., 2002).

6.3. Efecto antifibrótico.

El posible efecto antifibrótico tumoral de las estatinas no se ha estudiado todavía. Sin embargo, sí se ha establecido su capacidad de prevenir y reducir la fibrosis en otros tejidos. Los planteamientos de nuestro trabajo se basan en que quizá la fibrosis de diferentes tejidos se produzca por algunos mecanismos comunes, y que tal vez alguno de éstos esté relacionado con las vías afectadas por las estatinas. Los efectos pleiotrópicos de las estatinas se determinaron inicialmente en el aparato cardiovascular y en el hígado, pero principalmente se han observado en el riñón (Takemoto y Liao, 2001; Buemi y cols, 2002; Tandon y cols, 2004 Rodríguez-Peña y cols., 2005). Se ha demostrado el efecto protector de las estatinas en el daño renal asociado con la hipertensión, la renina o la elevada ingesta de sal (Wilson y cols., 1998; Park y cols., 2000), y también con la diabetes, y la fibrosis asociada a la nefrotoxicidad crónica de la

ciclosporina (CsA) (Li y cols., 2004). Ésta se caracteriza por una insuficiencia renal progresiva, arteriopatía aferente, inflamación tubulointersticial y fibrosis. En estos procesos, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), una citoquina profibrogénica, tiene un papel esencial (Nishimura y cols., 1999; Chang y cols., 2002). La pravastatina inhibe los mediadores antiinflamatorios MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1, sintetizada en las células tubulares en respuesta al daño renal) y TNF- α , la expresión de TGF- β , la producción de MEC (fibronectina y colágeno tipo IV) y suprime la proliferación de células las mesangiales en cultivo (Li y cols., 2004).

También se ha estudiado el efecto de la simvastatina en un modelo de fibrosis renal que es independiente de la hipertensión, del daño vascular, la insuficiencia renal o del estrés oxidativo que acompaña a la diabetes, concretamente el modelo de obstrucción ureteral unilateral (OUU). El tratamiento con simvastatina atenúa la inflamación y la fibrosis intersticial resultante en el riñón obstruido al disminuir la expresión de algunos componentes de la MEC como el colágeno I, III y la fibronectina. (Vieira y cols., 2005). La relación entre la disminución de las células inflamatorias y la protección de la fibrosis intersticial llevada a cabo por la simvastatina puede ser explicada por la reducción de los efectos del TGF- β . Aunque las estatinas no modifican expresión del TGF- β en el riñón dañado, sí podrían modificar los procesos traduccionales y postraduccionales de TGF- β en el riñón.

Se ha demostrado que *in vitro* MCP-1 tiene la capacidad de inducir a los fibroblastos a aumentar la producción de colágeno a través de un mecanismo independiente del TGF- β (Yamamoto y cols., 2001). Así, es posible que la expresión de MCP-1 incremente directamente la producción de MEC de los fibroblastos o active las células tubulares a transdiferenciarse en fibroblastos mediante la transición epitelio-mesenquimal (Vieira y cols., 2005). En este sentido, la simvastatina disminuye esta transición fenotípica en células tubulares, proceso que se ha descrito en ciertas enfermedades progresivas renales que conllevan procesos de cicatrización (Liu, 2004). Así pues, es posible que las estatinas tengan efectos directos sobre la producción y el recambio de la MEC, o efectos indirectos a través de sus acciones antiinflamatorias. La interferencia en la transición epitelio-mesenquimal de las células renales podría ser una explicación alternativa de los efectos antifibróticos de las estatinas con una marcada actividad antiinflamatoria.

6.4. Efecto antitumoral: antiproliferante y proapoptósico.

Muchos estudios han puesto de manifiesto que las estatinas inhiben, *in vitro* e *in vivo*, el crecimiento del tumor e inducen apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales, principalmente de melanoma, glioma, neuroblastoma y leucemia (Wong y cols., 2002; Hindler y cols., 2006). Su efecto sobre tumores epiteliales (tumores sólidos) está mucho menos estudiado, y constituye uno de los objetivos de este trabajo.

6.4.1. Inhibición de la multiplicación de las células tumorales y parada del ciclo celular.

En el apartado 5 de esta sección hemos ahondado en la importancia de la superfamilia de Ras y las GTPasas Rho en particular para la transformación celular y proliferación de las células cancerosas.

La capacidad de la superfamilia Ras para llevar a cabo sus funciones principales como transductores de señales requiere su anclaje a la membrana, lo que se consigue a través de la prenilación. Las estatinas, al inhibir la síntesis de los sustratos necesarios para este proceso, inhiben la activación de las cascadas de señalización que actúan sobre la proliferación celular y que en una célula transformada están continuamente activadas.

Las estatinas pueden detener el ciclo celular de las células transformadas principalmente en el punto de control entre la fase G1 y S (Olson y cols., 1995, Denoyelle y cols., 2001), incluso algunas son comúnmente utilizadas en investigación para bloquear la transición de la fase G1 a la S y sincronizar así las células *in vitro*, bloqueo que se revierte con la adición de mevalonato (Keyomarsi y cols., 1991; Wong y cols., 2002). Esta parada de la división celular, independiente de la respuesta mediada por p53, se debe a la inhibición de la actividad de la ciclina dependiente de kinasa (CDK) 2, asociada a un aumento de la expresión de los inhibidores de CDK p21 y p27 (Rao y cols., 1998) y a la inducción de la síntesis de los inhibidores dependientes de kinasas (CDKIs), relacionados con la transición del ciclo celular de la fase G1 a la S (Denoyelle y cols., 2001; Zhang S. y cols., 2009).

RhoA tiene mayor peso en la regulación del ciclo celular en las células tumorales, mientras que Ras tiene un papel secundario (Weber y cols., 1997; Olson y cols., 1998; Zhang y cols., 2009; Sahai y Marshall, 2002). RhoA actúa a través de ROCK y regula la

síntesis de los inhibidores del ciclo celular INK4 (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}) y también a través de su efector mDial que regula la acumulación de las proteínas de la familia Cip/Kip (p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1}). Las estatinas inhiben la activación de RhoA que da lugar a un incremento de la actividad de estos CDKIs, lo cual afecta a los complejos ciclina/CDK que se requieren para la progresión del ciclo de la fase G1 a la S: ciclina D/CDK4, ciclina D/CDK6 y ciclina E/CDK2 (Rao y cols., 1998, Zhang y cols., 2009). Además, Rac1 y Cdc42 tienen un papel importante en la regulación de la ciclina D1, que es crucial para la proliferación y la tumorigénesis. Ambas pueden modificar los valores de esta ciclina a través de la activación de las cascadas de JNK (quinasa de N-terminal de c-jun, del inglés *c-Jun N-terminal kinase*) y MAPK (quinasa activada por mitógenos, del inglés *mitogen activated protein kinase*) (Sahai y Marshall, 2002).

6.4.2. Inducción de apoptosis.

Muchos experimentos demuestran los efectos proapoptóticos de las estatinas en diferentes células tumorales. Pero, dentro de éstas hay diferencias significativas de sensibilidad frente a la muerte (Wong y cols., 2002; Hindler y cols., 2006). Por ejemplo, las células cancerosas de próstata y mama son insensibles *in vitro* a la apoptosis inducida por las estatinas (Dimitroulakos y cols., 2001; Denoyelle y cols., 2001).

Los mecanismos propuestos para este efecto son la estimulación de la expresión de proteínas proapoptóticas (Bax y Bim) (Agarwal y cols., 1999) combinada con una disminución de la expresión de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) (Dimitroulakos y cols., 2000). Por ejemplo, la lovastatina incrementa los niveles proteicos de Bim, asociados con la muerte celular en algunas células de tumores sólidos y de cánceres hematológicos (Wong y cols., 2002). También se ha observado activación de caspasas, una familia de proteasas íntimamente relacionadas con la iniciación y ejecución de la muerte celular programada. La regulación de la expresión de Bcl-2 por la lovastatina y su función concuerda con la apoptosis inducida por las estatinas a través de la vía mitocondrial intrínseca (Dimitroulakos y cols., 2000; Schmidt y cols., 2001). En este sentido, la apoptosis inducida por estos fármacos está asociada con la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa-3 (Wang y cols., 2000).

La depleción del mevalonato es el responsable de la apoptosis inducida por las estatinas en células tumorales sensibles, lo que sugiere que el bloqueo de la producción de metabolitos específicos de este mediador está relacionado con este proceso (Hindler y cols., 2006). Una serie de estudios han mostrado que sólo el GGPP

es capaz de inhibir la apoptosis. El resto de productos, incluyendo el colesterol, la ubiquinona, la isopenteniladenina y el dolicol fosfato, no tienen ningún efecto evidente (Marcelli y cols., 1998; Agarwal y cols., 1999; Xia y cols., 2001). Curiosamente, el FPP tiene un efecto muy pequeño o nulo en la apoptosis provocada por las estatinas en una gran variedad de sistemas celulares. La importancia de la geranilación se demuestra con inhibidores de la GGTPasa -que induce la apoptosis con la misma potencia que la lovastatina- y FTasa -que sólo muestra una pequeña actividad apoptótica- (Xia y cols., 2001). Por consiguiente, un posible modelo para el efecto de las estatinas es el agotamiento de las reservas de GGPP, que provocaría una inadecuada localización y función de proteínas como K-Ras, N-Ras y Rho, lo que finalmente conduciría a la célula al suicidio (Wong y cols., 2002).

El objetivo principal de este estudio consistió en determinar el efecto de la estatina fluvastatina en la proliferación y viabilidad de dos líneas celulares tumorales, una de carcinoma de mama humano (MDA-MB-231) y otra de carcinoma de pulmón de ratón (3LL) y fundamentalmente, en este contexto, el efecto de la estatina en la expresión de componentes de la MEC, ya que estas dos líneas celulares nos proporcionan una visión amplia de la acción de este fármaco en diferentes especies y en dos tipos de tumores epiteliales diferentes.

Este objetivo es parte de uno más amplio que queda fuera del ámbito de esta tesis doctoral y que consiste en determinar si es posible hacer el parénquima de los tumores sólidos más permeable a las moléculas grandes y, de ser así, si esta intervención aumentaría la eficacia de las inmunotoxinas antitumorales al favorecer su acceso a las células diana. Como es sabido, las estatinas tienen, entre otros, efectos *antifibróticos* demostrados en las condiciones patológicas de órganos como el corazón, el riñón o el hígado (Buemi, 2001; Takemoto y Liao, 2001; Tandon y cols, 2004; Rodríguez-Peña y cols., 2005). Este efecto se deriva parcialmente de su capacidad para inhibir la expresión de algunos constituyentes de la MEC. Por este motivo se planteó la hipótesis de que estas moléculas ejerciesen el efecto *antifibrótico* también en los tumores, y pudiesen servir para el propósito descrito.

Teniendo en cuenta los efectos inhibidores conocidos de las estatinas sobre el crecimiento de ciertos tipos de tumores (especialmente mesenquimales, como las leucemias) y sobre la proliferación de líneas celulares relacionadas con este tipo de tumores (Wong y cols., 2002; Hindler y cols., 2006), también se determinó el efecto de la fluvastatina en el crecimiento de tumores sólidos *in vivo* y, en la proliferación, viabilidad, ciclo celular y muerte celular de células de tumores sólidos epiteliales en cultivo. De esta manera, también caracterizamos el escenario biológico en el cual la fluvastatina ejercía los efectos sobre la MEC.

Una vez estudiada la acción de la fluvastatina en determinadas funciones celulares, el siguiente objetivo fue caracterizar el mecanismo por el cual la fluvastatina los llevaba a cabo. Para ello cotratamos las células tumorales con mevalonato como posible inhibidor de los efectos producidos por la fluvastatina, lo que indicaría que éstos son debidos al bloqueo de la ruta del mevalonato, y no a la inhibición de cualquier otra vía no relacionada con el mevalonato. También cotratamos con determinados análogos de la ruta del mevalonato para restaurar vías de señalización concretas y así

identificar los productos cuya falta producía los efectos observados en las células: geranylgeraniol (GG) y farnesol (FOH), precursor del geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) y farnesil pirofosfato (FPP) respectivamente. Las vías de señalización relacionadas con estos productos podrían constituir potencialmente dianas terapéuticas más específicas, ya que son los sustratos necesarios para la prenilación de las GTPasas monoméricas de la superfamilia Ras y, por lo tanto, imprescindibles para la correcta localización en la membrana y su adecuada actividad en funciones celulares tan importantes como la proliferación, supervivencia (y por lo tanto la carcinogénesis), organización del citoesqueleto, etc. Además, la inhibición de la prenilación ya se ha estudiado como posible acción antitumoral con los inhibidores de las enzimas que incorporan FPP y GGPP a las GTPasas; FTI (inhibidor de la farnesil transferasa) y GGTI (inhibidor de la geranylgeranyl transferasa), de ahí la importancia de determinar si la falta de alguno de estos sustratos es la responsable de las acciones observadas (Philips y Cox, 2007).

Por otra parte, caracterizamos a nivel molecular los cambios que la fluvastatina ejercía sobre alguna de las GTPasas monoméricas de la superfamilia Ras, y la relación entre estos cambios con los efectos observados en la proliferación, viabilidad y expresión de la MEC. Estudiamos el papel de RhoA en los efectos de la fluvastatina. También, la expresión y la fracción de proteínas de la superfamilia Ras que se encontraban localizadas en la membrana (preniladas) en relación con la cantidad que no está anclada a la membrana (no preniladas) en los diferentes tratamientos. Posteriormente describimos la implicación del efector de RhoA, ROCK, en los procesos celulares modificados por la fluvastatina. Finalmente estudiamos el papel de RhoA no prenilado como activador directo de la transcripción.

Con estos objetivos generales, planteamos los siguientes objetivos concretos en el presente Trabajo de Tesis Doctoral:

1. Determinar la capacidad anticancerosa *in vivo* de la fluvastatina en un modelo de cáncer epitelial experimental.
2. Caracterizar la posible actividad antitumoral directa de la fluvastatina en líneas celulares de tumores epiteliales, mediante el estudio del efecto de esta estatina en la proliferación celular, en la progresión del ciclo celular, en la viabilidad celular y, en su caso, en la forma de muerte celular.

3. Determinar si, además, el tratamiento con la fluvastatina sensibiliza a las células tumorales a la acción del agente anticanceroso cisplatino.
4. Estudiar el efecto de la fluvastatina en la expresión de constituyentes de la MEC tumoral de líneas celulares de tumores epiteliales.
5. Dilucidar la implicación de la falta de los productos del metabolismo del mevalonato, geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) y farnesil pirofosfato (FPP), en los efectos de la fluvastatina en las líneas tumorales.
6. Concretar el efecto de la fluvastatina en la síntesis, activación y prenilación de la superfamilia Ras, especialmente en las familias Rho y Ras, responsables de funciones relacionadas con la progresión tumoral como la proliferación, supervivencia, producción de MEC, invasividad, metástasis, etc.
7. Estudiar el efecto de RhoA en la transcripción génica independientemente de sus efectos como transductor de señales en la membrana.

1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.

Algunos de los reactivos, materiales y equipos utilizados repetidamente en los experimentos se encuentran en las tablas que se presentan a continuación. La información referente a los que no están incluidos en estas listas se detalla donde se nombran.

1.1. Reactivos.

Reactivo/producto	Casa comercial
Agarosa	Sealem®, Cambrex Bio Science (ME, U.S.A.)
Azul de bromofenol	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
ASB	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
dTTPS GeneAmp	Applied Biosystems (California, US)
EDTA	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Etanol 96% Cuve®	Laboratorios Pérez Giménez (Córdoba)
Etanol absoluto	Mallinckrodt Baker Inc. (Deventer, Holanda)
Farnesol	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Fluvastatina	Calbiochem-Novabiochem (Darmstadt, Alemania)
Geranilgeraniol	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Glicerol	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Glicina	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Hoestch 33342	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Ioduro de propidio	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Kit colorimétrico de determinación de proteínas	Bio-Rad Laboratorios (CA, U.S.A.)

Reactivo/producto	Casa comercial
Marcador de pesos moleculares 100bp ladder ADN	Invitrogen S.A. (Barcelona)
Medio de cultivo DMEM	Biowhittaker TM Cambrex Bio Science (Verviers, Bélgica)
Metanol	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Retrotranscriptasa, M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, (USA)
MTT (Cell proliferation Kit I)	Roche Applied Science (Mannheim, Alemania)
NaCl	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Na ₂ HPO ₄	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
NaOH	Probus S.A. (Barcelona)
Ortovanadato sódico	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Para-formaldehído	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Penicilina-Estreptomicina	Biowhittaker TM (MD, U.S.A.)
Peróxido de hidrógeno	Panreac Química S.A. (Barcelona)
PMSF	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Inhibidor de ARNasas, RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega, (USA)
SBF	Gibco TM , Invitrogen S.A. (Barcelona)
Taq- polimerasa, Taq FastStart DNA Polymerase	Roche Applied Science (Mannheim, Alemania)
TCA	Panreac Química S.A. (Barcelona)
Tripsina-EDTA	Biowhittaker TM (MD, U.S.A.)
TriReagent	Molecular Research Center Inc. (OH, USA),
Tris base (Trizma®)	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Tritón X-100	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)
Tween-20	Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid)

1.2. Materiales y equipos.

Material/equipo	Casa comercial
Cámara de Neubauer	Paul Merienfeld GmbH & Co. KG (Brunswick, Alemania)
Cámara digital Kodak	Kodak Digital Science (NY, USA)
Campana de flujo laminar TC-48 Gelaire	Cultek S.L. (Madrid)
Campana de flujo laminar vertical Microflow Laminar Flor Workstation	Cultek S.L. (Madrid)
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche Applied Science (Mannheim, Alemania)
Citómetro de flujo FACScalibur	Becton Dickinson, (Madrid).
Espectrofotómetro NANODROP-1000 Spectrophotometer	Technologies (US)
Filtros de esterilización	Millipore Corporation (U.S.A.)
Fuente de alimentación Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratorios (CA, U.S.A.)
Incubador celular Forma Scientific 3111	Forma Scientific (OH, U.S.A.)
Lector de placas de ELISA ELx800	BIO-TEK Instrument, Inc (VT, U.S.A.)
Microscopio óptico invertido de contraste de fases 2 EL WD 0.3	Nikon (Tokio, Japón)
Microscopio de fluorescencia invertido Axiovert 200M	Zeiss (Reino Unido)
Placas de cultivo	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Puntas de pipeta	Daslab (Madrid)
Rascadores	Nunc A/S, (Roskilde, Dinamarca)
Termociclador MyCycler,	Bio-Rad Laboratorios (CA, U.S.A.)
Transiluminador TFX-20M	Life Technologies
Tubos de plástico 50 ml Falcon TM	Becton Dickinson S.A. (Madrid)
Viales de polietileno	Nacional Diagnostic (Reino Unido)

2. CULTIVO CELULAR.

Se utilizaron las líneas celulares MDA-MB-231 (carcinoma de mama humano) y 3LL (carcinoma de pulmón de Lewis, de ratón). Todos los materiales, medios de cultivo y sustancias en contacto con las células se usaron estériles.

2.1. Manejo de las células.

Las células se cultivaron en placas de tipo Petri estériles de 100 mm de diámetro, especialmente fabricadas para cultivo celular, en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bobino (SFB) inactivado (por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos), L-glutamina 1 mM, penicilina 500 U/mL y estreptomina 50 mg/mL (medio completo). Las células se cultivaron en un incubador a una temperatura de 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ / 95% de aire. Todas las manipulaciones de las células con requerimientos estériles se realizaron en campanas de flujo laminar vertical.

En estas condiciones las células proliferaron continuamente adheridas al sustrato plástico. Cuando alcanzaron un 70-80% de confluencia, o cuando se usaron para realizar experimentos, se procedió a despegarlas del sustrato con objeto de sembrar en una nueva placa el número adecuado de ellas para continuar y mantener el cultivo, o para la realización de experimentos concretos.

Para ello, se absorbió el medio de cultivo de la placa y se añadieron 3 mL de PBS (solución salina tamponada – del inglés *Phosphate Buffered Saline*- NaCl 139 mM; Na₂HPO₄ 5,17 mM; KH₂PO₄ 2,6 mM) a 37 °C para lavar los restos del medio de cultivo. A continuación, se retiró el PBS y se añadieron 1,5 mL de tripsina-EDTA (0,5 g/L tripsina-0,2 g/L EDTA) a 37 °C. Se mantuvieron en el incubador hasta que las células comenzaron a desprenderse de la placa. Para neutralizar la tripsina, se añadieron 4,5 mL de medio de cultivo a la placa y se homogeneizó el volumen resultante. Finalmente, se separó la cantidad requerida en función del tipo de experimento, se depositó en otra placa y se suplementó con la cantidad necesaria de medio de cultivo nuevo.

2.2. Conservación y reconstitución del cultivo: congelación y descongelación.

Con objeto de disponer de una reserva de células, éstas se almacenaron congeladas dentro de crioviales inmersos en nitrógeno líquido a -150-180 °C (un criovial

por cada placa de cultivo). Cuando las células alcanzaron un 80-90 % de confluencia en las placas de cultivo se *tripsinizaron*, se recogieron en un tubo falcon y se centrifugaron a 1900 r.p.m. durante 3 minutos. Después, se desechó el sobrenadante y el *pellet* obtenido de cada placa se resuspendió en 1 mL medio de congelación, que constaba de DMEM con un 20 % de SFB y un 8% de dimetilsulfóxido (DMSO). Antes de introducirlas en nitrógeno líquido las células se congelaron a -80°C .

Para restablecer el cultivo a partir de células congeladas, se procedió a su rápida descongelación por inmersión del criovial con las células en un baño a 37°C . El volumen de cada criovial se añadió a un tubo falcon con 10 mL de medio de cultivo, para diluir el medio de congelación. Tras su homogenización, las células se centrifugaron a 1.900 r.p.m durante 3 minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo nuevo y se sembró en una placa de 100 mm de diámetro.



Figura 11. Habitación de cultivos celulares (panel izquierdo), y tanques de nitrógeno líquido para la conservación de células (panel derecho).

2.3. Recuento del número de células.

Para la realización de los experimentos, las células se contaron con ayuda de un microscopio invertido de contraste de fases utilizando una cámara de Neubauer. Ésta es un portaobjetos de cristal con una depresión central de 0,1 mm, en el fondo de la cual hay una cuadrícula de 3 x 3 mm con una separación entre las líneas consecutivas de 0,25 mm. El área marcada como A, B, C o D (figura 12), por tanto, corresponde a 1 mm^2 . Cuando se coloca el cubreobjetos, éste dista de la superficie de parte marcada de la cámara 0,1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie A y el cubreobjetos es de $0,1\text{ mm}^3$, es decir, $0,1\text{ }\mu\text{L}$.

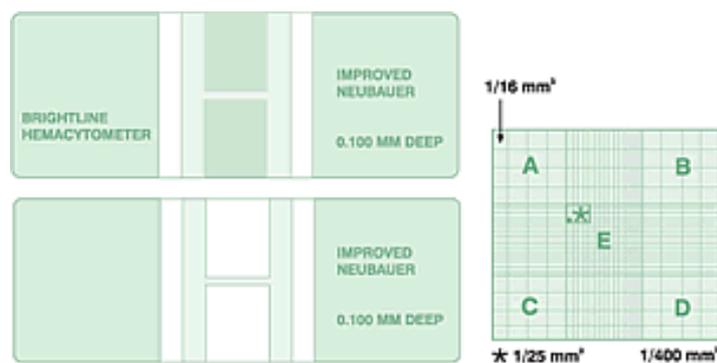


Figura 12. Representación de una cámara de Neubauer.

Después de *tripsinizar*, neutralizar la tripsina con tres volúmenes de medio de cultivo y homogeneizar las células, se añadieron aproximadamente 10 μL de esta suspensión celular entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos. El líquido penetró por capilaridad y el excedente quedó en los surcos. Se realizó el recuento de las células de los 4 cuadrantes laterales A, B, C y D y se realizaron los cálculos correspondientes: Se determinó la media del número de células por cuadrante y se multiplicó por 10.000. La cantidad resultante corresponde al número de células por mL.

3. CONDICIONES GENERALES DE CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO.

En los experimentos de proliferación celular (apartado 4 de esta sección), ambas líneas celulares se sembraron en placas de 24 pocillos el día anterior al tratamiento, añadiendo 0,5 mL de medio de cultivo en cada pocillo. Para las células MDA-MB-231 se añadieron 1.500 células por pocillo y para las 3LL 7.500 células por pocillo.

En cambio, para el resto de los experimentos se sembraron 60.000 células de cada línea celular (MDA-MB-231 y 3LL) en placas de cultivo de 60 mm de diámetro, con 4 mL del medio de cultivo completo.

Al día siguiente, cuando las células se adhirieron a la placa, se cambió el medio y se añadieron los compuestos necesarios para el tratamiento correspondiente: fluvastatina, geranilgeraniol, farnesol, mevalonato, etc. (y los vehículos correspondientes, como control), a la concentración adecuada. En el caso de la fluvastatina, se alcanzó la concentración deseada (0,3-1-3-10-100 μM) a partir de una solución concentrada (10 mM) preparada en agua mQ estéril siguiendo las

especificaciones del fabricante. Para el geranilgeraniol y farnesol, se trataron las células con una concentración de 3 μM y 10 μM respectivamente a partir de una solución concentrada (30 mM) en la que el disolvente fue el etanol absoluto, según las especificaciones del fabricante. En función del experimento tratamos a una determinada concentración y a un determinado tiempo. Las siguientes figuras muestran los diferentes protocolos de tratamiento:

Protocolo 1. Se trataron las células durante 24, 48 o 72 horas con el vehículo (H_2O mQ) como control, o diferentes concentraciones de fluvastatina (0,3-100 μM). También tratamos durante 72 horas con el inhibidor de ROCK Y-27632 (100 μM).

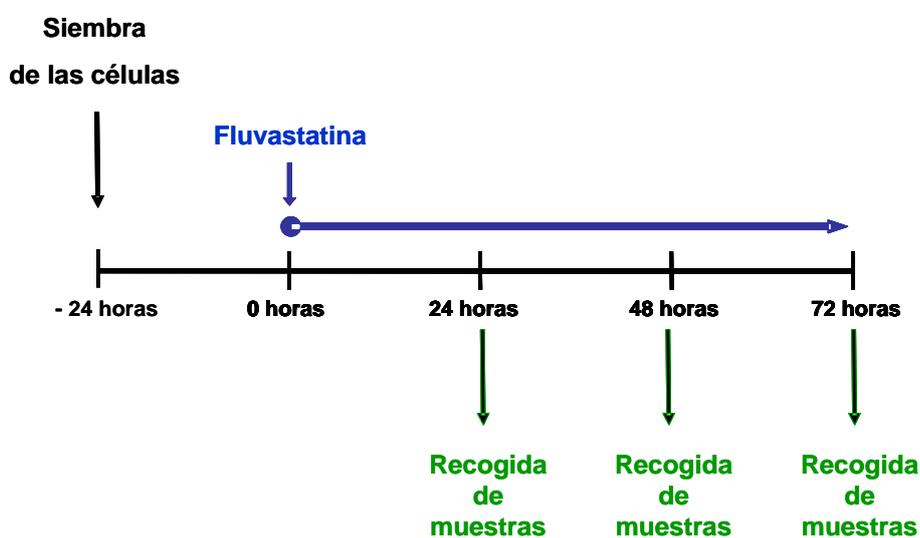


Figura 13. Representación esquemática de la secuencia temporal del protocolo 2 de tratamiento de las células y de la recogida de muestras.

Protocolo 2. Se trataron las células durante 48 y 72 horas con el vehículo (H_2O mQ) como control, o diferentes concentraciones de fluvastatina (0,3-3 μM), en presencia y en ausencia de geranilgeraniol (3 μM), farnesol (10 μM) o mevalonato (10-1000 μM).

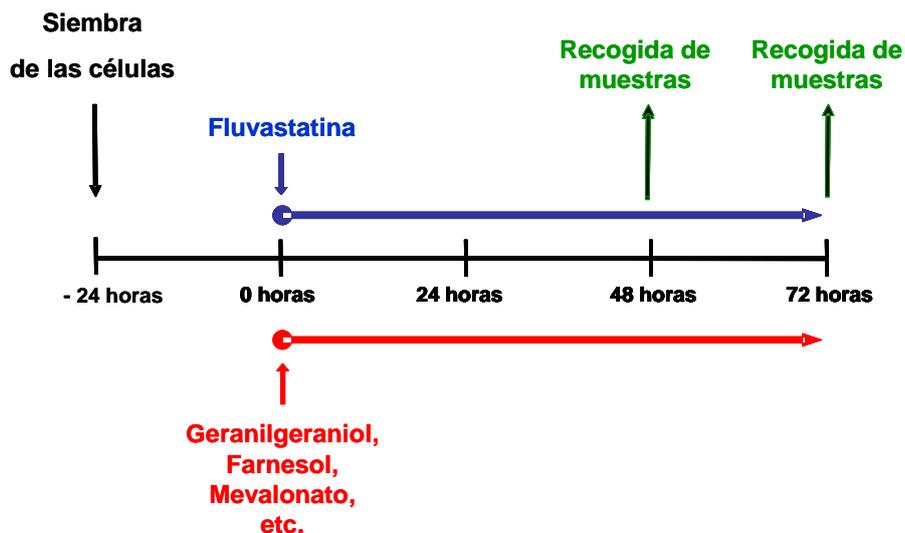


Figura 14. Representación esquemática de la secuencia temporal del protocolo 3 de tratamiento de las células y de la recogida de muestras.

Protocolo 3. Para sensibilizar previamente a las células se trataron las células durante 48 y 72 horas con el vehículo (H_2O mQ) como control, o diferentes concentraciones de fluvastatina (1 y 3 μM) Posteriormente se añadió el cisplatino (30 y 300 μM) y se repuso la fluvastatina a la misma concentración durante 24 horas. Esto se consiguió añadiendo primero la fluvastatina en un volumen "X". 48 y 72 horas después, en el momento de añadir el cisplatino y la fluvastatina de nuevo, se añadió el cisplatino en una concentración 2x (60 y 600 μM) y la fluvastatina (1 y 3 μM) en un volumen "X". El volumen final al término del tratamiento es "2X".

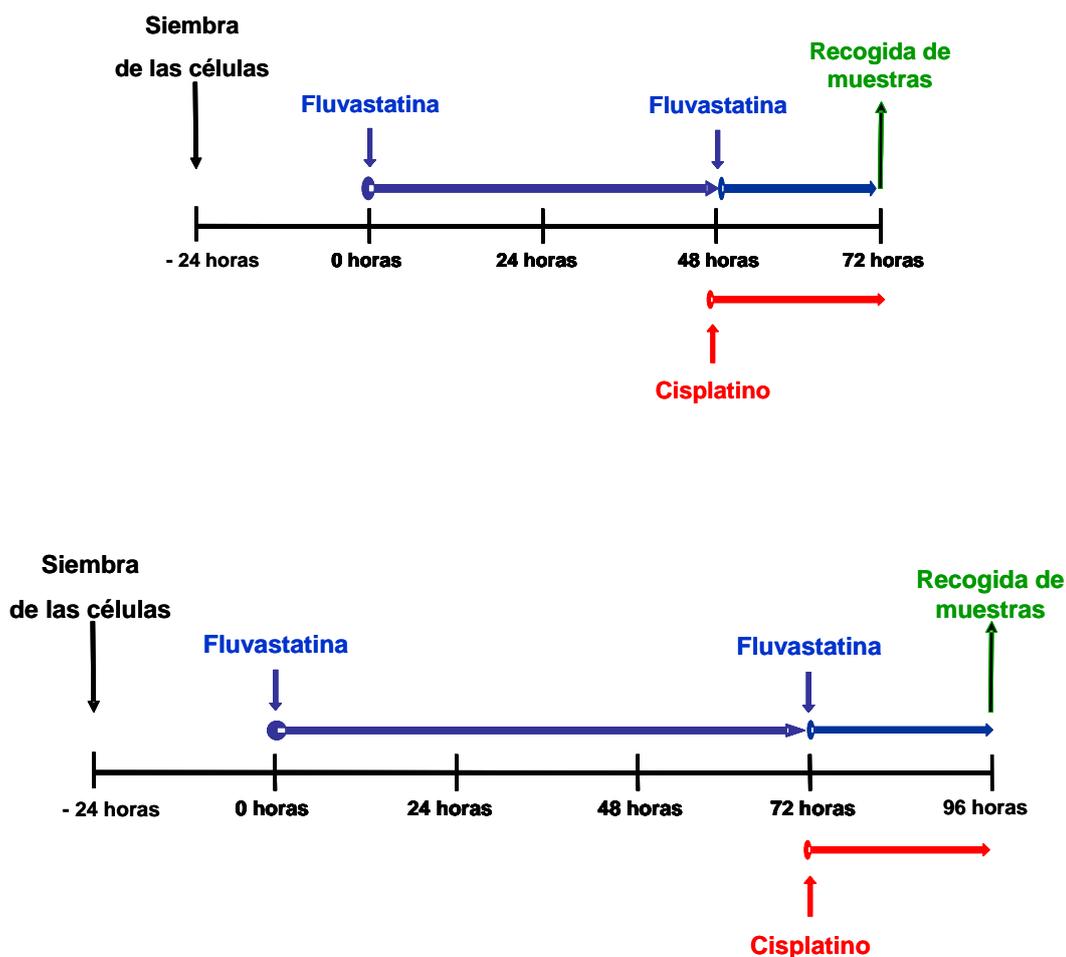


Figura 15. Representación esquemática de la secuencia temporal del protocolo 4 de tratamiento de las células y de la recogida de muestras.

Protocolo 4. Para sensibilizar previamente a las células se trataron las células durante 72 horas con diferentes concentraciones de fluvastatina (1 y 3 μM) y con H_2O mQ como control. Posteriormente separamos las poblaciones adheridas a la placa de las redondeadas o despegadas tras la acción de la fluvastatina durante 72 horas (tiempo 0) y tratamos con cisplatino (30 y 100 μM) durante las 24 horas siguientes.

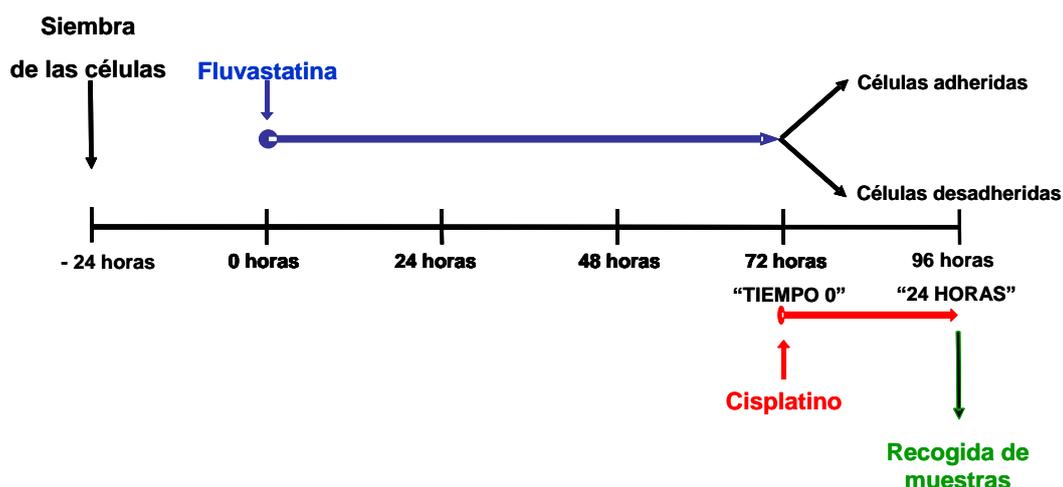


Figura 16. Representación esquemática de la secuencia temporal del protocolo 5 de tratamiento de las células y de la recogida de muestras.

4. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

4.1. Fundamento.

La proliferación celular se determinó mediante el método del “MTT”, ampliamente utilizado en este tipo de estudios (Hayon y cols., 2003; Sargent, 2003). Se basa en la relación directa en un determinado rango lineal entre la cantidad de células metabólicamente activas (viabiles) existentes en un cultivo, y la cantidad de formazán (sustancia de color morado azulado) que producen cuando se incuban con el sustrato amarillento MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio; Roche®] (Mosmann, 1983). El viraje de color del medio de cultivo del amarillo debido a la sal de tetrazolio, al morado debido a los cristales de formazán, por parte de las células que producen NADH o NADPH (cofactores necesarios en esta reacción de reducción), se cuantifica espectrofotométricamente mediante la determinación de la absorbancia a 595 nm.

4.2. Condiciones específicas de tratamiento.

Tratamos a ambas líneas celulares con fluvastatina (0.3-100 μM) siguiendo el protocolo 1, (figura 13) o con fluvastatina (1 y 3 μM) en presencia o ausencia de geranilgeraniol (3 μM), farnesol (10 μM), o mevalonato (10-1000 μM) siguiendo el protocolo 2 de tratamiento (figura 14). También realizamos estudios de sensibilidad del

cisplatino (30 y 100 μM) por la fluvastatina (1 y 3 μM) siguiendo el protocolo 3 y 4 (figura 15 y 16). A las 24, 48 ó 72 horas de tratamiento realizamos el experimento.

4.3. Procedimiento.

Finalizado el tiempo de tratamiento se añadieron al medio de cultivo, en condiciones estériles, 50 μL de MTT (5 mg/mL en PBS). Tras 4 horas de incubación a 37 °C en atmósfera de 5% de CO_2 / 95% aire, durante las que las células vivas pudieron metabolizar el MTT a formazán, se añadieron 500 μL de 10% SDS en HCl 0,01M, para disolver en el medio de cultivo los cristales de formazán producidos. Todo ello se incubó durante la noche en el incubador con las condiciones atmosféricas y de temperatura anteriormente descritas, y a la mañana siguiente se cuantificó la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro de placa (ELX800, Bio-Tek Instruments). Un mayor número de células metabólicamente activas se corresponde con una mayor cantidad de cristales de formazán y, por lo tanto, con una mayor absorbancia.

5. ESTUDIOS DE VIABILIDAD Y CARACTERIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR.

5.1. Estudios de viabilidad celular.

5.1.1 Fundamento.

La integridad de la membrana plasmática es un indicio de viabilidad celular muy utilizado (Mascotti y cols., 2000) y se ha determinado desde hace siglos mediante la exclusión de colorantes que, en condiciones normales, no son capaces de atravesarla. Sin embargo, cuando la membrana está dañada, estos colorantes acceden al interior de la célula y se fijan a sus estructuras. En este caso se ha utilizado el colorante fluorescente yoduro de propidio, cuya exclusión (células viables) o tinción (células no viables) puede cuantificarse fácilmente por citometría de flujo.

5.1.2. Condiciones específicas de tratamiento.

Tratamos a ambas líneas celulares con fluvastatina (1 y 3 μM) siguiendo el protocolo 1 de tratamiento (figura 13) o con fluvastatina (1 y 3 μM) en presencia o ausencia de geranilgeraniol (3 μM) y farnesol (10 μM) siguiendo el protocolo 2 de

tratamiento (figura 14). A las 48 y 72 horas de tratamiento se recogieron las células y se procesaron para el estudio de la viabilidad.

5.1.3. Tinción con yoduro de propidio.

Las células se *tripsinizaron*, se lavaron con PBS y se resuspendieron en una solución de yoduro de propidio (5 µg/mL en PBS). Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y, finalmente, se procedió al análisis en el citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson, Madrid). La adquisición de datos y el análisis de los resultados se llevaron a cabo utilizando el programa informático Cell QUEST®. Por cada célula aislada detectada por el citómetro obtenemos un punto dentro de una gráfica que representa la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio (eje de abscisas) frente al tamaño de la célula (eje de ordenadas). Determinamos como células inviables aquellas que tienen una mayor fluorescencia, es decir, que están teñidas con más yoduro de propidio debido a una inclusión de éste en el interior de la célula a través de una membrana dañada.

5.2. Detección de ADN fragmentado en el citosol celular mediante ELISA.

5.2.1. Fundamento.

Una característica distintiva del proceso de apoptosis es la aparición de fragmentos del ADN nuclear en el citosol, procedentes de cortes internucleosomales realizados por nucleasas específicas. Por lo tanto, la detección y cuantificación de ese ADN en este compartimento celular se ha utilizado ampliamente como marcador de apoptosis (Zhang y Xu, 2000). Para ello se ha utilizado un enzimoimmunoensayo (ELISA, acrónimo en inglés de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Engvall y cols., 1971; Voller y cols., 1978) comercial de tipo “sandwich” denominado “Cell Death Detection ELISA^{PLUS}” (Roche Diagnostics). Concretamente, este ELISA determina *in vitro* cualitativa y cuantitativamente los fragmentos citoplasmáticos de ADN asociados a histonas (mono y oligonucleosomas) presentes en el citosol tras la inducción de la muerte celular por apoptosis. Para ello, utiliza un anticuerpo que reconoce a las histonas y otro que, posteriormente, se une al ADN (ver apartado 4.2.5.), en un extracto celular citosólico, lo que introduce un factor triple de discriminación y especificidad.

5.2.2. Condiciones específicas de tratamiento.

Tratamos a ambas líneas celulares con fluvastatina (1 y 3 μM) siguiendo el protocolo 1 de tratamiento (figura 13). A las 72 horas de tratamiento se obtuvieron los extractos citosólicos como se indica a continuación.

5.2.3. Obtención de extractos celulares citosólicos.

Para obtener los extractos citosólicos se retiró el medio de las placas, se colocaron sobre una base de hielo picado, se añadieron 200 μL de tampón de lisis (PIPES 25 mM pH=7; KCl 25 mM; EGTA 5 mM; NP-40 0,5%, PMSF 1 mM; leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 4-7° C y se incubaron durante 30 minutos en estas condiciones. Transcurrido este tiempo se recogió el tampón de lisis (que ahora contenía el extracto citosólico) y se centrifugó durante 10 minutos a 900 g y a 20 °C. Se conservaron los sobrenadantes, que contenían el lisado celular citosólico, y se usaron para la cuantificación de la cantidad de ADN fragmentado que contenían, tal y como se describe en los párrafos siguientes. Los restos celulares (básicamente células lisadas desprovistas del citosol), que permanecían adheridos a la placa de cultivo, se usaron como se indica en el apartado 6.

5.2.4. Cuantificación de la concentración de proteínas.

Puesto que los tratamientos pueden afectar a la cantidad de células presentes en cada muestra, se determinó la concentración de proteínas de los extractos citosólicos con objeto de normalizar la cantidad de extracto que se debía utilizar en el ensayo de ELISA. La concentración de proteínas de los lisados se determinó siguiendo el protocolo de un kit colorimétrico de BioRad, basado en el método de Lowry (Lowry y cols., 1951). La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos utilizando 5 μL tanto para las muestras como para las diluciones de ASB (albúmina sérica bovina) de concentración conocida (usadas para realizar una recta patrón). A continuación, se añadieron 25 μL de reactivo A (suplementado con 20 μL de reactivo S por mL de reactivo A). Posteriormente se añadieron 200 μL del reactivo B. Se midió la absorbancia a 720 nm en un espectrofotómetro de placa (ELx800, Bio-Tek Instruments). La concentración de proteínas de las muestras se determinó por extrapolación de la absorbancia de cada muestra en la recta patrón Absorbancia-concentración obtenida a partir de las diluciones seriadas de ASB de concentraciones conocidas. Los resultados se analizaron con el programa KC-Junior.

5.2.5. ELISA.

El kit contiene, entre otros, los siguientes reactivos:

- Anticuerpo anti-Histona-Biotina: Anticuerpo monoclonal de ratón (clon H111-4) biotinilado que se une a las histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) de los nucleosomas. Como es sabido, la biotina tiene una alta afinidad de unión a la molécula de estreptavidina. El fondo y las paredes de los pocillos de la placa en la que se lleva a cabo el ensayo están recubiertos con estreptavidina, lo que permite fijar el complejo anti-Histona-Biotina al sustrato plástico. A este complejo se unirá el ADN unido a histonas que pueda estar presente en las muestras.
- Anticuerpo anti-ADN-POD: Anticuerpo monoclonal de ratón (clon MCA-33) conjugado con la peroxidasa de rábano picante (HRP, acrónimo del término inglés *horseradish peroxidase*) que se une al ADN -tanto de hebra sencilla como doble-. La enzima HRP transforma el sustrato "ABTS" incoloro en un producto verdoso, cuya absorbancia a 405 nm es proporcional, dentro de un rango lineal, a la cantidad de ADN unido a histonas presente en la muestra.
- Control Positivo: Complejo ADN-Histona liofilizado y estabilizado.

El proceso de realización del ensayo se resume en los siguientes pasos:

Paso 1. Todas las muestras se realizaron por duplicado. Se añadieron a los pocillos 20 µL de cada lisado proteico ajustado para que todos tuvieran 10 µg de proteínas. También se añadió un blanco -tampón de incubación- y el control positivo que aportaba el kit. Posteriormente se añadieron 80 µL por pocillo de la solución de inmunorreacción, formada por una parte de cada anticuerpo y 18 partes del tampón de incubación (también aportado por el kit comercial). La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente y con agitación (en una plataforma agitadora BTR25, Grant Instruments, England) a 300 r.p.m. Durante este periodo, el anticuerpo anti-Histona-Biotina se unió a las histonas de cada muestra y, simultáneamente, todo el inmunocomplejocomplejo quedó fijado a la estreptavidina del pocillo. Por su parte, el Anti-ADN-POD se asoció al ADN unido a las histonas capturadas por el anticuerpo anterior (figura 18).

Paso 2. Transcurrido este tiempo, se vertió la mezcla y se lavó cada pocillo tres veces con 300 μL de la solución de incubación para eliminar los anticuerpos y reactivos no unidos al sustrato mediante la cadena de asociación descrita en el paso 1. Posteriormente, se añadieron 100 μL a cada pocillo de la solución “ATBS” (incluida en el kit), que contiene el sustrato para la reacción de la peroxidasa. Se incubó a temperatura ambiente con agitación (a 250 r.p.m.) durante aproximadamente 15 minutos, hasta que se observó la aparición de color verde. Finalmente se añadieron 100 μL por pocillo de la solución “ATBS Stop” (igualmente incluida en el kit) y se cuantificó la absorbancia a 405 nm. La determinación de la cantidad de ADN fragmentado se realizó, por tanto, en función de la cantidad de POD retenido en el inmunocomplejo.

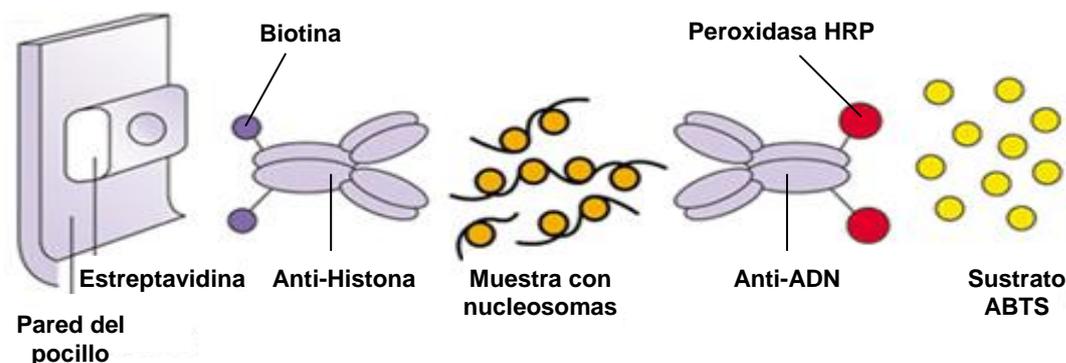


Figura 17. Esquema que muestra el principio del “Cell Death Detection ELISA^{PLUS}”.

5.3 Detección de la fragmentación nuclear: tinción con Hoestch 33258.

5.3.1. Fundamento.

Otra característica representativa del proceso de apoptosis es la rotura del núcleo celular en fragmentos. Este fenómeno se observa muy fácilmente por tinción del ADN celular con colorantes específicos y posterior visualización por microscopía. Por ello, esta técnica puede utilizarse como un índice de apoptosis.

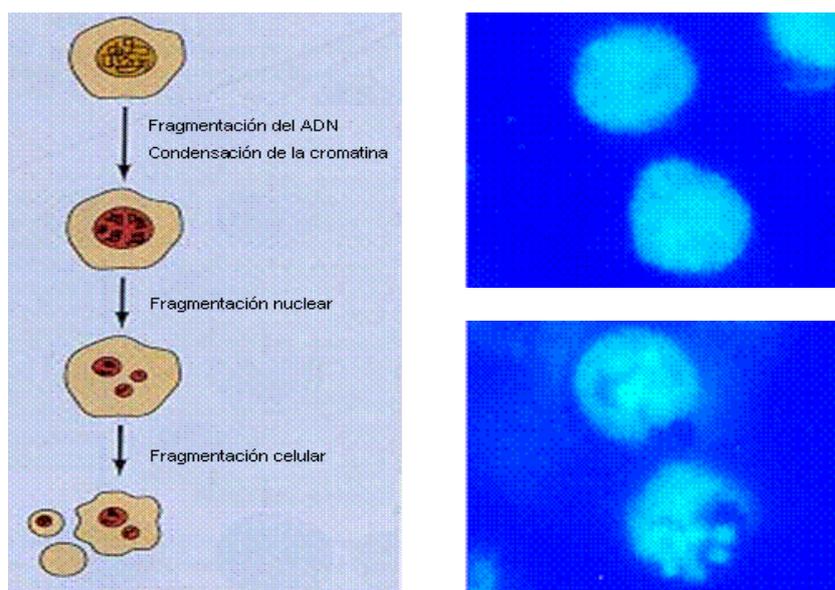


Figura 18. Representación esquemática del proceso de fragmentación nuclear (panel izquierdo), e imágenes de fluorescencia de núcleos normales (panel superior izquierdo) y apoptóticos (panel inferior izquierdo) teñidos con Hoestch 33258.

5.3.2. Procedimiento.

Las células utilizadas para estos experimentos proceden de la misma placa que las utilizadas para obtener los extractos de la cuantificación de ADN fragmentado en el citosol (apartado 5.2.). Por lo tanto, las condiciones de cultivo celular y tratamiento son las indicadas en el apartado 5.2. Después de la obtención del extracto citosólico (apartado 5.2.3.), los restos celulares adheridos a la placa se lavaron dos veces con 2 mL de PBS y se fijaron con 2 mL de paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente se retiró el paraformaldehído y se lavó de nuevo dos veces con PBS. Tras retirar el PBS se añadió la solución permeabilizante (0,1% Tritón X-100, 0,2% ASB, 0,05% azida sódica en PBS) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS dos veces para eliminar los restos de esta solución se tiñeron los núcleos con el colorante Hoestch 33258 (3 μ M en PBS). Este colorante se une irreversiblemente al ADN, y tiene la propiedad de emitir luz fluorescente azul tras ser estimulado con radiación ultravioleta. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente con el colorante se volvió a lavar con PBS dos veces para eliminar los restos de colorante no unido a ADN. Finalmente, las placas cubiertas de PBS se observaron y fotografiaron con un microscopio de fluorescencia invertido (Axiovert 200M, Zeiss), equipado con un sistema digital de captura de imágenes.

6. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

6.1. Fundamento.

El estudio del ciclo celular por citometría de flujo puede aportar una valiosa información sobre la distribución de una población en las fases del ciclo celular, la fracción proliferante de la muestra, el número de ciclos realizados por célula durante un periodo de tiempo, etc. En este caso, se ha determinado la distribución de la población en las fases del ciclo celular, que puede poner de manifiesto una alteración del tiempo de paso por cada una de ellas y, como consecuencia, una ralentización o parada del ciclo.

En la distribución obtenida para una determinada línea celular, se pueden distinguir las fases proliferantes de las no proliferantes por la cantidad de ADN que presentan. Para ello se tiñó su ADN con un colorante fluorescente (ioduro de propidio), de forma que se establece una relación lineal entre la intensidad de fluorescencia que emite una célula y la cantidad de ADN que posee (Nunez, 2001). Así, en un análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares de una muestra en función de la fluorescencia de cada una de sus células, se obtienen varios grupos: Uno mayoritario, que corresponde a las células que se encuentran en las fases G₀/G₁ del ciclo celular; otro, que corresponde a las células que se encuentran en las fases G₂/M, y que, por lo tanto, tienen hasta el doble de fluorescencia que las anteriores, ya que tienen el doble de cantidad de ADN; un tercer grupo está formado por las células que están en la fase S (de síntesis de ADN) y que poseen cantidades intermedias de ADN y de fluorescencia; finalmente, en determinadas circunstancias puede aparecer una cuarta población con una cantidad de ADN (y de fluorescencia) menor que la de G₀/G₁, y que corresponde a células muertas, con su ADN degradado. Así pues, el perfil típico de una población celular normal proliferante, tal y como se observa en un histograma que representa el número de células frente a la intensidad de fluorescencia debida al ioduro de propidio, se muestra en la figura 19:

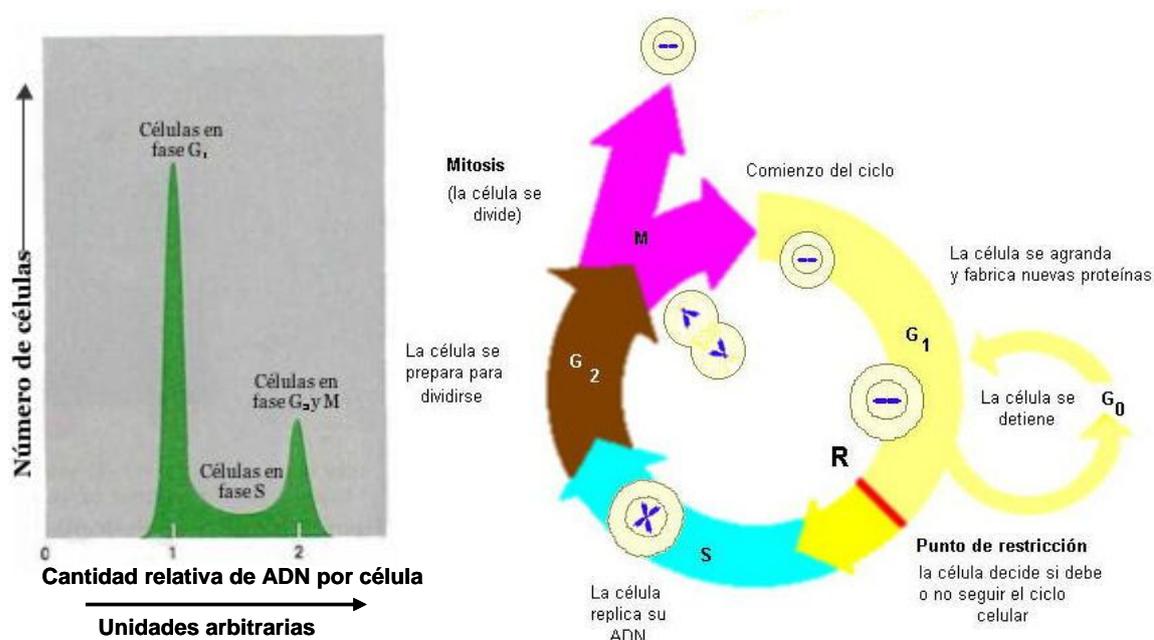


Figura 19. Representación de un histograma de ciclo celular obtenido por citometría de flujo (panel izquierdo), y de un esquema de las fases del ciclo celular (panel derecho).

6.2. Condiciones específicas de tratamiento.

Tratamos a ambas líneas celulares con fluvastatina (1 y 3 μM) siguiendo el protocolo 1 (figura 13) o con fluvastatina (1 y 3 μM) en presencia o ausencia de geranilgeraniol (3 μM) y farnesol (10 μM) siguiendo el protocolo 2 de tratamiento (figura 14). A las 48 y 72 horas de tratamiento procesamos las células.

6.3. Procesado de las células.

Tras el tratamiento, las células de cada muestra se procesaron de la siguiente manera:

- **Recogida y lavado de células.** Tras el tratamiento correspondiente las células se despegaron con tripsina siguiendo el procedimiento anteriormente descrito (apartado 2.2.). La suspensión de células de cada condición de tratamiento se lavó dos veces con PBS. Cada ciclo de lavado consistió en centrifugar la suspensión a 1.900 r.p.m. durante 3 minutos, a temperatura ambiente, para sedimentar las células, desechar el sobrenadante y resuspenderlas con 1 mL de PBS.

- **Fijación y “permeabilización” de las células.** La suspensión de células en PBS se sedimentó por centrifugación y se resuspendió y homogenizó en 50 μL de PBS con

EDTA (0,5 mM). Posteriormente se añadió 1 mL de etanol 70% gota a gota en constante agitación mediante un agitador “vortex”, a una velocidad no superior a 800 g para evitar la rotura de las células fijadas, ya que en estas condiciones las células son más frágiles. Se incubaron a 4 °C durante una noche. El etanol produce la fijación y la “permeabilización” de la membrana celular y nuclear por disolución de lípidos, lo que permite el acceso del yoduro de propidio al ADN nuclear.

- **Tinción del ADN con yoduro de propidio.** Se centrifugó la suspensión celular a 500 g y 4 °C durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante (mayoritariamente etanol) y se resuspendieron las células añadiendo gota a gota 1 mL de solución de lavado (PBS con 1% de Tritón X-100 y EDTA 0,5 mM) en constante agitación con el “vortex” a baja velocidad. Este proceso se repitió. Una vez eliminado el etanol, se volvió a centrifugar la suspensión con las condiciones anteriormente descritas y se resuspendieron las células en 1 mL de solución de lavado que contenía yoduro de propidio (1 mg/mL) y una enzima ARNasa (0,5 µg/mL, Boehringer Mannheim), para destruir el ARN y evitar que interfiriera en la cuantificación del ADN, ya que el yoduro de propidio también se une al ARN. Esta solución se añadió utilizando el vortex a baja velocidad. Las células se incubaron a 4 °C durante al menos 4 horas, protegidas de la luz. Terminada la incubación, se eliminó la solución de tinción por centrifugación y se resuspendieron las células en 2 mL de solución de lavado. A continuación se procedió a su análisis en el citómetro de flujo (FacScalibur, Becton Dickinson, Madrid). La adquisición de datos y el análisis de los resultados se llevaron a cabo empleando el programa informático Cell QUEST (Becton Dickinson, Madrid). En el análisis solamente se tuvieron en cuenta células individuales (singletes), ya que los agregados de dos o más células distorsionan la determinación. Esto se consiguió mediante el aislamiento informático de los singletes por sus características diferenciadoras en la representación de la anchura del pulso (canal FL2-W del citómetro) generado por la fluorescencia del yoduro de propidio, frente al área del pulso de la misma señal (FL2-A).

7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES POR RT-PCR.

7.1. Fundamento.

La RT-PCR es una técnica semicuantitativa que permite determinar la expresión de genes determinados mediante transcripción inversa (RT, acrónimo del

término inglés *reverse transcription*) del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) celular al ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc), y posterior amplificación de una determinada región de éste mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*) con cebadores específicos (Saiki y cols., 1988). De esta manera, se consigue obtener rápidamente una cantidad de material biológico observable (ADNc) a partir de cantidades muy pequeñas. La presencia o ausencia, o la mayor o menor cantidad del ARNm de un determinado gen se corresponde con una mayor o menor expresión, que se determina por una mayor o menor cantidad de su ADNc amplificado por la PCR. En este trabajo se utilizó la técnica de la RT-PCR para estudiar la expresión de genes que codifican ciertas proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno IV y la fibronectina.

7.2. Condiciones específicas de tratamiento.

Se establecieron los protocolos experimentales de tratamiento y recogida de muestras 1 y 3 (figuras 13 y 15 respectivamente):

7.3. Extracción del ácido ribonucleico (ARN) total.

La extracción del ARN del cultivo celular se efectuó utilizando el reactivo comercial TriReagent (Molecular Research Center Inc.), basada en el método desnaturizante del tiocianato de guanidinio y la extracción con fenol/cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993), que combina el tiocianato de guanidinio y el fenol en una solución monofásica para facilitar la inhibición efectiva e inmediata de las ARNasas. Este proceso se realizó en varias fases:

- **Lisado de las células.** Se retiró el medio de cultivo (sobrenadante) de cada placa y se conservó. Inmediatamente, a cada placa de células tratadas se añadieron 500 µL del reactivo TriReagent y se homogeneizó con la micropipeta hasta que la solución se volvió viscosa, como consecuencia de la rotura de las células y la extracción del ADN. Esta mezcla se añadió al *pellet* obtenido tras la centrifugación de los sobrenadantes de cada placa de cultivo. Así se aseguró que el ARN se extraía también de las células que, por acción de la fluvastatina, no estaban adheridas a la placa. La mezcla se incubó durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas

- **Separación.** A continuación, se añadieron 100 μL de cloroformo. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar 15 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12.000 g a 4 °C, durante 15 minutos. Se obtuvieron 3 fases: una fase orgánica roja (inferior), una interfase blanquecina y una fase acuosa incolora (superior). El ARN queda en la fase acuosa superior, mientras que las proteínas quedan en la inferior y el ácido desoxiribonucleico (ADN) queda retenido a la interfase.

- **Precipitación.** Se recogió la fase acuosa y se precipitó el ARN con 250 μL de isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente o durante varias horas a -20 °C o a -80 °C. Después se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 10 minutos.

- **Lavado.** Se desechó el sobrenadante, y el ARN precipitado se lavó con 500 μL de etanol al 70%. Acto seguido se centrifugó todo a 7.500 g a 4 °C durante 5 minutos.

- **Solubilización.** Se retiró el etanol, se disolvió el precipitado en 20-30 μL (dependiendo del tamaño del precipitado) de H_2O DEPC (agua con dietil pirocarbonato – un inhibidor de ARNasas-, D-5758, Sigma, al 0.1% v/v), y se incubó a 65 °C durante 10 minutos en un baño húmedo con temperatura regulable, para asegurar la completa disolución del ARN.

- **Almacenamiento de muestras de ARN.** Dada la naturaleza perecedera del ARN, las muestras se congelaron a -80 °C.

7.4. Medida de la concentración del ARN.

Se realizó una dilución 1:10 en H_2O DEPC con una fracción (10 μL) de la solución de ARN obtenida para evitar errores derivados de manipular volúmenes muy pequeños. La concentración de ARN se determinó por espectrofotometría utilizando el aparato NANODROP-1000 Spectrophotometer (Technologies, US). Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN. Se aseguró la ausencia de elevada contaminación proteica, considerando que la relación adecuada entre las absorbancias a 260 nm / 280 nm y 260 nm / 230 nm estaba comprendida entre 1.6-1.9 y 1,8-2,2 respectivamente.

7.5. Retrotranscripción (ARNm →ADNc).

En este paso se sintetiza el ADN complementario del ARNm (que es una pequeña parte del ARN total extraído). Esto se consigue mediante un cebador complementario de la cola de poliadenina (poli-A) que contiene el ARNm en el extremo 3' y que está ausente en el resto del ARN celular. Esta secuencia complementaria es la polidesoxitimina (poli-dT).

2 µg de ARN de cada muestra se llevaron a un volumen final de 27,5 µL utilizando agua DEPC y se incubaron a 65 °C durante 3 minutos para que el ARN se desnaturalizara a su estructura primaria e inmediatamente se pasaron a hielo. Seguidamente se añadió a cada muestra de ARN un volumen de la *premezcla de reacción* de 12,5 µL que contenía: 2 µl de dNTPs (mezcla equimolar de desoxinucleótido trifosfato – dATP, dCTP, dGTP y dTTP– 10 mM, Applied Biosystems), 8 µL de tampón “M-MLV 5x” (proporcionado por el fabricante, Promega), 1 µL de oligo-dT (1 µg/µL, Isogen; oligonucleótido formado por 16 desoxitimas que permite “retrotranscribir” únicamente el ARNm), 0,5 µL del inhibidor de ARNsas “RNAsin” (Promega) y 1 uL de la enzima retrotranscriptasa (RT M-MLV, Promega). Finalmente se llevó a cabo la reacción de *retrotranscripción* a 42 °C durante 90 minutos en un termociclador (MyCycler, BioRad). Una vez obtenido el ADNc correspondiente a cada muestra se almacenó a –20° C.

7.6. Determinación de la concentración de ADNc.

Se realizó una dilución 1:10 en H₂O mQ estéril con una fracción (10 µL) de la solución de ADNc obtenida. La concentración de ADNc se determinó por espectrofotometría utilizando el aparato NANODROP-1000 Spectrophotometer (Technologies, US). Éste basa su determinación en la medida de la densidad óptica teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/mL de ADNc. Se aseguró la ausencia de excesiva contaminación proteica o de fenol u otros contaminantes, considerando que la relación adecuada entre las absorbancias a 260 nm / 280 nm y 260 nm / 230 nm estaba comprendida entre 1.6-1.9 y 1,8-2,2 respectivamente.

7.7. PCR (amplificación de secuencias específicas de ADNc).

Igualamos todas las concentraciones de ADNc a la más pequeña de las obtenidas en el paso anterior (6.6.) en un volumen final de 23 μL con agua mQ estéril. A cada muestra de ADNc (10 μL) se añadieron 27 μL de la premezcla de reacción formada por los siguientes componentes: 25 μL de la enzima GoTaq[®] Green Master Mix (Promega) que ya incluye los dNTPS, el tampón de reacción con Mg y la enzima, 1 μL de oligonucleótido 3' (cebador directo) y 1 μL de oligonucleótido 5' (cebador inverso) (que estaban en un concentración de 100 ng/ μL) de las secuencias específicas de los genes que se deseaba amplificar (tabla 3).

Las muestras se incubaron en un termociclador (MyCycler, BioRad). Se seleccionó el programa adecuado para cada par de oligonucleótidos añadidos (figura 20). Todos los programas utilizados tenían en común: (i) una primera fase de desnaturalización del ADNc utilizado como molde (95 °C durante 5 minutos), única en todo el proceso; (ii) una segunda fase de desnaturalización con la que comienza cada ciclo de amplificación (95 °C durante 1 minuto); (iii) la fase de hibridación de los oligonucleótidos a una determinada temperatura específica de cada par de oligonucleótidos (T_m , véase la tabla 5), durante 1 minuto); (iv) una fase de extensión de la hebra por la Taq polimerasa (a 72 °C durante 1 minuto); y (v) una última fase de extensión final que permitía a la enzima sintetizar las hebras inacabadas (72 °C durante 5 minutos). Las fases de la ii a la iv se repitieron un cierto número de ciclos (véase la tabla 3) específico de cada amplificación, después de completar la fase i y antes de entrar en la fase v. Lo que varió entre unos programas y otros fue la T_m y el número de ciclos que se repetían las fases ii a la iv (tabla 4).

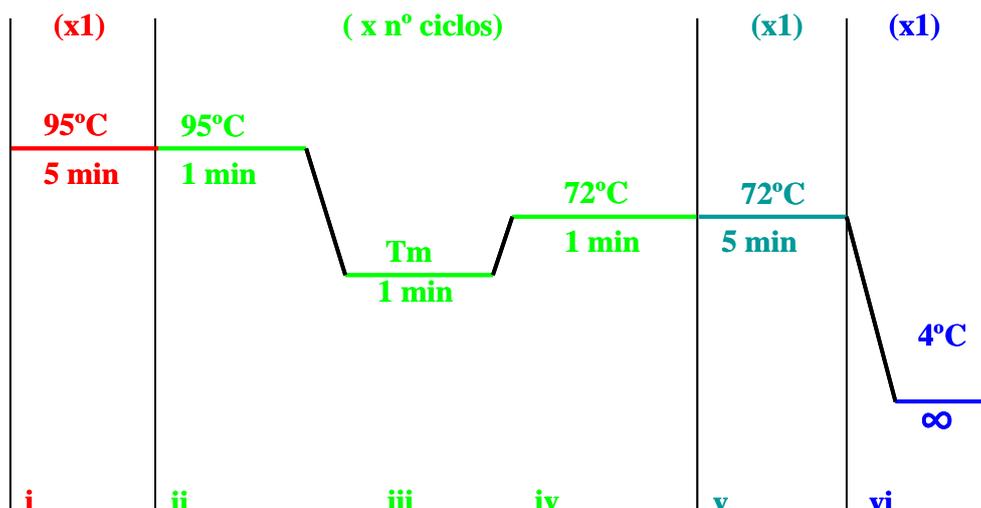


Figura 20. Esquema de las fases de la amplificación por PCR.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIAS	Tm (°C)	CICLOS
GAPDH	Directo: 5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC -3'	60	28
	Inverso: 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'		
18S ARNr	Directo: 5'-TAG AGC TAA TAC ATG CCG ACG	56	30
	Inverso: 5'-TTA ATC ATG GCC TCA GTT CCG- 3'		
COLÁGENO I	Directo: 5'- TGTTGCTGAAAGACTACCTCGT -3'	53	35
	Inverso: 5'-CCTCCCATGTAAATAGCACCT -3'		
COLÁGENO IV HUMANO	Directo: 5'-TCA TTG TTC ACT TCT AAA CCA -3'	50	40
	Inverso: 5'-AGT CAA GTC ATT CAG TTC GTG A-3'		
COLÁGENO IV DE RATÓN	Directo: 5'-CCT GGA TAC CTC AGT GGT TTC CTC C -3'	64	40
	Inverso: 5'-CAG GAA CGG TGC GGC TCT GAA ATC C-3'		
FIBRONECTINA HUMANA	Directo: 5'-AAG GAG AAG ACC GGA CCA AT-3'	58	30
	Inverso: 5'-GGT TTG ATG GTT CTC TGG AT-3'		
FIBRONECTINA DE RATÓN	Directo: 5'-ATG TGG ACC CCT CCT GAT AGT-3'	61,6	35
	Inverso: 5'-GCC CAG TGA TTT CAG CAA AGG-3'		
EGFP	Directo: 5'- CTGACCCTGAAGTTCATCTG	55,3	30
RHOA(Q63L)	Inverso 3'-TCCATCTTTGGTCTTTGCTG	55,3	30

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados. Tm y ciclos de amplificación de cada uno de los genes estudiados. Todos se pidieron a la casa comercial Isogen y fueron reconstituídos en TE (Tris pH=8 10 mM, EDTA 1 mM) autoclavado y filtrado a una concentración de 1 µg/µL,

7.8. Electroforesis en gel de agarosa.

Una vez realizada la PCR, se cargaron 20 μL de cada muestra obtenida en los pocillos del gel de 2% de agarosa en TBE pH=8,1-8,3 con Syber Safe (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gel de agarosa) como colorante intercalante, que permitió visualizar el ADNc a la luz ultravioleta. En uno de los pocillos, se cargó 1 μL de marcador de pesos moleculares (100bp ladder ADN, Invitrogen). La electroforesis se efectuó aplicando al gel un voltaje constante de 110 V en una cubeta llena de TBE. Para observar las bandas a la luz ultravioleta se colocaron los geles en un *transiluminador* (Bio-Rad) y se fotografiaron con la cámara digital.

8. ESTUDIO DE LA PRENILACIÓN DE RHO Y RAS.

8.1. Fundamento.

Las proteínas integrales de membrana (como es el caso de las GTPasas de la superfamilia Ras que se encuentran preniladas) tienen una estructura anfifílica, es decir, tienen una parte hidrofílica en contacto con el citosol, y un dominio hidrofóbico que se ancla a la bicapa lipídica. Mediante una solución del detergente no iónico Tritón X-114 (TX-114) podemos extraer aquellas proteínas que se encuentran ancladas en la membrana y separarlas de las proteínas citosólicas. (Bordier, 1981; Turner y cols, 2007). Durante el proceso de solubilización, el detergente no iónico consigue reemplazar a las moléculas lipídicas en contacto con el dominio hidrofóbico de la proteína integral de membrana, dando lugar a micelas formadas por detergente y proteínas de membrana. En cambio, las proteínas hidrofílicas que se podrían encontrar en el citosol presentan mínima interacción con las micelas que forman los detergentes no iónicos.

El hecho de que se utilice como detergente no iónico el TX-114 y no otro es debido a su “punto de nube” (cloud point), es decir, a la temperatura a la cual el detergente comienza a formar micelas más grandes, que se agregan unas con otras hasta alcanzar un tamaño que no puede mantenerse en disolución. En este punto, la solución pasa de tener un aspecto turbio a separarse en dos fases: una inferior y minoritaria donde se encuentran las micelas del detergente y otra acuosa y mayoritaria en la parte superior. El TX-114 alcanza su “cloud point” a partir de los 20 °C, temperatura mucho más baja que otros detergentes no iónicos (por ejemplo el TX-110, cuyo “cloud point” es

de 64 °C). Por debajo de esta temperatura se forma una solución que extrae eficientemente las proteínas de membrana, y por encima de ésta, las proteínas de membrana quedan dentro de las micelas formadas mientras que las proteínas hidrofílicas permanecen en la fase acuosa. (Bordier, 1981).

Esta técnica resulta una herramienta de trabajo muy adecuada, ya que podemos separar las GTPasas Ras que se encuentran preniladas (ancladas a la membrana) de las GTPasas no preniladas (en el citosol) Es decir, podemos determinar si el tratamiento con fluvastatina está afectando realmente a la prenilación de las proteínas de la superfamilia Ras, y cuáles de los cotratamientos con los diferentes agonistas de los productos del mevalonato (GG y FOH) son capaces de revertir esta inhibición de la prenilación.

8.2. Condiciones específicas de tratamiento.

En este caso se sembraron 2 placas de 60 mm por cada condición de tratamiento, para obtener una mayor concentración de proteínas suficiente para ser detectada mediante Western Blot, ya que la cantidad de proteínas por cada muestra queda dividida entre las diferentes fases obtenidas tras la separación. Tratamos a ambas líneas celulares con fluvastatina (1 y 3 µM) en presencia o ausencia de geranilgeraniol (3 µM) y farnesol (10 µM) siguiendo el protocolo 2 de tratamiento (figura 17). A las 48 y 72 horas de tratamiento se procedió al lisado de cada muestra.

8.3. Separación con Tritón X-114.

Transcurrido el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de las placas, se colocaron sobre una base de hielo picado, se lavó con PBS y se añadieron 500 µL del tampón de lisis que contenía un 1% de TX-114 a 4 °C (Tris 50 mM pH=7,4; 200 mM NaCl₂; PMSF 1 mM; leupeptina 10 µg/mL; aprotinina 10 µg/mL). Los lisados de ambas placas duplicadas se mezclaron en un mismo tubo eppendorf previamente enfriado a 4 °C. El lisado se centrifugó a 14.000 r.p.m., durante 2 minutos a 4 °C. Se tomó la mitad del sobrenadante, que todavía contenía el lisado total, es decir, el total de las proteínas extraídas (citosólicas e integrales de membrana). A esta parte del lisado se la nomino como fracción “T”, que determina el “lisado total” y que representa la suma de las dos fracciones que obtendremos del resto del sobrenadante. La otra mitad del sobrenadante de calentó a 30 °C durante 1-2 minutos. Esto hizo que el Tritón X-114 superara su “punto de nube” (cloud point) y formara grandes micelas, reteniendo aquellas proteínas

de membrana, entre ellas las preniladas. Estas micelas se decantarán al fondo del tubo mediante centrifugación a temperatura ambiente durante 2 minutos a 14.000 r.p.m. Como resultado obtuvimos dos fases o fracciones: la fase superior, a la que denominamos “A” de “acuosa” y que engloba las proteínas citosólicas, y la fase inferior y menos voluminosa, que denominamos “D” de “detergente” y que engloba a las proteínas integrales de membrana. Separamos ambas fracciones en tubos diferentes, previamente enfriados e igualamos la cantidad de TX-114 en ambas fases: a cada fase A le añadimos 50 μ L de tampón de lisis con 1% de TX-114 y a cada fase D le añadimos 500 μ L de tampón de lisis sin TX-114.

De esta manera obtuvimos 3 fracciones diferentes: la fase A, con las proteínas citosólicas de la muestra (entre las que se encontrarán las proteínas de la superfamilia Ras no preniladas), la fase D, con las proteínas integradas en la membrana (entre las que se encuentran las proteínas preniladas) y el lisado T, que equivale a la suma de ambas fases A y D, es decir, al extracto de proteínas totales de cada muestra.

Finalmente preparamos todas las fracciones para ser separadas por Western Blot añadiendo tampón de carga y calentando a 95 °C durante 3 minutos (apartados 9.3 y 9.4).

9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*.

9.1. Fundamento.

Esta técnica está basada en la separación de proteínas mediante electroforesis en función de su peso molecular, que, una vez separadas, se pueden identificar, localizar y cuantificar por su capacidad para unirse a anticuerpos específicos (Towbin y cols, 1979). Los anticuerpos están acoplados a sistemas de detección, que permiten localizar las proteínas y establecer una relación entre la intensidad de la señal del sistema de detección y la cantidad relativa de la proteína en las diferentes muestras. El sistema de detección más utilizado es el quimioluminiscente (figura 25). En él, el anticuerpo está unido a la enzima HRP que, en presencia de un sustrato apropiado, produce una reacción luminiscente. La luz generada se detecta mediante una película fotográfica. La intensidad de la señal queda reflejada como mayor o menor área de impresión en la película, que es proporcional a la cantidad de anticuerpo y, este a su vez, proporcional a la cantidad de proteína. La separación de las proteínas mediante electroforesis se basa en el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles que permiten la separación

electroforética de las proteínas se preparan con acrilamida/bisacrilamida al 30% (29,2% acrilamida y 0,8% bisacrilamida).

9.2. Condiciones específicas de tratamiento.

Las muestras utilizadas fueron las obtenidas en la separación de proteínas por TX-114 (apartado 8.3. de esta sección), concretamente la fase “T”, que corresponde al lisado total de las muestras, es decir, a la cantidad de proteínas totales; las proteínas de membrana y las citosólicas. Esta vez cuantificamos la concentración de proteínas de cada lisado de la misma manera que en el apartado 5.2.4, con objeto de normalizar la cantidad de extracto que se debía cargar en el gel de acrilamida.

9.3. Electroforesis y transferencia.

En primer lugar se preparó el gel separador o *running gel* con un porcentaje de acrilamida determinado por el peso molecular de las proteínas que queremos identificar (15% acrilamida: Tris 375 mM pH=8,8; APS 0,1% y TEMED 0,04%) y de un grosor determinado por el volumen de muestra a cargar. El gel separador se dejó polimerizar durante 20 minutos. Seguidamente y justo encima de éste, se preparó el gel concentrante o *stacking gel*, que contenía los pocillos para la carga de las muestras, con un porcentaje fijo de acrilamida y bis-acrilamida (5 % acrilamida; Tris 125 mM, pH 6,8; APS 0,1% y TEMED 0,1 %). Se dejó polimerizar otros 20 minutos.

Una vez polimerizados, los geles se colocaron en la cubeta de electroforesis que contenía el tampón de electroforesis (glicina 192 mM; 0.1% p/v SDS y Tris base 25 mM, pH 8.3). Se cargaron en los pocillos las muestras y el marcador de pesos moleculares (una serie de proteínas de pesos moleculares conocidos, teñidas con colorantes para su identificación en el gel) con tampón de carga Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; 25% de glicerol; 2% de SDS y 0,01% de azul de bromofenol) y el agente reductor 2-mercaptoetanol, previamente desnaturalizadas a 100 °C durante 3 minutos. En estas condiciones (desnaturalización y reducción), se deshicieron las interacciones entre proteínas con objeto de que cada una migrara aproximadamente a la altura del marcador de peso molecular que le correspondía por tamaño, y su identificación pudiera beneficiarse de este criterio.

Las proteínas de cada muestra se separaron por electroforesis a un voltaje constante de 100 V (Laemmli, 1970). Después de la electroforesis, las proteínas separadas, se transfirieron desde el gel de acrilamida a una membrana de PVDF

(Millipore), previamente activada durante al menos 10 segundos con metanol. Para la transferencia se utilizó un tampón compuesto por Tris 20 mM y glicina 190 mM, pH 8,4-8,8. La transferencia se realizó en una cubeta en frío manteniendo un amperaje constante de 400 mA durante 90 minutos. El gel se dispuso orientado hacia el ánodo (polo negativo), mientras que la membrana se situó hacia el cátodo (polo positivo). La corriente generada entre los dos electrodos hizo que las proteínas se movieran hacia el polo positivo (figura 21).

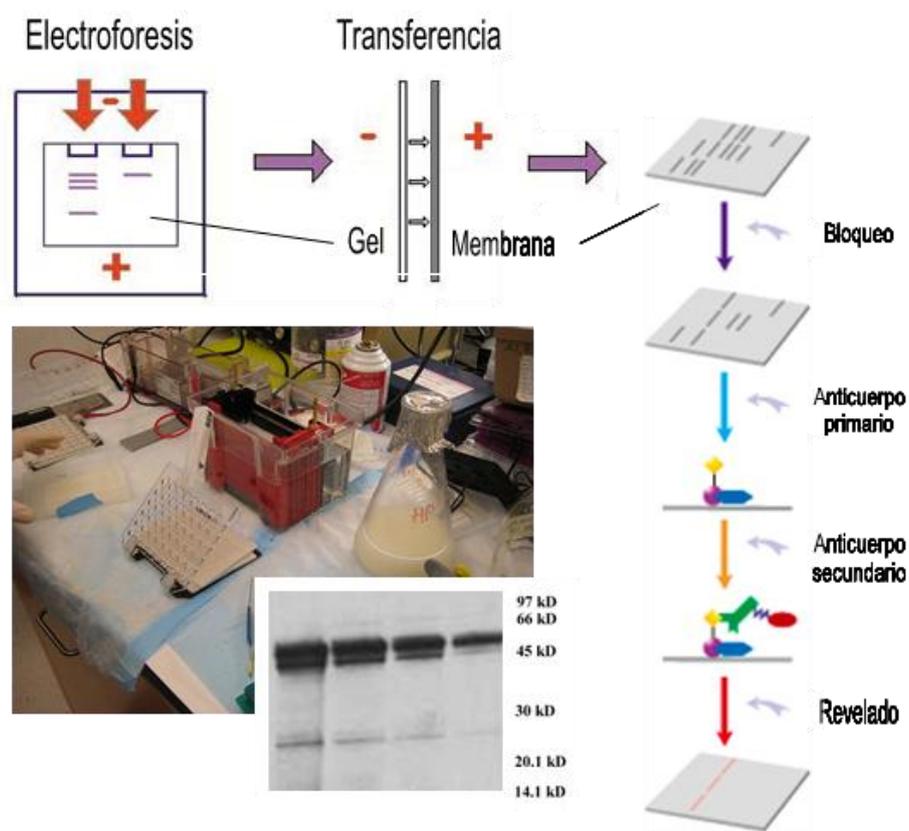


Figura 21. Representación esquemática del sistema de electroforesis.

9.4. Incubación con los anticuerpos.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con tampón de lavado o Tween-Tris buffered saline (TTBS) (Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM y Tween-20 0.1%, pH 7.5-8.0). Para evitar uniones inespecíficas durante la inmunodetección, se incubó la membrana durante 1 hora aproximadamente con tampón de bloqueo compuesto por TTBS al que se añadió albúmina sérica bovina al 3%, a temperatura ambiente, en las condiciones que requería cada proteína.

Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario a la dilución

óptima y en la solución de ASB al 3% en TTBS con agitación durante toda la noche a 4 °C. Seguidamente se hicieron 3 lavados de 10 minutos con TTBS en agitación y posteriormente se incubó la membrana con el correspondiente anticuerpo secundario, a la dilución adecuada, durante 30-60 minutos a temperatura ambiente (Tabla 5). Al terminar se lavaron las membranas 3 veces con tampón de lavado durante 7 minutos.

Molécula (casa comercial del anticuerpo primario)	Dilución del anticuerpo primario	Anticuerpo 2 ^{rio} (dilución en la solución de bloqueo)
RhoA (sc-418)	1:3.000	Anti ratón 1:10.000
RhoB (sc-180)	1:3.000	Anti conejo 1:10.000
RhoC (sc-26480)	1:3.000	Anti cabra 1:10.000
H-Ras (sc 35)	1:3.000	Anti rata 1:10.000
K-Ras (F234) (sc-30)	1:3.000	Anti ratón 1:10.000
Erk 1/2 (sc-94)	1:5.000	Anti conejo 1:10.000
α -Tubulina (DM1A) (Calbiochem CP06)	1:5000	Anti ratón 1:10.000

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados.

La detección de las proteínas se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia. La membrana se reveló en película fotográfica utilizando el método no radiactivo ECL. Finalmente, digitalizamos la película utilizando el programa de tratamiento de imágenes Adobe Photoshop 7.0.

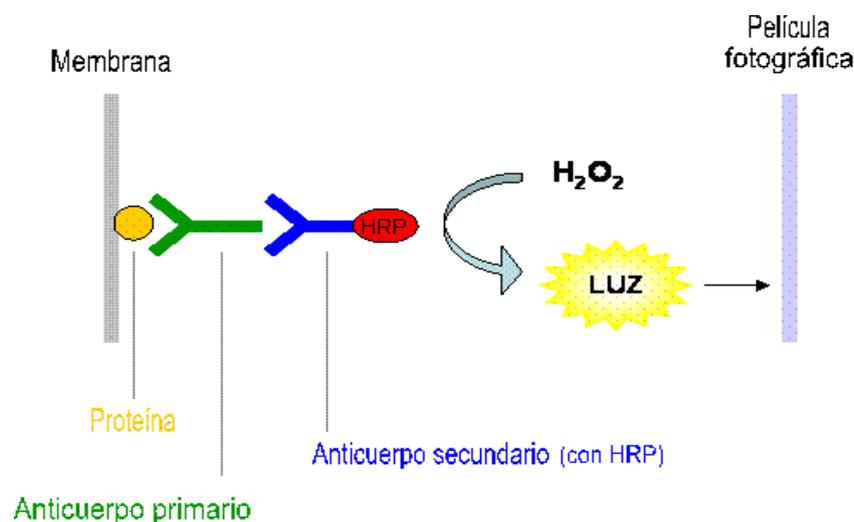


Figura 22. Principio del sistema de detección en el Western blot. El anticuerpo primario reconoce a la proteína y se une a ella. El anticuerpo secundario reconoce al primario, y lleva asociada la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) que, en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) produce luz que imprime una película fotográfica con intensidad proporcional a la cantidad de anticuerpo secundario unido a la proteína, en definitiva, de forma proporcional a la cantidad de proteína.

10. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RHOA (RHOA-GTP).

10.1. Fundamento.

Como ya he comentado en el apartado 5.2. de la Introducción, las pequeñas GTPasas de la familia Rho, entre las que se encuentran RhoA, Cdc42 y Rac1, actúan como “interruptores” moleculares que transmiten señales celulares a una serie de proteínas efectoras. Así, esta familia media en una serie de respuestas celulares como la reorganización del citoesqueleto, la regulación de la transcripción, la migración celular, la “trasformación celular” y la metástasis, etc (Ridley y Hall, 1992, Narumiya y cols., 2009).

Para la familia Rho es de vital importancia la regulación del equilibrio entre el estado activo e inactivo a través de las GTPasas (Shahai y Marshall, 2002; Konstantinopoulus y cols., 2007). La figura 23 representa la activación de Rho por alternancia entre el estado activo, unido a GTP, y el inactivo, unido a GDP.

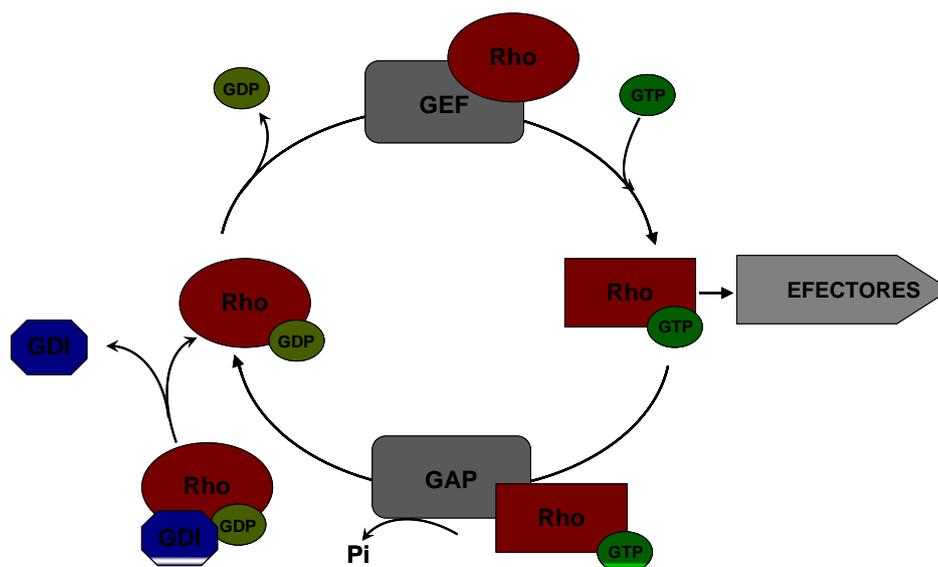


Figura 23. Ciclo de activación/desactivación de Rho.

Lo que los efectores de Rho reconocen es su forma activa, es decir, la unida a GTP, lo cual se ha utilizado como herramienta experimental para purificar mediante afinidad las proteínas Rho activadas (Ren y cols., 1999). Tradicionalmente esta técnica se llevaba cabo mediante el método de “pull-down”, donde se purificaba la proteína de un efector de Rho, generalmente Rhotekin (Reid y cols, 1996), que contenía el dominio de unión a Rho-GTP (“Rho-GTP binding domain, RBD). Este efector se acoplaba a unas “microesferas de agarosa”, permitiendo la que la detección del Rho activo se llevara a cabo a través de la afinidad entre el Rho-GTP de la muestra y estas microesferas (Gudi y cols., 2002; Turner y cols., 2007). Pero este método tenía una serie de inconvenientes: el principal es que las muestras debían ser lisadas e incubadas en un periodo de tiempo muy corto, ya que el GTP se degrada rápidamente a GDP. Esto introducía errores en la determinación e impedía realizar experimentos con un gran número de muestras. Además, la cantidad de proteínas que se necesitaba era muy elevada y finalmente sólo se obtenían resultados semicuantitativos.

Por todo esto decidimos utilizar el ELISA (Engvall y cols., 1971; Voller y cols., 1978) G-LISA™ RhoA Activation Assay Biochem Kit™ (BK121, Cytoskeleton Inc.), que solventa los inconvenientes del “pull-down”. Este ELISA se basa en una proteína de unión a Rho-GTP que tapiza los pocillos de la placa. Así, el Rho-GTP de los lisados se une a los pocillos, mientras que el Rho-GDP se elimina con los lavados. La forma activa de RhoA se detecta gracias a un anticuerpo específico anti-RhoA, que a su vez es

reconocido por un anticuerpo secundario unido a HRP. Así, se puede determinar cuantitativamente la cantidad de Rho activado mediante una reacción de quimioluminiscencia.

10.2. Condiciones específicas de tratamiento.

Tratamos ambas líneas celulares con fluvastatina (3 μM) en presencia o ausencia de geranylgeraniol (3 μM) o farnesol (10 μM) siguiendo el protocolo 3 de tratamiento (figura 15). A las 72 horas de tratamiento se procedió al lisado de cada muestra. También tratamos durante 2 minutos una placa por cada línea celular con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido lisofosfatídico (LPA) (Kusama y cols., 2003), un activador conocido de RhoA, para conocer el “estado de respuesta máximo” que pueden llegar a alcanzar nuestras líneas celulares.

10.3. Obtención de lisados celulares.

Este paso es crítico ya que se debe evitar la degradación del GTP a GDP. Para ello se requirió un rápido procesamiento de las muestras y trabajar a 4 °C. Se retiró el medio de cultivo de cada placa y se lavó con PBS. Tras absorber todo el PBS se añadieron a cada placa 100 μL de tampón de lisis mezclado con el cóctel de inhibidores de proteasas que incluía el kit. Con la ayuda de unos rascadores de goma, el lisado resultante se transfirió a un tubo frío que se centrifugó a 14.000 r.p.m. durante 2 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se congeló rápidamente a -80 °C a la espera de conocer su concentración de proteínas y de ser utilizados en el ELISA. Así evitamos que el GTP unido a RhoA se degradara durante el tiempo utilizado para cuantificar la concentración de proteínas.

10.4. Cuantificación de la concentración de proteínas.

Este paso era obligatorio para añadir la misma cantidad de proteínas en cada muestra y así poder comparar de forma precisa el grado de activación de Rho. Para ello se utilizó el reactivo *Precision RedTM Advanced Protein Assay Reagent* también incluido en el kit. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en las que se mezclaron 10 μL de los lisados (cantidad que se separó antes de ser congelado a -80 °C) y 300 μL de dicho reactivo. Se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro de placa (ELx800, Bio-Tek Instruments) y se obtuvo la concentración de proteínas, medida en mg/mL,

multiplicando la absorbancia por 3,75 (siguiendo las instrucciones del fabricante). Finalmente se igualaron todos los lisados celulares a la concentración menor añadiendo la cantidad necesaria de tampón de lisis a cada uno.

10.5. ELISA.

Añadimos a los pocillos 50 μ L de cada lisado previamente descongelado, igualado al de menor concentración de proteínas y diluido 1:2 con *Binding Buffer*. También añadimos un control positivo y un blanco (éste se obtuvo sustituyendo el lisado por tampón de lisis), todos por duplicado. Incubamos durante 30 minutos a 4 °C y con agitación a 400 r.p.m. Durante esta incubación el Rho activado se unió por afinidad al RBD del efector de Rho que se encontraba tapizando los pocillos. Después lavamos 2 veces con el tampón de lavado. Así se desechó el Rho no activado (Rho-GDP) que no pudo unirse al RBD. A continuación, añadimos a cada pocillo el *Antigen Presenting Buffer* e incubamos durante 2 minutos exactamente y volvimos a lavar tres veces. Añadimos 50 μ L del anticuerpo Anti-RhoA, que previamente se había disuelto 250 veces con *Antibody Dilution Buffer*. Incubamos a temperatura ambiente durante 45 minutos a 400 r.p.m. Durante este periodo el anticuerpo se unió específicamente al Rho-GTP-RBD que tapizaba el pocillo. Repetimos los tres lavados para eliminar el exceso de anticuerpo. De nuevo incubamos los pocillos con 50 μ L del anticuerpo secundario unido a HRP, también diluido 250 veces. Repetimos los tres lavados. Finalmente añadimos 50 μ L del reactivo de reacción de la HRP y esperamos durante 3-5 minutos para obtener una máxima señal luminiscente. Medimos la luminiscencia en el luminómetro (Fluoroskan Ascent FL, Thermo). Ésta será directamente proporcional a la cantidad de RhoA activado de la muestra.

II. INFECCIÓN CELULAR CON RHOA CONSTITUTIVAMENTE ACTIVO: RHOA(Q63L).

II.1. Fundamento.

Como describiremos más detalladamente en el apartado de Resultados y Discusión, RhoA(Q63L) es la proteína RhoA con una mutación que supone el intercambio en la glutamina 63 por una leucina. Este cambio de este aminoácido se produce justo en el llamado *bolsillo de unión al nucleótido*, donde se localiza el fosfato γ del

GTP, lo que disminuye la capacidad de la propia GTPasa de disociar este fosfato y de pasar, por tanto, al estado inactivo (RhoA-GDP). Así, la actividad de las GAPs se ve comprometida. Consecuentemente la cantidad de Rho-GDI es dramáticamente menor que en las células infectadas con el plásmido control y, además, este GDI a veces se une a Rho-GTP, algo que no tiene lugar en condiciones basales (Longenecker y cols., 2003). Como resultado final la proteína RhoA(Q63L) permanece activa de forma constitutiva.

Ya que la línea celular MDA-MB-231 resultó tener una baja eficacia de transfección con agentes lipídicos, p.e con Lipofectamina 2000 (Invitrogen), o catiónicos, p.e. con JetPEITM, o incluso electroporando, realizamos una infección de estas células con un retrovirus que contenía el gen de RhoA constitutivamente activo RhoA(Q63L) cuya construcción se describe a continuación.

II.2. Construcción de los vectores retrovirales.

Quisimos obtener el inserto que codificaba la proteína de fusión EGFP-RhoA(Q63L) e introducirlo en el sitio de multiclonaje del vector de infección retroviral pLCPX. Éste se obtuvo a partir del plásmido pNM041 (GenBank: L25080) cuyo vector vacío es pEGFP-C1 (GenBank: U55763). Para ello digerimos el plásmido pNM041 con las enzimas de restricción AgeI y EcoRI según las condiciones de tiempo, concentración y temperatura que indicó el fabricante y utilizando su tampón comercial específico (figura 26). La muestra de ADN resultante de la doble digestión se cargó en los pocillos de un gel de agarosa al 1 % en TAE pH=8,1-8,3 y con bromuro de etidio (0,1 µg/mL de gel de agarosa), lo que permitió visualizar el ADN a la luz ultravioleta. En uno de los pocillos, se cargó 1 µL de marcador de pesos moleculares (1000bp ladder ADN, Invitrogen). La electroforesis se efectuó aplicando al gel un voltaje constante de 110 V en una cubeta llena de TAE. Para observar las bandas a la luz ultravioleta se colocaron los geles en un *transiluminador* (Bio-Rad) y se cortó con un bisturí el trozo de gel de agarosa que contenía la banda de peso molecular aproximado a 1300 pb.

Seguidamente se purificó el inserto separándolo del la agarosa mediante el kit “GENECLEAN®. Este método se basa en la unión del ADN a una solución de sílice GLASSMILK®, en condiciones de elevada fuerza iónica tras la solubilización de la agarosa con sales caotrópicas: añadimos a los trozos de agarosa 3 volúmenes de la solución comercial de NaI y fundimos la agarosa a 55 °C. Después añadimos la suspensión de sílice (GLASSMILK) incubando durante 5 minutos mientras mezclamos con el vortex. Finalmente centrifugamos a 14.000 r.p.m. durante 5 segundos. El ADN

quedó adherido a la suspensión GLASSMILK que quedó en el *pellet* así que se desechó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con el tampón de lavado con etanol a 4°C hasta dos veces. Finalmente eluimos el inserto añadiendo al *pellet* el tampón TE IX estéril.

De la misma manera obtuvimos un inserto que codificaba la proteína eGFP (del inglés, *enhanced Green Fluorescent Protein*, que equivale a una mutación de la proteína verde fluorescente con mayor fluorescencia que la nativa). La construcción definitiva serviría de control de la infección, es decir, las células MDA-MB-231 infectadas sólo con EGFP tendrían toda la información genética introducida en el proceso de la infección exceptuando el gen de interés RhoA(Q63L) y además, habrían sufrido toda la manipulación necesaria para ello. Así podríamos comparar los resultados obtenidos de ambas células infectadas y evitaríamos atribuir acciones derivadas de la manipulación por la infección a la presencia de RhoA(Q63L).

Para obtener el inserto del gen EGFP realizamos una doble digestión en el vector de transfección vacío pEGFP-N1 con las enzimas de restricción AgeI y NotI según las condiciones de tiempo, concentración y temperatura que indicó el fabricante y utilizando su tampón comercial específico. El inserto se aisló y purificó mediante el mismo procedimiento anteriormente descrito: electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, corte de la banda que medía aproximadamente 700 pb y purificación del ADN.

El siguiente paso fue introducir estos insertos en el vector retroviral pLPCX, que posteriormente se utilizaría para la obtención de los retrovirus. Primero hicimos romos los extremos cohesivos de los insertos mediante la incubación con la enzima T4 DNA polimerasa durante 40 minutos a 37 °C en presencia de dNTPS. Esta enzima es la herramienta ideal para conseguir extremos romos gracias a su doble actividad polimerasa 5' → 3' y exonucleasa 3' → 5'.

Por otro lado, linealizamos el vector retroviral pLPCX mediante la digestión con la enzima EcoRI (a las condiciones de temperatura, concentración y tiempo especificadas por el fabricante y utilizando su tampón comercial específico). Seguidamente, también hicimos romos los extremos cohesivos a través de la T4 DNA polimerasa.

Desfosforilamos los extremos romos obtenidos para evitar el religamiento del vector vacío durante la reacción de ligación posterior, incubando con la enzima fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Finalmente, incubamos el vector linearizado con cada inserto en presencia de la enzima T4 DNA ligasa y ATP durante 1 hora a 16 °C.

Así, obtuvimos dos tipos de plásmidos virales: uno pLPCX con la secuencia que codifica la proteína de fusión eGFP-RhoA(Q63L) y otro plásmido retroviral control pLPCX sólo con el gen EGFP introducido.

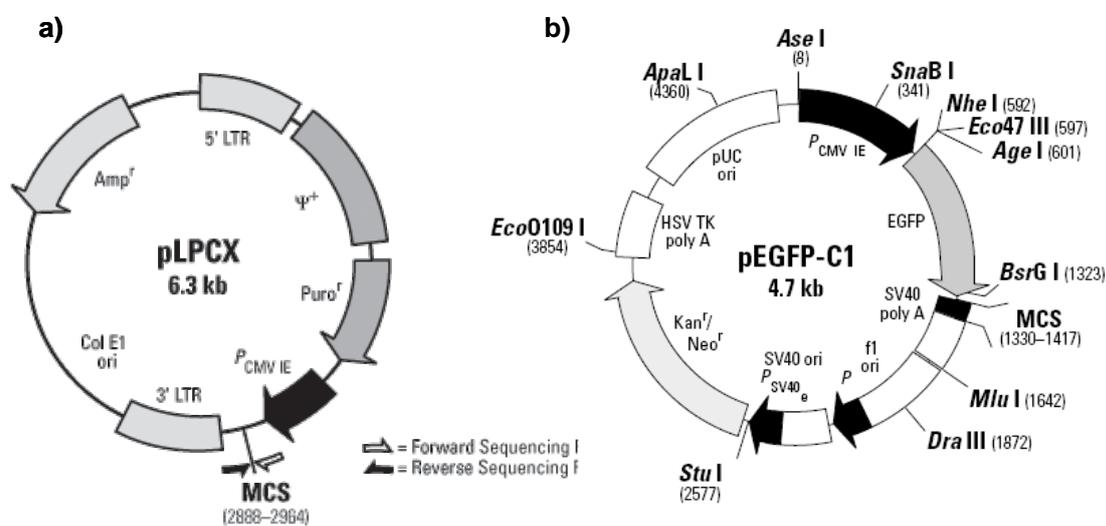


Figura 24. Mapa de los vectores pLPCX y pEGFP-C1. a) **Vector de infección pLPCX:** Entre las secuencias LTRs se encuentra el gen de resistencia a la puromicina, el promotor del citomegalovirus (CMV) que asegura la expresión elevada en casi todos los sistemas celulares conocidos, y el sitio de multiclonaaje (MCS) donde se van a introducir los insertos que codifican la proteína eGFP sólo o la proteína de fusión eGFP-RhoA(Q63L). b) **Vector de transfección pEGFP-C1 (GenBank: U55763):** Equivale al vector vacío del plásmido pNM041 (GenBank: L25080) que contiene en el sitios de multiclonaaje (MCS) el gen que codifica RhoA(Q63L). A partir de este plásmido extrajimos la secuencia que codificaba la proteína de fusión eGFP-RhoA(Q63L). La secuencia que codifica la eGFP se extrajo del vector pEGFP-N1, cuyo MCS se encontraba en posición 5' del gen EGFPy no en 3'.

El siguiente paso fue llevar a cabo la transformación en bacterias competentes DH10B (Inoue y cols., 1990). Se añadieron 2,5 µl de la solución del plásmido a 200 µL de la solución de las bacterias competentes DH10B y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se sometieron a un pulso de 42°C de temperatura durante 30 segundos y se volvieron a incubar en hielo durante un minuto. Después, se añadieron 0,8 mL del medio SOC (Hanahan, 1983) y sembraron con un asa de siembra en varias placas con medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente. Estas placas se incubaron durante la noche a 37 °C. Así, se obtuvieron colonias de células transformadas que habían incorporado el ADN del plásmido, obteniendo la capacidad de resistencia al antibiótico, lo que les permitió proliferar en el medio suplementado con éste.

A continuación llevamos a cabo la *preparación plasmídica analítica* o *miniprep* (Birnboim y Doly, 1979). Cada colonia resultante se picó con un palillo estéril y cada palillo se

inoculó en un tubo con 1 mL de medio. Éste se volvió a incubar durante la noche a 37 °C en agitación horizontal a 250 r.p.m. Al día siguiente se centrifugó el medio con las bacterias durante 2 minutos a máxima velocidad. Eliminamos el sobrenadante por aspiración y añadimos 200 µL del búfer de lisis (10 mM tris-Hcl pH=8, 50 mM EDTA, 8% sucrosa y 0,5 % Triton X-100) a las bacterias. Agitamos durante un minuto y hervimos durante otro minuto. Finalmente centrifugamos durante 15 minutos a temperatura y obtuvimos el plásmido en el sobrenadante.

Todos los sobrenadantes obtenidos de cada colonia se sometieron a una digestión con determinadas enzimas de restricción. Así, conseguimos seleccionar los clones que realmente habían incorporado el plásmido entero y en la dirección adecuada. Finalmente realizamos una preparación plasmídica a gran escala o *maxiprep* a través de kits comerciales (Promega) con aquellos clones de bacterias positivos.

II.3. Infección.

Para infectar las células MDA-MB-231 con los vectores que expresan la proteína de fusión eGFP-RhoA(Q63L) o sólo eFGP como control, primero se transfectó la línea celular 293T, que son unas células embrionarias de riñón humano con *sobreexpresión* del antígeno T grande de SV 40 que se convierten en empaquetadoras cuando tienen integrado el vector pCL-ECO. Se transfectaron las 293T con el vector retroviral pCL-ECO y el vector pLPCX que contenía la construcción que se traducirá en la proteína de fusión EGFP- RhoA(Q63L) o bien sólo el gen EFGP. El primero contiene los genes necesarios para la formación de la partícula vírica; los genes gag, pol y env, el segundo es un plásmido retroviral con un sitio de clonaje, un gen de resistencia a la puomicina, el promotor del citomegalovirus (CMV) que asegura la expresión elevada en casi todos los sistemas celulares conocidos y con secuencias LTR (del inglés, *long terminal repeat*, repeticiones terminales largas) que permiten controlar la regulación y la transcripción viral. De esta manera, las células empaquetadoras generarán retrovirus que contienen la información génica necesaria para expresar nuestras proteínas de interés: eGFP-RhoA(Q63L) y eFGP.

Finalmente, utilizamos los retrovirus formados tras la transfección de las células 293T y recogidos en el medio de cultivo, para infectar nuestras células tumorales, MDA-MB-231.

II.3.1 Transfección de las células 293T:

Se sembraron 3 millones de células 293T en una placa de cultivo de 100 mm en el medio específico de las células MDA-MB-231: DMEM suplementado con 10% de suero fetal bobino (SFB) inactivado (por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos), penicilina 500 U/mL y estreptomina 50 mg/mL. Tras 24 horas se añadió a cada placa los componentes necesarios para la transfección: 10 µg de cada vector pLPCX y pCL-ECO con CaCl₂ 1,25 M resuspendidos previamente en una solución HBS cuya composición final es: NaCl 140 mM; HEPES 25 mM; Na₂HPO₄ 0,75 M, pH 7-7,15. Las células se incubaron a 37 °C entre 15 y 20 horas, tras lo cual se lavó el medio de transfección y se añadió medio fresco. A las 48 horas de la transfección se fue recogiendo el sobrenadante vírico cada 12 horas durante los dos días siguientes. La suspensión vírica obtenida de todas las recogidas se mezcló en una única suspensión de igual eficacia de infección y se congeló a -80 °C para su posterior utilización.

Así, obtuvimos dos tipos de suspensiones víricas; una resultante de la transfección del vector pCL-ECO y el vector pLPCX-EGFP-RhoA(Q63L), y otra control resultante del primero y el vector pLPCX-EGFP.

II.3.2. Infección de las células tumorales MDA-MB-231:

Se sembraron 60.000 células MDA-MB-231 en una placa de 35 mm. Al día siguiente, cuando éstas se habían adherido a la placa y su confluencia era del 70% se sustituyó su medio de cultivo por el medio de infección que contenía los retrovirus con la información genética a infectar. A este medio de cultivo se le suplementó con polibreno en una concentración final de 4 µg/mL. Este proceso se repitió 8 horas después de la primera infección.

Durante los días sucesivos se continuó con el cultivo y se pasaron las células de la placa de 35 mm a otra de 100 mm. Seleccionamos aquellas células infectadas tratando con puromicina 1 µg/mL (concentración tóxica para las células MDA-MB-231 que no contenían el gen de resistencia a la puromicina y que, por tanto, no habían integrado el plásmido pLPCX) y realizando una dilución limitada, mediante la siembra en placas de 96 pocillos a una concentración de 0,5 células/pocillo). Tras el seguimiento de las células durante los días siguientes escogimos la población celular que había crecido en un pocillo (y que, teóricamente, provenía de un clon) y que emitía fluorescencia verde al ser excitada con luz ultravioleta, propiedad conferida por la proteína eGFP y que es expresada gracias al gen introducido en el vector pLPCX.

Escogimos dos poblaciones de MDA-MB-231 infectadas que expresaban la proteína de fusión EGPF-RhoA(Q63L) y que denominamos “A” y “B”. Como control seleccionamos una población de células infectada con aquellos retrovirus que no contenían RhoA(Q63L) pero sí EGFP y que, por tanto, también tenían fluorescencia verde. La eficacia de la infección de en cada población superaba el 95% (figura 54).

El tratamiento con 1 µg/mL de puromicina se continuó para mantener el cultivo de las poblaciones de células infectadas. Se establecieron los protocolos experimentales de tratamiento y recogida de muestras 1 (figura 13). Durante la siembra de los experimentos y el tratamiento con los componentes pertinentes no se trató con puromicina.

12. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Estos estudios se realizaron con hembras de ratones C57BL/6 de aproximadamente 25 gramos de peso corporal procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar, que tenía la composición que se detalla en la tabla 6. Los componentes de esta dieta se administraron en forma de pienso comercial (*Panlab*), que está fabricado, entre otros ingredientes, con granos de cereales, semillas oleaginosas, productos de panadería y de fabricación de pastas alimenticias, productos de pescado y minerales.

Durante el periodo experimental, los animales se mantuvieron en jaulas de 50 x 28 x 20 cm dentro de las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. En cada jaula se colocaron como máximo cinco animales, donde tenían libre acceso a la comida y al agua. Las condiciones ambientales se mantuvieron constantes. La temperatura se mantuvo entre 20 y 22 °C, la humedad ambiental aproximadamente en 60%, la luz se controló mediante un sistema con temporizador que estableció un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y el aire se purificó constantemente mediante sistemas de renovación de aire y de filtración de olores. Tanto el material como los métodos experimentales empleados con los animales de laboratorio, se rigieron siguiendo las recomendaciones recogidas en las siguientes disposiciones legales:

a) Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE relativa a la protección de los animales de laboratorio utilizados para experimentación y otros fines científicos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

b) Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. BOE nº 67, pp: 8509-8512, de 18 de Marzo de 1988.

c) Disposición general nº 25805. Instrumento de ratificación del Convenio Europeo sobre protección de animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, hecho en Estrasburgo el 18 de Marzo de 1986. BOE nº 256 pp: 31349-31362 de 25 de Octubre de 1990. Esta ratificación entró en vigor en España el 1 de Enero de 1991.

d) Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, publicado por el Instituto Nacional de Salud de U.S.A. (NIH, publicación nº 85-23).

Proteína bruta	15.60 %	Vitamina A	15000 UI/Kg
Materias grasas vegetales	2.80 %	Vitamina D ₃	1500 UI/Kg
Celulosa bruta	4.80 %	Vitamina E (tocoferol)	30mg/Kg
Cenizas brutas	4.60 %	Cobre (sulfato cúprico pentahidratado)	10mg/Kg

Tabla 6. Composición del pienso alimenticio de los ratones.

12.1. Transplante de tumores y protocolo experimental.

12.1.1. Fundamento.

Con esta serie de experimentos se pretendió estudiar *in vivo* el efecto de la fluvastatina en el crecimiento tumoral en un modelo de tumor sólido. Para ello se eligió un modelo de transplante de las células de carcinoma de pulmón de Lewis (3LL) en ratones singeneicos (C57BL/6).

12.1.2. Procedimiento.

El proceso experimental se desarrolló de la siguiente manera (figura 25):

• **Distribución de los animales en grupos de experimentación, y tratamiento,** tal y como se describe a continuación:

- **Grupo 1 (Control):** 4 ratones que recibieron diariamente 100 μ L de agua por cada 10 g de peso corporal, mediante administración oral con una cánula esofágica.

- **Grupo 2 (Fluvastatina 10 mg/Kg/día):** 4 ratones que recibieron diariamente 10 mg de fluvastatina por Kg de peso corporal, administrados por vía oral mediante una cánula esofágica en 100 μ L por cada 10 g de peso corporal de una solución acuosa de este fármaco (1 mg/mL).

- **Grupo 3 (Fluvastatina 40 mg/Kg/día):** 3 ratones que recibieron diariamente 40 mg de fluvastatina por Kg de peso corporal, administrados por vía oral mediante una cánula esofágica en 100 μ L por cada 10 g de peso corporal de una solución acuosa de este fármaco (4 mg/mL).

Todos los animales recibieron su tratamiento hasta el día de su sacrificio (figura 25).

• **Transplante de los tumores.** 3 días después de iniciado el tratamiento se procedió al transplante de los tumores en todos los ratones. Para ello, primero se rasuró el dorso de los animales. A continuación se les inyectó subcutáneamente en la zona media de la espalda 100 μ L de una suspensión de 2 millones de células 3LL en PBS estéril.

• **Seguimiento del crecimiento tumoral.** Diariamente se determinó el volumen aparente de los tumores. Con este fin se midió la anchura y la longitud del tumor usando un calibre digital, y se calculó el volumen mediante la siguiente fórmula (V representa el volumen, A la anchura y L la longitud):

$$V = A^2 \times L$$

• **Sacrificio, recogida de muestras y estudios *post mortem*.** Por razones de correcta práctica experimental, siguiendo las recomendaciones internacionalmente aceptadas, los animales se sacrificaron cuando el volumen de los tumores del grupo Control alcanzó 1-1,5 cm^3 (aproximadamente 10 días después del transplante) se sacrificó a los animales y se extrajeron los tumores que se pesaron.

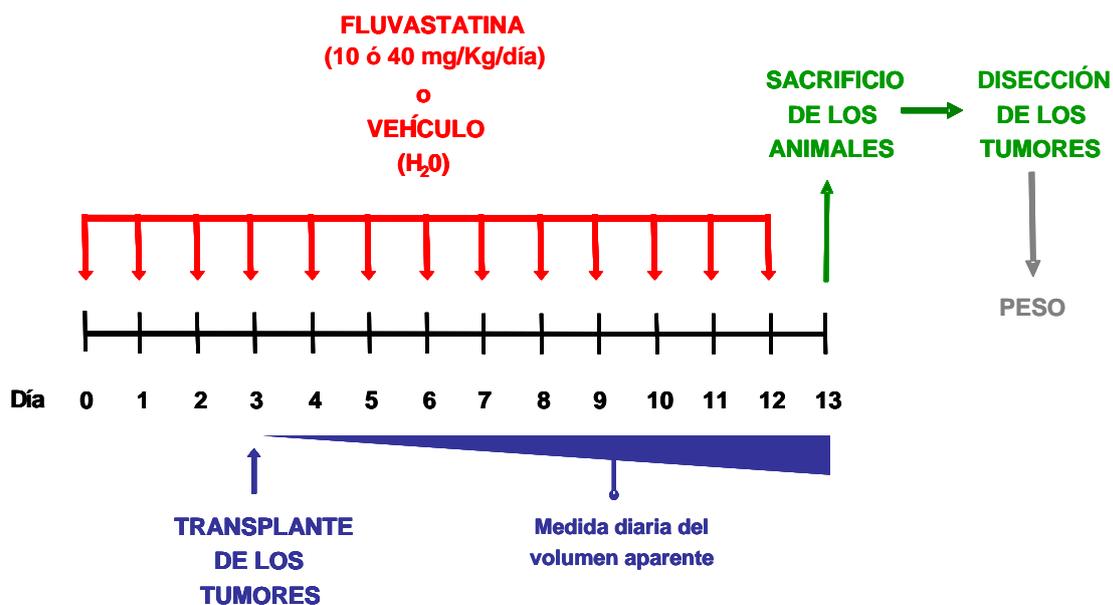


Figura 25. Representación esquemática del protocolo de los experimentos de trasplante y seguimiento tumoral.

13. ANÁLISIS DE LOS DATOS.

Todos los experimentos se realizaron por lo menos tres veces (como se indicará en cada figura) y hasta que se obtuvieron resultados consistentes y reproducibles. Los datos se expresaron como media de los valores obtenidos en cada grupo experimental \pm su desviación estándar o su error estándar. Para el estudio estadístico se utilizó el análisis ANOVA.

I. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN EL CRECIMIENTO DE TUMORES TRANSPLANTADOS.

Se estudió *in vivo* el efecto de la fluvastatina en el crecimiento tumoral en un modelo de tumor sólido. Éste es uno de los métodos que evalúan el efecto anticanceroso de los fármacos. Para ello se eligió un modelo de trasplante subcutáneo singeneico en ratones C57BL/6 con células 3LL de carcinoma de pulmón de Lewis, con las que también se realizaron experimentos *in vitro*. Este modelo de trasplante subcutáneo no pretende ser extrapolado a ningún tipo de cáncer clínicamente relevante. Tan solo se trata de un modelo experimental de tumor sólido (en animales inmunocompetentes) en el que se pueden estudiar nuevas hipótesis que, de resultar ciertas, plantearían nuevas oportunidades terapéuticas potenciales, aplicables a tumores o cánceres concretos con relevancia clínica.

Como se observa en la figura 25, los ratones controles desarrollaron inmediatamente un tumor que creció muy rápidamente. En todos los grupos existió una variabilidad moderadamente elevada en el volumen del tumor de cada animal (como reflejan las barras de error). Éste es un resultado completamente normal en este tipo de experimentos, que refleja una respuesta multifactorial, específica e individual de cada animal al trasplante. La agresividad de este modelo tumoral tiene, para nuestros objetivos, ventajas e inconvenientes. Las ventajas son la eficacia tumorigénica (la inmensa mayoría de los ratones desarrollan tumores) y la rapidez con la que pueden realizarse los experimentos. La desventaja es el escaso marco temporal existente para hacer estudios en puntos intermedios del crecimiento del tumor. Obviamente, el progreso de esta línea de investigación (en la etapa preclínica) precisará el estudio de otros modelos animales.

La figura 25 demuestra claramente que la fluvastatina, a la dosis diaria de 40 mg por kg de peso del animal, es capaz de inhibir significativamente el crecimiento del tumor en este modelo. De nuestros datos no podemos inferir si la acción de la fluvastatina simplemente retrasa el crecimiento tumoral o, por el contrario, de persistir su acción y continuar el seguimiento, el volumen de los tumores comenzaría a disminuir en algún momento del tratamiento. La dosis baja del fármaco (10 mg/kg/día) no produjo ninguna diferencia en la evolución del crecimiento del tumor, comparada con la del grupo control.

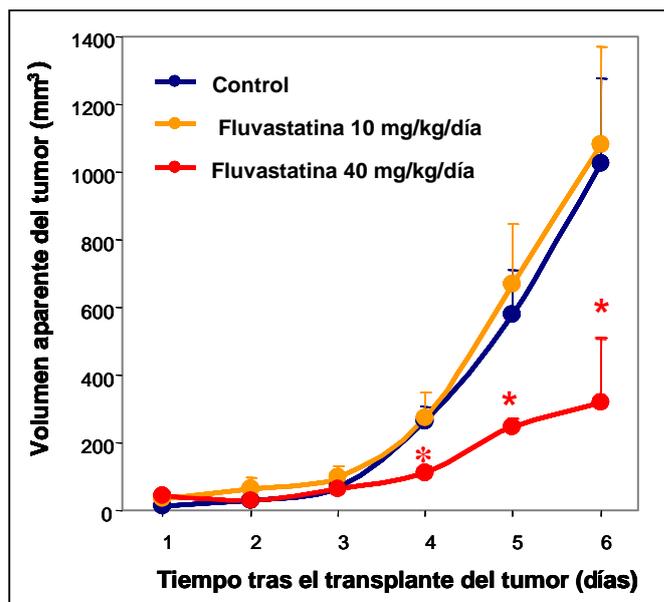


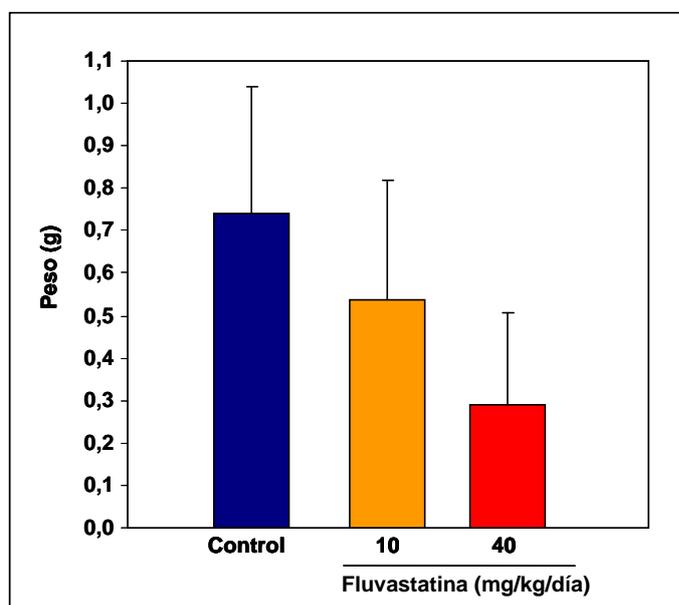
Figura 25. Efecto de la fluvastatina en el crecimiento tumoral. Volumen aparente de los tumores medidos durante los días sucesivos al trasplante de las células 3LL en los ratones C57BL/6. El experimento se repitió dos veces con n=10 ratones por grupo en total. Los valores representan la media \pm DE de 3-4 animales de cada grupo en uno de los experimentos * $p < 0,05$ con respecto a la curva del grupo Control.

Los datos del peso del tumor una vez extraído *post mortem* parecen poner de manifiesto una relación dosis-efecto de la fluvastatina que no alcanza diferencia estadística en ninguno de los casos (figura 26). La tendencia, no obstante parece ser congruente con la medida del volumen del tumor, aunque hay que tener en cuenta que este tipo de tumores presentan amplias áreas de necrosis en su interior, que pueden romper la aparente relación directa entre el volumen y el peso del tumor.

Estos experimentos, constatan que la fluvastatina tiene efecto *in vivo* en este tipo de tumores, y la dosis alta del fármaco es claramente efectiva.

Finalmente, cabe comentar que se inició el tratamiento con la estatina unos días antes del trasplante del tumor por motivos puramente experimentales, derivados de la rapidez del crecimiento tumoral, y para asegurar una biodisponibilidad estable del fármaco desde el momento en que comienza a crecer el tumor. Como se indicará más abajo, la acción efectiva de las estatinas precisa de un periodo cercano a las 48 horas para las concentraciones menores, ya que, además de inhibir la nueva prenilación de proteínas, su efecto depende de la desaparición de las que estaban preniladas. La realidad clínica de la mayoría de los tumores se ajusta a un crecimiento mucho más lento que proporciona un marco de actuación mucho mayor para intervenir (i) en el recambio de los elementos de la MEC de un tumor un poco desarrollado ya

en el momento de su detección, y (ii) en la inhibición parcial de la producción de MEC en las áreas de crecimiento a partir del momento de administración del fármaco.



*Figura 26. Peso de los tumores extraídos tras el sacrificio de los ratones. El experimento se repitió dos veces con n=10 ratones por grupo en total. Los valores representan la media ± DE de 3-4 animales de cada grupo en uno de los experimentos * p < 0,05 con respecto a la curva del grupo Control.*

RESUMEN

La fluvastatina ejerce un efecto antitumoral in vivo en un modelo experimental de tumor epitelial singéico.

2. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

A la vista de los resultados obtenidos *in vivo*, parece lógico preguntarse y estudiar si la pérdida de la masa tumoral se debe a un efecto directo de la fluvastatina en la proliferación y en la viabilidad de las células cancerosas, o más bien es consecuencia de su actuación en otros componentes del tumor (como sus vasos sanguíneos) o de factores extratumorales que de alguna manera afecten al crecimiento neoplásico. Para estudiar alguno de estos aspectos utilizamos cultivos celulares. En este punto debe introducirse una nota de precaución a la hora de interpretar los resultados. Los cultivos celulares son sistemas de experimentación

sumamente alejados de la realidad biológica y fisiopatológica de un tumor real en su entorno. Por su simplicidad son convenientes para estudiar ciertos aspectos celulares y moleculares que no podrían estudiarse *in vivo* en el complejo entramado de factores farmacocinéticos y bioquímicos incontrolables que se presentan. En cualquier caso, la constante validación bidireccional *in vitro-in vivo* y viceversa de los resultados obtenidos, es completamente necesaria para avanzar con seguridad en la validez de los descubrimientos.

La figura 27 muestra que a las 24 horas de tratamiento con la fluvastatina, la proliferación de ambas líneas celulares no se ve afectada significativamente; sólo disminuye ligeramente con concentraciones altas del fármaco (100 μM). A las 48 horas de tratamiento comienza a observarse una disminución de la proliferación que sobrepasa el 50% con concentraciones altas (10 y 100 μM). A las 72 horas de tratamiento se observa una disminución de la proliferación de más del 50% con bajas concentraciones (0,3-3 μM). Determinamos a estas últimas como las concentraciones de fluvastatina “submáximas”, ya que la inhibición de la proliferación es clara pero no llega a ser total, y por lo tanto los mecanismos inhibidos no se encuentran saturados. Así, en este rango de dosis, se podrá ver mejor el efecto de posibles moduladores de la acción de la fluvastatina.

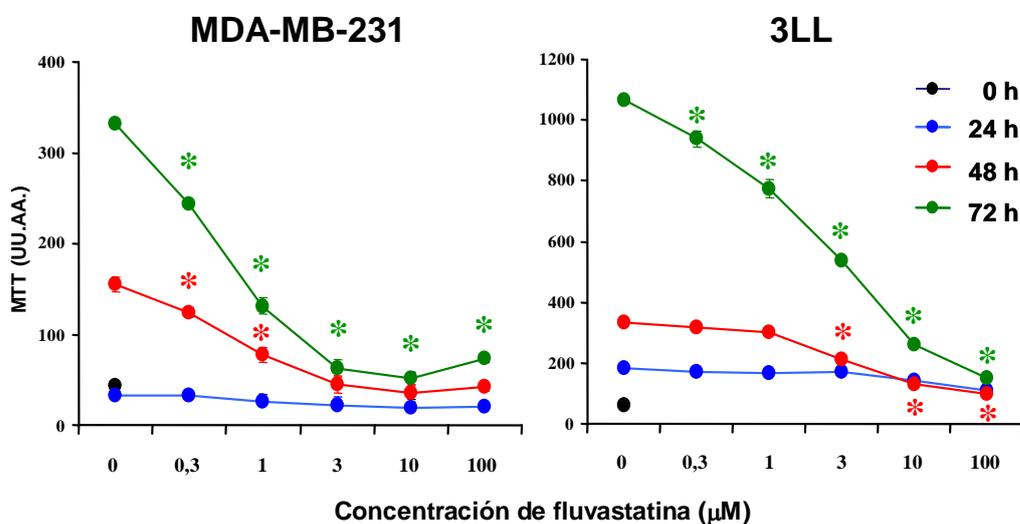


Figura 27. Efecto de la fluvastatina en la proliferación de células MDA-MB-231 y 3LL. Las células fueron tratadas durante 0, 24, 48 y 72 horas con fluvastatina (0,3, 1, 3, 10 y 100 μM), o el vehículo como control, y al final de cada periodo se determinó la cantidad de células viables mediante la técnica del MTT. Los experimentos se realizaron dos veces por triplicado. Los datos se expresan como media \pm DE. * $p < 0,05$ con respecto al control (vehículo) de cada periodo. UU.AA: Unidades arbitrarias.

Estos resultados indican que, en las condiciones establecidas en el cultivo, la fluvastatina tiene la capacidad de inhibir, de forma dependiente de la concentración, la proliferación de dos líneas celulares tumorales epiteliales de origen diferente y de especies distintas. Este efecto puede deberse a una ralentización (o incluso parada) del ciclo de división celular, a la inducción de la muerte celular (como consecuencia del efecto sobre el ciclo de celular o independientemente de él), o ambos factores. Estos aspectos se estudiaron también y los resultados se mostrarán en los apartados siguientes.

Que la fluvastatina inhiba más la proliferación de las MDA-MB-231 sugiere varias posibilidades: (i) una mayor sensibilidad a la prenilación de las proteínas relacionadas con la proliferación; (ii) que el recambio molecular de esta línea celular es más rápido y requiere más síntesis de *ново* de proteínas y, por lo tanto, más cantidad de GGPP y FPP; o (iii) que las MDA-MB-231 captan una mayor cantidad de fluvastatina en comparación con las 3LL.

2.1. Papel de la ruta del mevalonato en la acción antiproliferante de la fluvastatina.

Para conocer si el efecto antiproliferante producido por la fluvastatina era debido a la inhibición de la síntesis de mevalonato y, por lo tanto, a la falta de éste para obtener alguno de sus productos (figura 11 mevalonato) y no por la acción de la fluvastatina sobre alguna otra ruta no relacionada con el mevalonato, o simplemente a un efecto tóxico inespecífico, tratamos ambas líneas celulares con fluvastatina y con concentraciones seriadas de mevalonato durante 72 horas. La fluvastatina es un inhibidor competitivo de la HMG-CoA reductasa (figura 10), una enzima que cataliza el paso limitante de la síntesis de colesterol. Ésta sintetiza el paso de HMG-CoA a mevalonato. Las estatinas, en general, consiguen el bloqueo del intermediario de la reacción que se forma en el sitio activo de la enzima por analogía estructural (Goldstein y Brown, 1990) (figura 9). Añadiendo el producto que directamente es inhibido, esta vía se restauraría y, si el efecto observado depende de ella, el efecto antiproliferante de la fluvastatina se debería revertir.

Como se observa en la figura 28, la acción antiproliferante de la fluvastatina es revertida por el mevalonato en ambas líneas celulares. Esto indica que la estatina ejerce sus acciones antiproliferantes por la inhibición de la síntesis del mevalonato y, por tanto, por bloqueo de esta ruta.

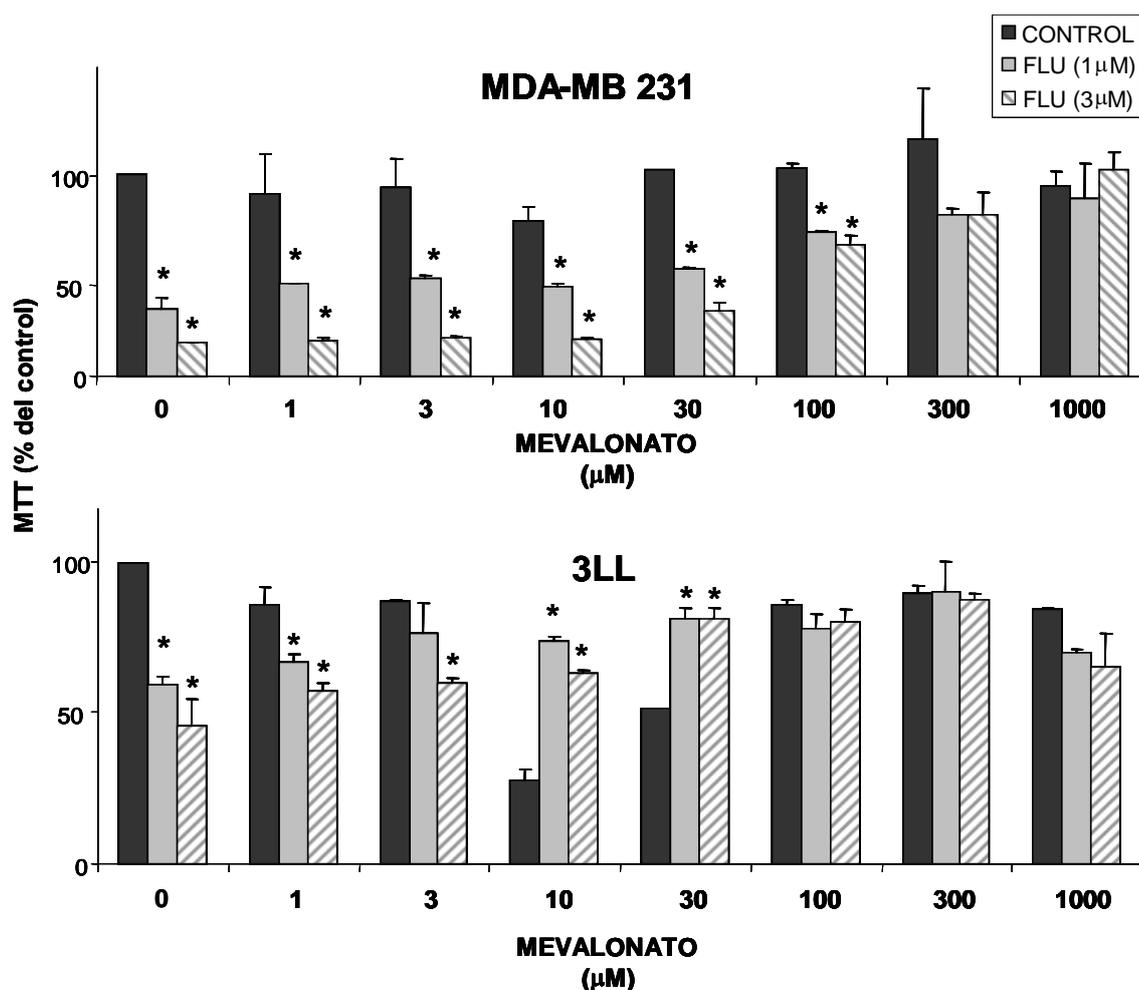


Figura 28. Efecto del mevalonato exógeno en la acción antiproliferante de la fluvastatina en las células MDA-MB-231 y 3LL. Proliferación celular evaluada mediante la técnica del MTT, tras el tratamiento durante 72 horas con fluvastatina (1 y 3 μM) o agua como control en presencia o en ausencia de mevalonato (1 -1000 μM). Los experimentos se realizaron tres veces por triplicado. Los datos se expresan como porcentaje de las medias ± D.E. dando al control el valor de 100%. * p < 0,05 con respecto a cada control.

2.2. Papel de la farnesilación y la geranilación en la acción antiproliferante de la fluvastatina.

Cabe dilucidar si el o los productos cuyo agotamiento produce una disminución en la proliferación son específicamente el mevalonato u otros derivados de éste. Como ya se indicó en la Introducción, se sostiene que este efecto de la fluvastatina sobre las células tumorales es debido a la falta de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) o farnesil pirofosfato (FPP), sustratos de la geranilación y farnesilación de las proteínas CAAX. Entre éstas se encuentran las pequeñas GTPasas de la familia de Ras, que intervienen en un gran número de funciones celulares, como la proliferación (Wong y cols., 2002; Chan y cols., 2003; Hindler y cols., 2006). Además, en las

células transformadas, éstas pequeñas GTPasas están mutadas o *sobreexpresadas* y tienen un papel crucial en el desarrollo del cáncer (Sahai y Marshall, 2002; Tang y cols., 2008). Concretamente, nuestra línea tumoral MDA-MB-231 es una línea de cáncer de mama altamente invasiva, con mutaciones oncogénicas en Ras y *sobreexpresión* de RhoA (Denoyelle y cols., 2001; Fritz y cols, 1999).

Se incubaron las células con farnesol (FOH), análogo del FPP o con geranilgeraniol (GG), análogo del GGPP. Cada uno de estos compuestos incorpora selectivamente uno de los productos del metabolismo del mevalonato que intervienen en la prenilación proteica y restituye selectiva e independientemente la farnesilación y geranilación de proteínas (Zhong y cols., 2005) (figura 10 de la Introducción).

Para realizar estos experimentos se utilizaron las concentraciones de 1 y 3 μM de fluvastatina ya que, con ellas, tras 48 y 72 horas de tratamiento, se conseguía una disminución submáxima de la proliferación, del 50% aproximadamente (ver figura 27). Las concentraciones de GG y FOH se titularon en experimentos piloto: se eligió la mínima concentración que producía máxima reversión en la inhibición de fluvastatina y que no afectaba por sí misma a la proliferación celular.

Como se observa en la figura 29, el GG revierte el efecto antiproliferante de la fluvastatina en las células MDA-MB-231 y 3LL, a las 72 horas. Esta reversión es diferente dependiendo de la línea celular: en MDA-MB-231 la reversión es prácticamente total, mientras que en las 3LL la reversión es parcial, aunque también estadísticamente significativa. En cambio, el farnesol (FOH), incluso a una concentración tres veces superior a la del GG, no modifica la inhibición de la proliferación producida por la fluvastatina, si bien en las 3LL produce una ligera reversión que en ningún momento llega a ser estadísticamente significativa.

Esto indica que la inhibición de la proliferación es debida a la falta de GGPP y no de FPP, y que el mecanismo molecular implicado en la acción de la fluvastatina es la geranilación de las GTPasas relacionadas con la proliferación y la regulación del ciclo celular. En cambio, la farnesilación no está tan relacionada.

A la vista del diferente comportamiento entre ambas líneas celulares tumorales, podemos decir que los efectos de la fluvastatina no son “universales” y, ante un efecto antiproliferante similar, el mecanismo de acción es diferente. Esto era esperable teniendo en cuenta que cada línea celular tiene mutados o *sobreexpresados* diferentes tipos de GTPasas de la familia de Ras.

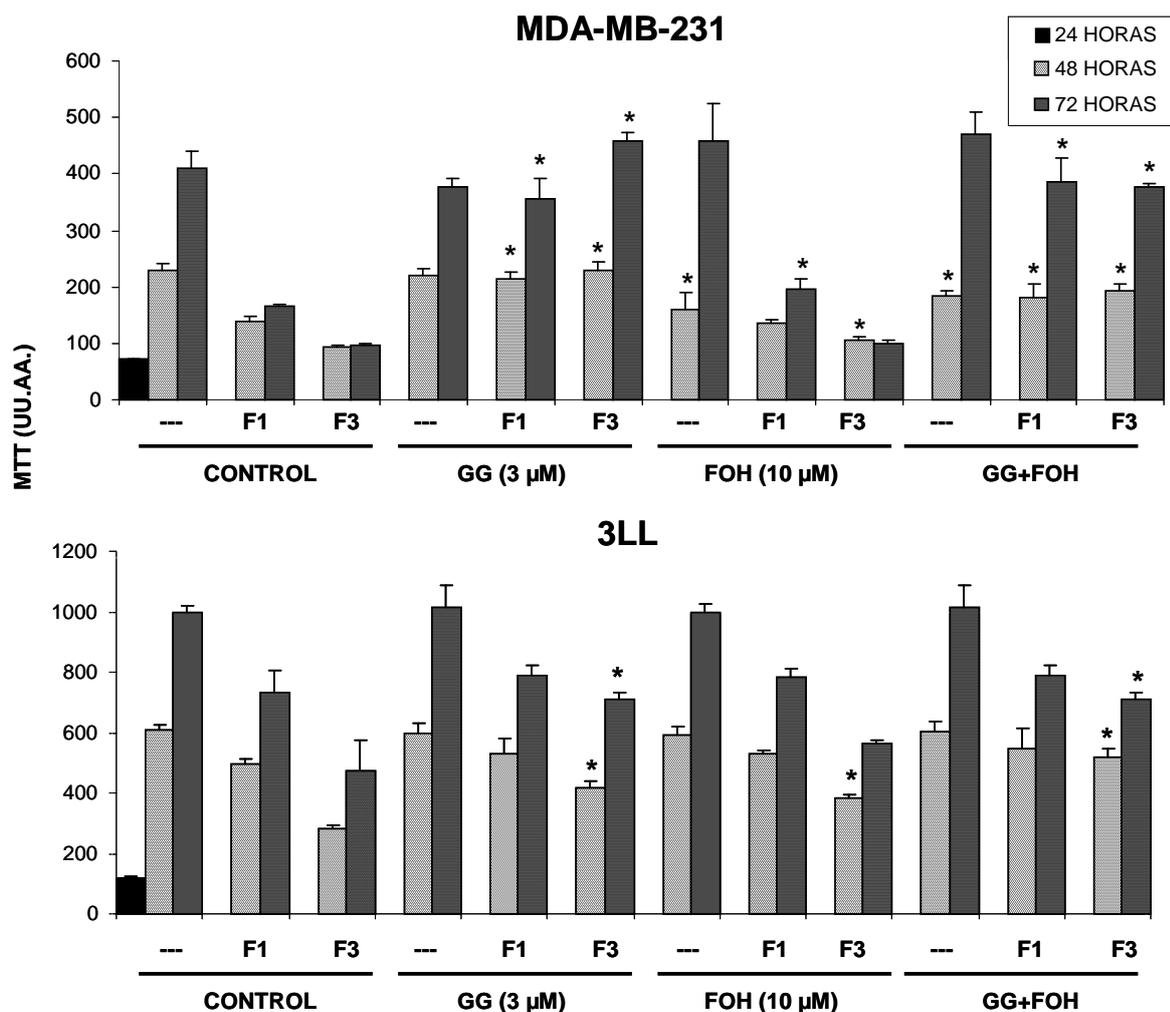


Figura 29. Secuencia temporal del efecto de la fluvastatina, en presencia o ausencia de geranilgeraniol y farnesol, en la proliferación de células MDA-MB-231 y 3LL. Tras el tratamiento durante 48 y 72 horas con fluvastatina 1 μM (F1), 3 μM (F3) o agua [como control (-)], en presencia y ausencia de geranilgeraniol (GG) 3 μM y farnesol (FOH) 10 μM o etanol (como control) (-), se cuantificó el número de células viables mediante MTT. Los experimentos se realizaron tres veces por triplicado. Los datos se expresan como media ± D.E. * p < 0,05 con respecto al control de cada tiempo tratado o no con fluvastatina. UU.AA: Unidades arbitrarias.

Teniendo en cuenta que cada proteína puede ser farnesilada, geranilada o ambas, es muy difícil determinar con este único abordaje qué proteínas de la familia de Ras están implicadas en la proliferación. Por ejemplo, dentro de la familia de Ras, tenemos tres isoformas diferentes; H-Ras, K-Ras y N-Ras. De éstas, sólo H-Ras se farnesila exclusivamente (Konstantinopoulos, y cols., 2007, Philips y Cox, 2007). Las otras dos generalmente se farnesilan, pero se ha demostrado que, cuando existe una falta del sustrato FPP, pueden llegar a geranilarse, lo que permitiría una prenilación adecuada y, por lo tanto, una localización en la membrana y una función idéntica a la del equivalente farnesilado (Philips y Cox, 2007). En

cambio, la familia de Rho generalmente se geranila. RhoA y C, cuya actividad en células tumorales estimula la proliferación, exclusivamente se geranilan; pero RhoB, cuya actividad es antiproliferante, también puede farnesilarse (Turner y cols., 2007). Todo esto se complica aún más si lo extrapolamos a un caso de cáncer real, en el que pueden existir muchos tipos de mutaciones y *sobreexpresiones* de estas proteínas en función del tipo de célula, de su localización y del estadio de la enfermedad.

Analizando los resultados del cotratamiento con FOH o GG, vemos que en las células MDA-MB-231 la mayoría de las proteínas de la familia de Ras que tienen un papel importante en la proliferación se geranilan. Esto coincide con los estudios realizados hasta ahora que otorgan la causa de la inhibición de la proliferación a la falta de geranilación de RhoA en esta línea celular (Denoyelle y cols., 2001; Zhang y cols., 2009). De hecho, se ha demostrado que cada proteína de la familia de Rho es necesaria para la proliferación y la transformación inducida por Ras (Khosravi-Fa y cols., 1995, Chan y cols., 2003; Tang y cols., 2008, Narumiya y cols., 2009). Se sabe que Ras utiliza sus tres cascadas de señalización, la de las MAPKs (Raf-MEK-ERK), la de PI-3-kinasa y las de RalGDS para inducir una transformación completa. Posiblemente la señalización de Rho se concierte con cualquiera de las tres para complementar el proceso (Narumiya y cols., 2009; Zhang y cols., 2009). Además, Rac1, Cdc42 y, en menor medida RhoA a través de su efector ROCK, activan la vía de las MAPKs (Sahai y Marshall, 2002).

Probablemente, en células 3LL las proteínas responsables de la proliferación principalmente se geranilan y una fracción exclusivamente se farnesila o bien esta pequeña fracción tiene una prenilación dual; se geranila y, en presencia de FOH, también se farnesila.

2.2.1. Cotratamiento con GG y FOH a la vez.

Para dilucidar un poco más estos mecanismos decidimos cotratar con ambos p, FOH y GG a la vez (figura 29).

En las MDA-MB-231 la reversión del efecto de la fluvastatina es ligeramente menor que sólo con GG. Este dato puede tener valor: probablemente alguna GTPasa relacionada con la proliferación y que normalmente se geranila, también se farnesile en presencia del FOH y el producto farnesilado sea menos o nada activo.

Para las 3LL, aunque con ambos cotratamientos cabía esperar que la reversión de la proliferación fuera total, ya que en presencia del GG sólo había reversión parcial, la tasa de proliferación fue idéntica al cotratamiento con GG sólo. Una posible explicación puede ser la dualidad en la prenilación de alguna GTPasa relacionada con la proliferación. Puede que ésta

tenga la misma actividad con independencia de su grupo prenilo o bien que tenga más actividad cuando está geranilada que cuando está farnesilada. Para esa fracción de proliferación que no se revierte ni con GG o FOH, se podría sugerir que la fluvastatina afecta a proteínas que no están relacionadas con la prenilación, es decir, con la carencia de FPP o GGPP, aunque sí con otro producto derivado del mevalonato, ya que en la figura 28 se demuestra que el mevalonato revierte totalmente el efecto de la fluvastatina. Un candidato podría ser la isopenteniladenina, ya que es un producto del mevalonato que no se deriva del GGPP ni del FPP que es fundamental para la síntesis proteica.

RESUMEN

- *La fluvastatina produce una inhibición de la proliferación dependiente de la concentración, mayor en las células MDA-MB-231 que en las 3LL.*
- *Este efecto antiproliferante es debido al bloqueo de la ruta del mevalonato.*
- *Concretamente, la inhibición de la proliferación se debe a la falta del producto del metabolismo del mevalonato GGPP. La ausencia de FPP tiene poca importancia, aunque mayor en las 3LL. Esto indica que en ambas líneas celulares tienen mecanismos de proliferación similares pero no idénticos.*
- *Por tanto, es posible que la inhibición de la proliferación deba a la falta de prenilación de las GTPasas de la familia de Ras, ya que la función principal del GGPP y FPP es la de donar los grupos prenilo.*
- *La falta de GGPP es más importante que la de FPP lo que sugiere que las GTPasas que regulan la proliferación celular son aquellas que sólo se geranilan. En ambas líneas puede existir una competencia entre ambos sustratos por la prenilación de alguna GTPasa.*

Los experimentos descritos más adelante tratarán de aportar luz a las acciones de la fluvastatina sobre la prenilación, localización, síntesis y activación de la familia de Ras y de relacionar éstos con los efectos antiproliferativos mostrados en este apartado.

3. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN EL FENOTIPO CELULAR.

En la figura 30 se puede observar el aspecto de los cultivos celulares de las MDA-MB-231 y las 3LL tratadas durante 72 horas con unas concentraciones submáximas de fluvastatina (1 y 3 μM). A las 72 horas la fluvastatina produce una marcada inhibición de la adhesión celular al sustrato que se pone de manifiesto por la forma redondeada de las células y por su movilidad en el medio de cultivo. Algunas células llegan a desprenderse completamente y pasan a estar en suspensión.

Aunque no mostramos las fotografías de todos los tiempos de tratamiento, hemos realizado un seguimiento del fenotipo celular producido por la fluvastatina en cotratamiento con GG, FOH y ambos juntos a las 24, 48 y 72 horas. A las 24 horas, la fluvastatina apenas comenzó a inhibir la adhesión celular y ya a las 48 horas, el perfil de inhibición, aunque no tan marcado, fue muy similar al que se observó a las 72 horas.

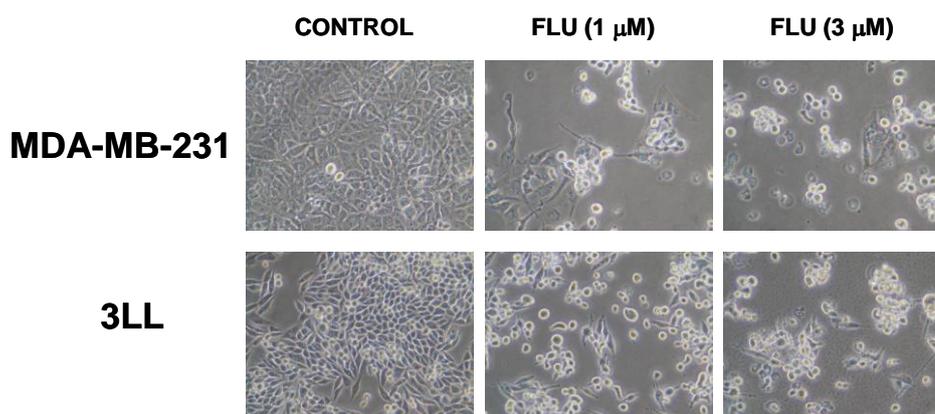


Figura 30. Efecto de la fluvastatina en el fenotipo de las células MDA-MB-231 y 3LL. Las células fueron tratadas durante 72 horas con 1 y 3 μM de fluvastatina (flu) o agua (control) tras lo cual fueron fotografiadas a través de un microscopio invertido con contraste de fases ($\times 200$). Los experimentos se realizaron 5 veces con resultados muy similares.

El aspecto refringente y terso de la membrana de las células redondeadas hace pensar que, aparentemente, son células viables mayoritariamente (véase el apartado 4). Visualmente no se detecta ninguna anomalía relacionada con la muerte celular, bien sea por necrosis (hinchamiento o extrema rugosidad tras la destrucción de la integridad de la membrana) o apoptosis (desmantelamiento en cuerpos apoptóticos). La *anoikis* es una forma de apoptosis desencadenada como consecuencia de la pérdida de adhesión de las células a otras células o a

la MEC, o simplemente por la ausencia de una correcta interacción con ellas (Gilmore, 2005). En condiciones normales, cuando una célula pierde las uniones intercelulares a la matriz, al sustrato, etc., se pone en marcha el programa de muerte celular. Una característica común de las células cancerosas es su mayor resistencia a la muerte por anoikis (Rennebeck y cols., 2005), lo que podría hacer compatible la inhibición de la adhesión con la viabilidad celular. Esta característica podría estar relacionada con las habilidades adquiridas por las células transformadas para migrar y formar metástasis (Rennebeck y cols., 2005; Narumiya y cols., 2009) lo que coincide con la naturaleza de nuestras líneas tumorales, altamente invasivas. Sin embargo, las células cancerosas tienen la capacidad de seguir proliferando en suspensión (Wei y cols., 2004), lo que nos hace pensar que la inhibición de la proliferación inducida por la fluvastatina no es consecuencia de la pérdida de la adhesión sino un efecto directo de la fluvastatina. No obstante, ahondaremos en la presencia de muerte celular o pérdida de la viabilidad en las siguientes secciones.

3.1. Papel de la ruta del mevalonato en la inhibición de la adhesión por la fluvastatina.

Se trataron ambas líneas celulares con fluvastatina (1 y 3 μM) y se cotrataron con mevalonato (10, 100 y 1000 μM) durante 72 horas (figura 31). El mevalonato revirtió totalmente la adhesión celular, al igual que la proliferación (figura 28). Esto indica que la inhibición de la adhesión celular por parte de la fluvastatina, es debida al bloqueo de la ruta de síntesis del mevalonato, y no a la inhibición indirecta de otras vías.

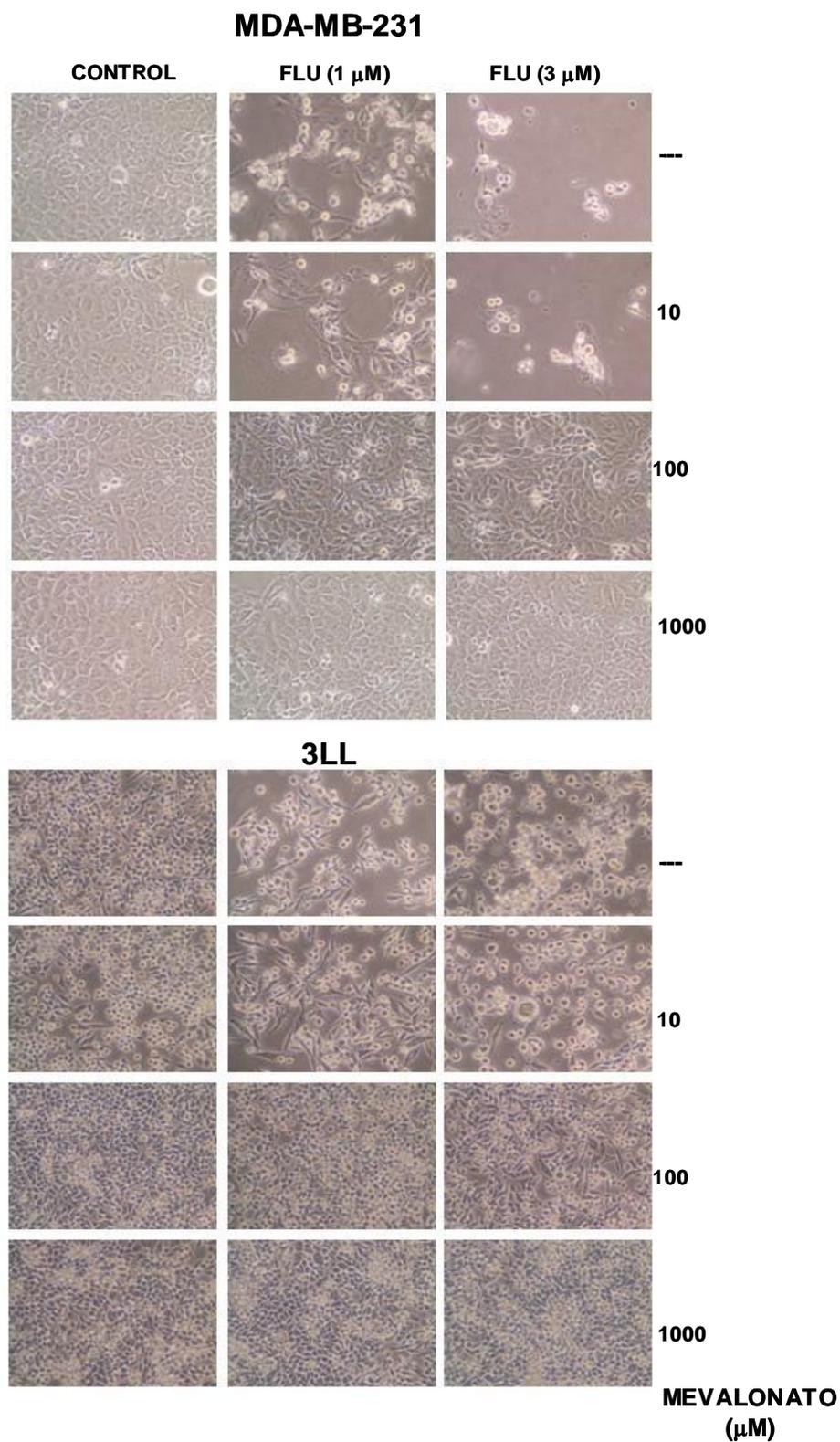


Figura 31. Efecto del mevalonato en la acción de la fluvastatina sobre el fenotipo de las células MDA-MB-231 y 3LL. Las células fueron tratadas durante 72 horas con 1 y 3 μM de fluvastatina (FLU) o agua (como control) en presencia de mevalonato (10, 100 ó 1000 μM) tras lo cual fueron fotografiadas a través de un microscopio invertido con contraste de fases (x200). Los experimentos se realizaron 3 veces con resultados muy similares.

3.2. Papel de la farnesilación y la geranilación en la inhibición de la adhesión por la fluvastatina.

En la figura 32 se muestran los resultados del tratamiento con 3 μM de fluvastatina, con GG (3 μM) y con FOH (10 μM). Las concentraciones de estos análogos estructurales del GGPP y FPP son aquellas con las que se consiguió una mayor reversión de la proliferación (figura 29). En las MDA-MB-231, la desadhesión por la fluvastatina se revierte con el cotratamiento de GG, mientras que en las 3LL esta reversión, de nuevo, es sólo parcial. La diferencia de comportamiento entre ambas líneas celulares coincide el perfil obtenido con GG en la proliferación (apartado 2 de esta sección).

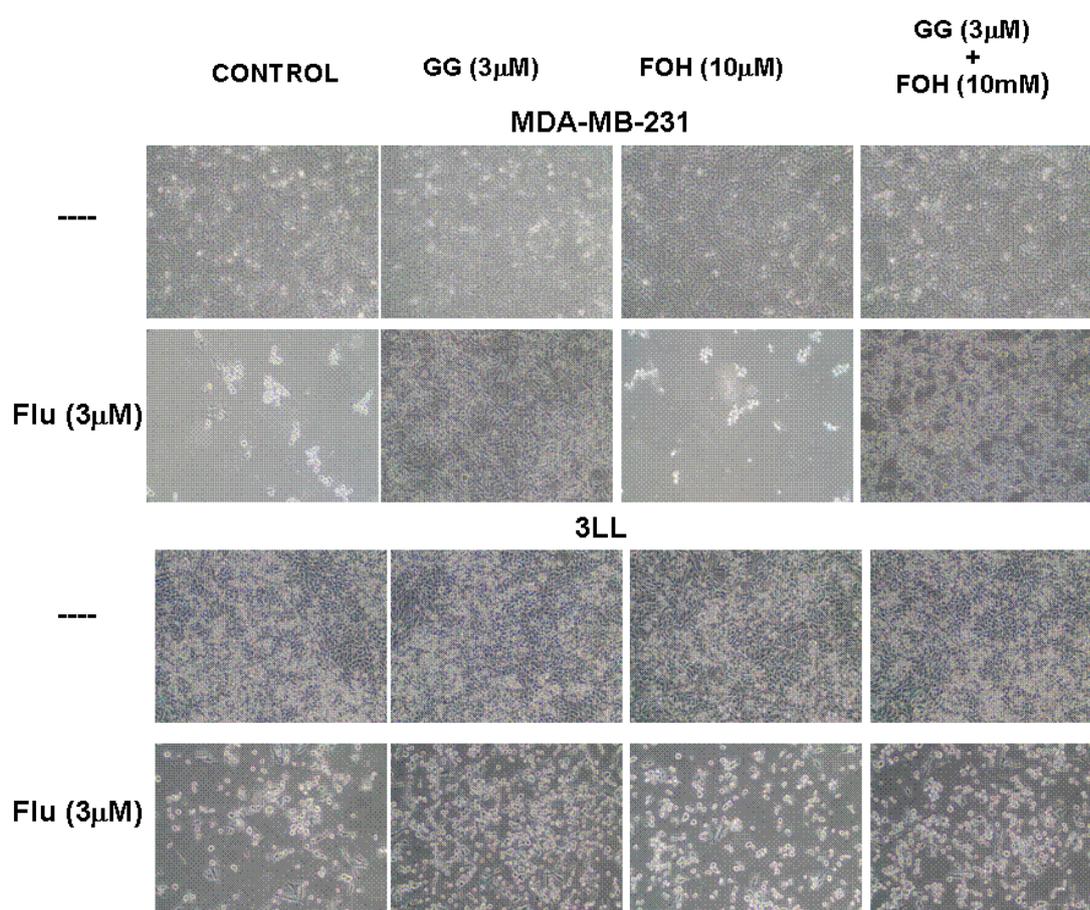


Figura 32. Efecto del geranilgeraniol y del farnesol en el fenotipo de las células MDA-MB-231 y 3LL tratadas con fluvastatina. Las células se trataron durante 72 horas con 3 μM de fluvastatina (Flu) o agua (control) en presencia o en ausencia de 10 μM de farnesol (FOH) y 3 μM de geranilgeraniol (GG) o etanol (como control), tras lo cual se fotografiaron a través de un microscopio invertido con contraste de fases (x200). Los experimentos se realizaron 5 veces con resultados muy similares.

En ambas líneas, el FOH no reestablece la adhesión ni siquiera mínimamente. Esto es algo diferente a los resultados de la proliferación en las 3LL, en los que el FOH tenía un mínimo efecto no estadísticamente significativo. El cotratamiento con ambos productos, FOH y GG, no llega a reestablecer la adhesión tanto como con GG sólo, sino que supone incluso una disminución en la reversión parcial de GG solo, en vez de un efecto aditivo. Esto sugiere que las proteínas de la familia de Ras que intervienen en la adhesión celular y en la formación de uniones focales se pueden geranilar o farnesilar, pero que únicamente son activas las proteínas geraniladas, o al menos su actividad cuando están geraniladas es mayor que cuando están farnesiladas.

Esto confirma los estudios realizados hasta ahora con las estatinas, en los que se describía una desadhesión a la placa de cultivo (Denoyelle y cols, 2001) incluso para células no transformadas (Pittler y cols., 1995) y todos ellos apuntan a la familia Rho como la causa. Concretamente RhoA está muy relacionado con la adhesión de las células al medio extracelular mediante la formación de uniones focales, ya que interviene en el ensamblaje de los filamentos de actina que generan las uniones focales y las fibras de estrés (Narumiya y cols., 2009; Benetka y cols, 2006). Como se ha descrito en la Introducción (apartado 5.4) este proceso es complejo y requiere ser estudiado más exhaustivamente, aunque sí está bien descrito que RhoA realiza estas funciones a través de sus efectores Rho kinasa (ROCK) y mDia y, por lo tanto, para su activación requiere una adecuada localización y anclado a la membrana plasmática. Para ello necesita una serie de modificaciones post-traduccionales, entre las que destaca la geranilación catalizada por la geranil-geranil transferasa I (GGT I), cuyo sustrato es el GGPP. Es probable que los efectos de la fluvastatina en la adhesión celular (revertidos por el GG), se deban a la inhibición de la prenilación de RhoA entre otras proteínas con prenilación dual. En el apartado 5.1 de la Introducción explicamos que el grupo geranilgeranilo consta de cuatro grupos isopropilo mientras que el grupo farnesilo sólo está formado por tres. Esto significa que las proteínas geraniladas tienen mayor hidrofobicidad y se anclarán más fuertemente a la bicapa lipídica. Si relacionamos directamente la localización en la membrana con la actividad, supondría que aquellas proteínas “duals” tienen una mayor actividad cuando se encuentran geraniladas que cuando se encuentran farnesiladas, lo que supone una manera de modular la actividad de determinadas funciones (Michaelson y cols., 2005).

3.2.1 Cotratamiento con limitación y exceso de moléculas GG y FOH.

Para ahondar en (i) la diferente intensidad de la reversión de la adhesión por el GG entre las líneas celulares, (ii) la competencia entre GG y FOH por la prenilación de alguna GTPasa implicada y (iii) la posible diferencia de activación entre las mismas proteínas farnesiladas o geraniladas, realizamos dos tratamientos con los mismos sustratos pero con un abordaje diferente (figura 33). Añadimos un menor volumen de medio de cultivo a las placas para llegar a una cantidad crítica de moléculas de GG y FOH que fuera suficiente para comenzar el proceso protector de la desadhesión pero insuficiente para aportar sustratos para la prenilación hasta 72 horas. En otro grupo de placas realizamos el mismo abordaje pero suplementando con GG o FOH a la misma concentración a las 48 horas de tratamiento. De esta manera, en estas últimas placas, ambos sustratos estarían en exceso para prenilar las proteínas, mientras que en las placas tratadas sólo una vez, el GG y el FOH podrían agotarse antes del final del tratamiento.

A las 72 horas en las células MDA-MB-231, el GG añadido sólo al principio del tratamiento no llegó a revertir totalmente la proliferación, a diferencia del tratamiento “2GG” (añadiendo GG también a las 48 horas del tratamiento), lo que indica que la cantidad de moléculas necesarias para revertir totalmente la desadhesión de la fluvastatina no es suficiente en el tratamiento “GG”. En cambio, no se observaron cambios fenotípicos entre el cotratamiento “FOH” y “2FOH”. Esto sugiere que las proteínas encargadas de activar los efectores que mantienen la adhesión no requieren FPP para su prenilación. Lo más interesante es que, entre el tratamiento “GG+FOH” y “2GG+2FOH”, tampoco se observaron diferencias. Esto refuerza la teoría de la competencia entre la geranilación y la farnesilación y la menor actividad del resultado farnesilado con respecto al geranilado.

En cambio, en las 3LL, en el tratamiento “GG” (GG añadido sólo al inicio del tratamiento junto con la fluvastatina) y el tratamiento “2GG” (GG añadido también a las 48 horas del inicio del tratamiento), la protección de la desadhesión celular seguía siendo sólo parcial y no se observaron diferencias entre ambos. Esto demuestra que las proteínas geraniladas sólo influyen parcialmente en la formación de las uniones focales y esto no es por la falta de moléculas de GG en el medio de cultivo. Entre los dos cotratamientos de FOH tampoco se observaron diferencias. Cabe suponer que no hay farnesilación de las proteínas relacionadas con la adhesión y, si ésta existiera, las proteínas farnesiladas no tendrían tanta actividad como las mismas geraniladas. También indica que la falta de FOH en el medio de cultivo no es la razón de que no se observe una reversión de la pérdida de adhesión a la placa por la fluvastatina.

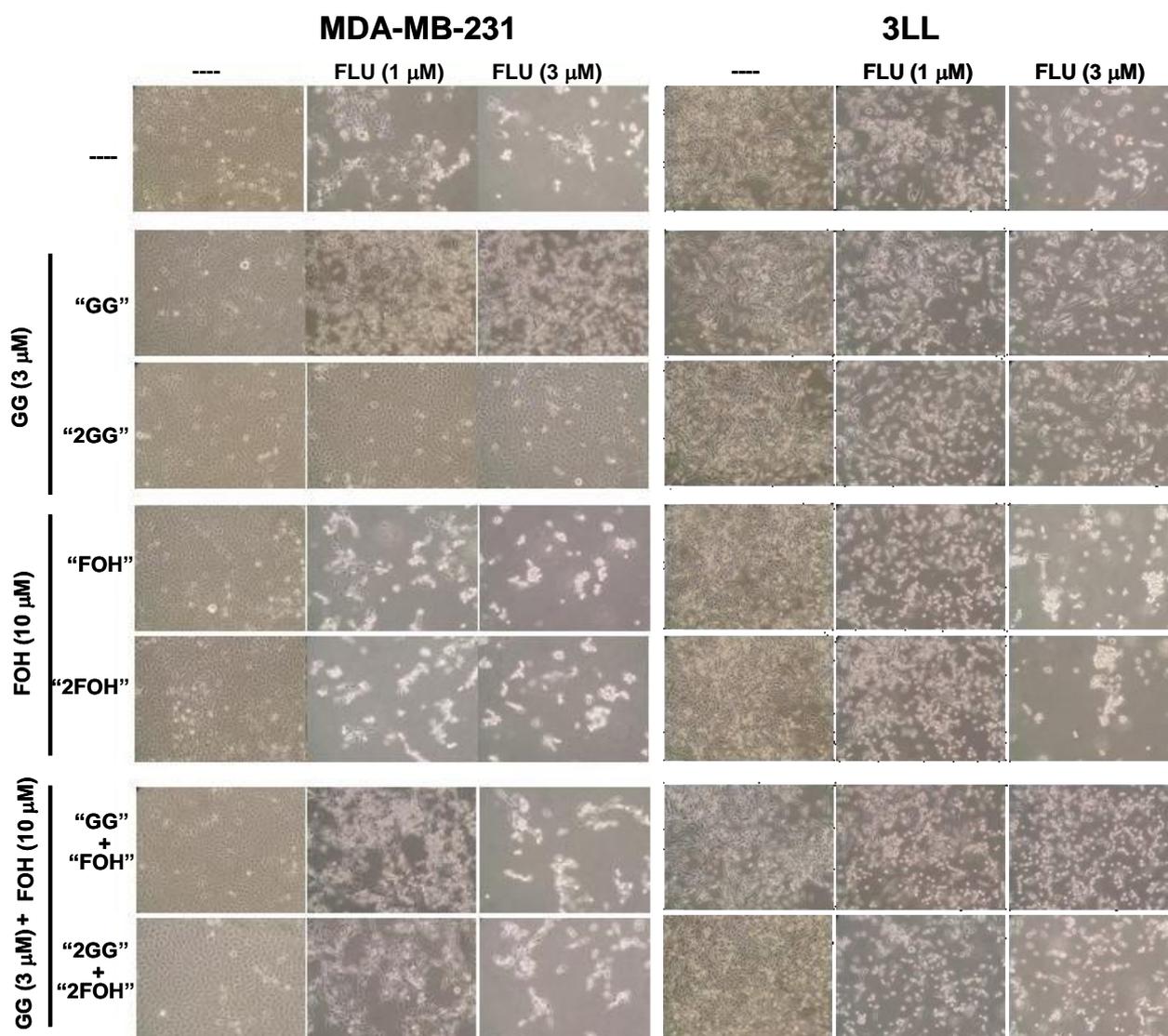


Figura 33. Efecto del geranylgeraniol y del farnesol en el fenotipo de las células MDA-MB-231 y 3LL tratadas con fluvastatina. Las células fueron tratadas durante 72 horas con un volumen de 3,5 mL de medio de cultivo con 1 y 3 μM de fluvastatina (FLU) o agua (como control) en presencia o en ausencia de 10 μM de farnesol (FOH) y 3 μM de geranylgeraniol (GG) o etanol (como control). Algunas placas fueron tratadas de nuevo a las 48 horas con la misma cantidad de GG y FOH (“2GG” y “2FOH” respectivamente). A las 72 horas fueron fotografiadas con un microscopio invertido con contraste de fases (x20). Los experimentos se realizaron dos veces con resultados muy similares.

Debemos destacar que el GG consigue una reversión total del efecto en las células MDA-MB-231, pero solamente parcial en las 3LL. Esto podría ser debido a que las dos estirpes celulares manejasen de forma diferente el GG, de tal manera que una misma concentración extracelular diese lugar a una concentración intracelular diferente, algo descartable teniendo en cuenta que, tanto el GG como el FOH penetran en la célula por difusión. Además, en las

3LL el nuevo cotratamiento de GG a las 48 horas (“2GG”) no ofrece cambios con respecto al tratamiento “GG”. Esto demuestra que el manejo diferente y, por tanto, la limitación de la dosis intracelular de GG no es la causa de la reversión parcial en las 3LL. Una alternativa hipotética podría ser la existencia de otros factores intracelulares funcionalmente independientes de la prenilación que también intervengan de forma solidaria y no redundantemente con las vías de RhoA para la promoción de la adhesión celular.

RESUMEN

- *La fluvastatina inhibe la adhesión de las células tumorales MDA-MB-231 y 3LL de forma dependiente de la concentración.*
- *El perfil inhibitor de la adhesión es prácticamente idéntico al de la proliferación (apartado 2); la desadhesión es más marcada en las células MDA-MB-231 que en las 3LL.*
- *La pérdida de la adhesión celular por la fluvastatina es debida a la falta de mevalonato en la célula o de cualquier producto derivado de éste.*
- *El cotratamiento con GG concreta la pérdida de adhesión a la falta de GGPP.*
- *La reversión de la adhesión por el GG es sólo parcial en la 3LL y total en las MDA-MB-231. Esto sugiere el grado de importancia de la geranilación de las proteínas responsables de la adhesión en cada línea.*
- *La falta de FPP, en cambio, no tiene ninguna consecuencia en la adhesión, ni siquiera en las 3LL.*
- *El cotratamiento con GG y FOH a la vez, al igual que en la proliferación, muestra una competencia entre GGPP y FPP por la prenilación de alguna GTPasa encargada de la adhesión. Pero estas proteínas farnesiladas tendrían menor o ninguna actividad en relación con las mismas geraniladas.*

4. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR.

Aunque visualmente no se observan características de muerte celular en las muestras tratadas con la fluvastatina, quisimos estudiar la presencia de indicadores más fiables del estado vital de las células. Una posibilidad es que su efecto antiproliferante, o parte de él, se deba a la muerte de éstas.

4.1. Estudio de la viabilidad celular mediante citometría de flujo.

Nuestro estudio de la viabilidad celular se basa en la integridad de la membrana celular, que se ha utilizado tradicionalmente como indicador de inviabilidad celular (Mascotti y cols., 2000). Cuando ésta está dañada ciertos colorantes, que en condiciones normales quedan excluidos en el espacio extracelular, acceden al interior de la célula y se unen a sus estructuras. En este caso se ha utilizado el yoduro de propidio, cuya exclusión (células viables) o tinción (células no viables) puede cuantificarse fácilmente por citometría de flujo. Así, se seleccionaron tres poblaciones celulares en función de su integridad membranal: Viables (no teñidas), no viables (teñidas) y en vías de la inviabilidad o “casi inviables” (con una cantidad de colorante intermedia entre las células inviables y las viables).

La fluvastatina produce, de forma dependiente de la concentración, pérdida de la viabilidad en ambas líneas celulares. En la figura 34 se puede observar que, tras 48 y 72 horas de tratamiento, la pérdida de viabilidad inducida por del fármaco es significativa y sustancialmente mayor en las células MDA-MB-231.

Estos resultados ponen de manifiesto los siguientes hechos:

- En primer lugar, existe una relación inviabilidad-antiproliferación, ya que, como indica la figura 27 del apartado 2 de esta sección, la proliferación se ve disminuida por acción de la fluvastatina en mayor medida en las MDA-MB-231 que en las 3LL, lo que coincide con una mayor pérdida de la viabilidad en este abordaje experimental (figura 34). Además, si comparamos la figura 28 del apartado 2 de esta sección, en la que la proliferación está calculada por porcentajes, dando como valor 100% a la proliferación obtenida en las células no tratadas, con la suma de los porcentajes de las células inviables y las “casi inviables” a las 72 horas (figura 34 b), vemos que el porcentaje de proliferación que disminuye con el tratamiento del fármaco equivale a la suma de los porcentajes de las células inviables y las células “casi inviables”.

- En segundo lugar, el cotratamiento con geranilgeraniol (GG) genera un perfil de inviabilidad que también se corresponde totalmente con el perfil observado en la proliferación (figura 29). La reversión de la inhibición de la proliferación es total en las MDA-MB-231 y, en el caso de la figura 34 b, la inviabilidad en presencia de GG es prácticamente nula. En las células 3LL, a las 72 horas de tratamiento, la protección del GG a la inhibición de la proliferación es sólo parcial y la viabilidad recuperada con este agonista, como cabe esperar, es sólo parcial. Además, este porcentaje de inviabilidad remanente en las 3LL se corresponde con la proliferación no restablecida por el GG (figura 29).

- A la vista de estos resultados, suponemos que la inviabilidad metabólica (apartado 2) medida mediante el reactivo MTT (apartado 4 de Materiales y Métodos), y la inviabilidad “estructural” medida mediante la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, están relacionadas e incluso una puede ser consecuencia de la otra, aunque esta afirmación no explica el marco temporal en el que ambos tipos de inviabilidad tienen lugar en la célula, ni el orden en el que la fluvastatina los produce junto con los procesos de desadhesión al sustrato.

Para dilucidar la relevancia de la pérdida de la viabilidad en la adhesión al sustrato realizamos un estudio de viabilidad a 72 horas de tratamiento en el que únicamente recogimos las células adheridas a la placa de cultivo, desechando las células que se encontraban flotando en el medio, es decir, las células que habían perdido la adhesión al sustrato. La inviabilidad obtenida fue exactamente la misma que recogiendo las dos poblaciones de células (datos no mostrados). En cambio, el porcentaje de células “casi inviables” descendió hasta valores similares a las células “control” en ambas líneas celulares. Por tanto, las células despegadas de la placa de cultivo son aquellas con una cantidad de yoduro de propidio intermedia entre las células viables y las inviables. Esto apunta que las células despegadas no se encuentran muertas, como ya se sugirió en el apartado anterior. Cabe esperar que unas líneas de cáncer altamente invasivas como MDA-MB-231 y 3LL no mueran por la falta de adhesión al sustrato o por la pérdida de uniones intercelulares (muerte celular por anoikis) (Rennebeck y cols., 2005): la desadhesión del tumor sólido original en el que se encuentran localizadas las células tumorales es algo crucial, en el proceso de metástasis, para viajar por el torrente sanguíneo hasta alcanzar otra localización del organismo en la que proliferar de nuevo. Parece ser que es la propia fluvastatina la que directamente produce la inviabilidad celular de forma independiente de la desadhesión o por un mecanismo común, pero al menos sin que se exista un nexo causal entre ambos. La hipótesis de que la fluvastatina produzca la inviabilidad mediante el bloqueo de otra vía diferente a la del mevalonato, o por la falta de un producto diferente al GGPP queda descartada, ya que el tratamiento con su agonista, GG, revierte la inviabilidad y la pérdida de la proliferación (apartado 2) y se consigue un perfil idéntico entre ambos.

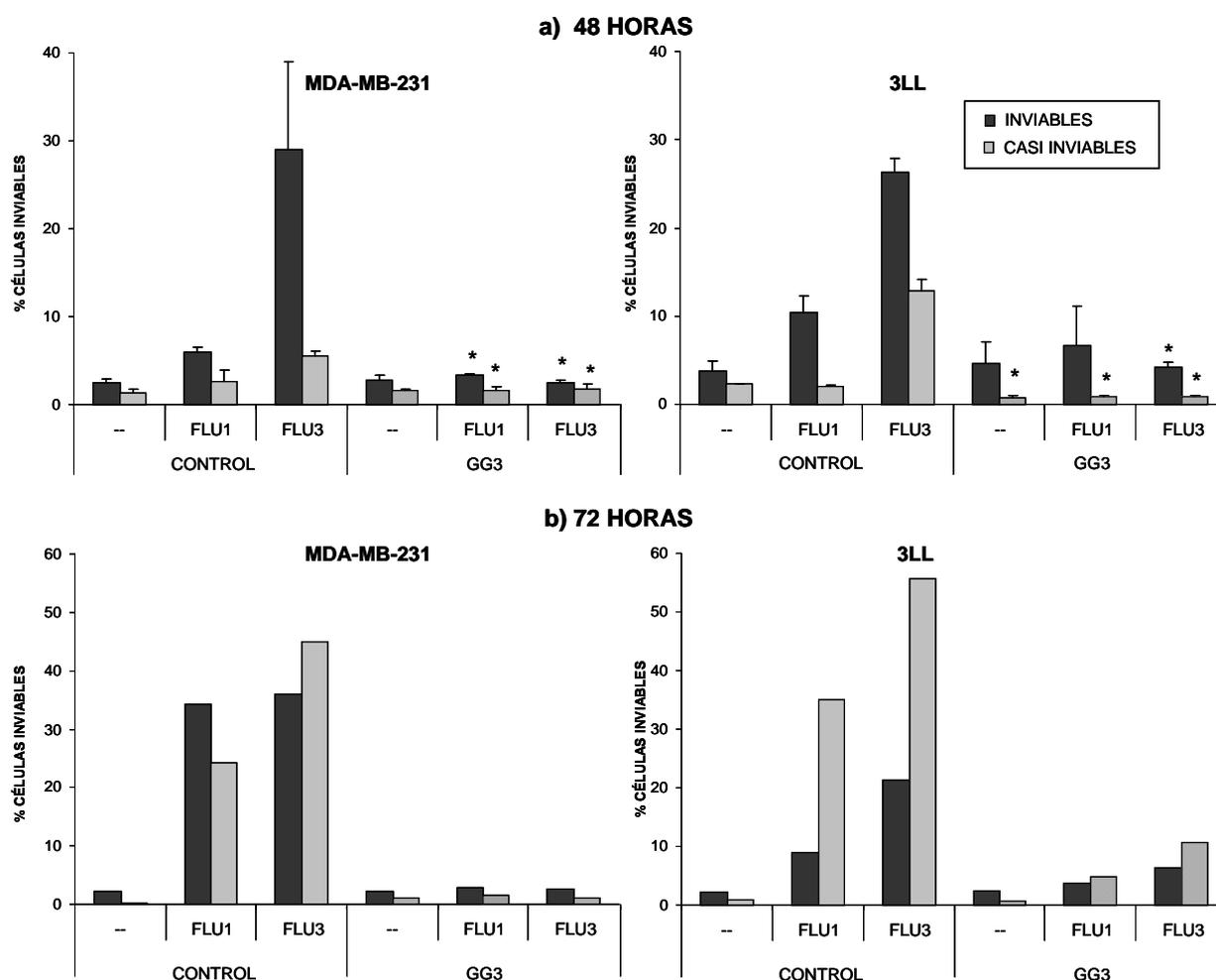


Figura 34. Efecto de la fluvastatina sobre la viabilidad celular. Las células MDA-MB-231 y 3LL se trataron durante 48 y 72 horas con 1 y 3 μ M de fluvastatina (FLU1 y FLU3) o con agua (como control), en presencia o ausencia de 3 μ M de geranilgeraniol (GG3) o con etanol (como control), y se incubaron con yoduro de propidio. La captación de este colorante se determinó mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a los porcentajes de células inviables o casi inviables (con una cantidad de yoduro de propidio captado intermedio entre las células viables y las no viables).

a) Efecto de la fluvastatina sobre la viabilidad en las células MDA-MB-231 y 3LL a las 48 horas de tratamiento. Los experimentos se realizaron tres veces con resultados muy similares. La figura representa. Los datos se expresan como media \pm D.E. * $p < 0,05$ con respecto a cada control tratado o no con fluvastatina.

b) Efecto de la fluvastatina sobre la viabilidad en las células MDA-MB-231 y 3LL a las 72 horas de tratamiento. Los experimentos se realizaron tres veces con resultados muy similares. La figura representa los porcentajes de uno de ellos obtenidos en uno de los experimentos.

El tratamiento con fluvastatina durante 72 horas parece ser demasiado “agresivo” sobre la propia integridad celular para poder estudiar algún tipo de efecto sobre la MEC, uno de los puntos principales de nuestro estudio. Debemos estudiar una posible inhibición de la síntesis de ésta en un entorno celular que no esté excesivamente deteriorado para asegurar que la fluvastatina esté inhibiendo la MEC por un mecanismo específico y no como consecuencia de una degradación total de la célula. Por eso realizamos experimentos con una duración del tratamiento menor; 48 horas (figura 34 a). A este tiempo, la fluvastatina ya inhibe la proliferación (figuras 27 y 29), pero esta inhibición no es tan acusada como a las 72 horas. Esto significa que a las 48 horas de tratamiento con fluvastatina en ambas líneas celulares, la suma de los porcentajes de células inviables y casi inviables es menor que el porcentaje de disminución de la proliferación (figura 29). Por ejemplo, las MDA-MB-231 tratadas con 3 μ M de fluvastatina, la inhibición de la proliferación alcanza su máximo a las 48 horas y éste apenas varía a las 72, lo que sugiere que no todas las células que han dejado de proliferar a las 48 horas son inviables.

Como el porcentaje de células inviables no puede explicar totalmente la marcada disminución de la proliferación a las 48 horas, el efecto antiproliferante no se debe derivar exclusivamente de la muerte celular. Así pues, una posibilidad es que la muerte celular se desencadene como consecuencia de la inhibición del progreso de ciclo de división, y otra, que sean procesos independientes aunque puedan ocurrir de forma paralela. Incluso, no podemos descartar que ambos mecanismos, el derivado de la parada de la división y el efecto deletéreo directo, puedan darse simultáneamente.

Del estudio de la inviabilidad a las 48 horas de tratamiento con fluvastatina se concluyen dos cosas: primero, que este tiempo de tratamiento es el adecuado para estudiar los efectos producidos en la matriz extracelular tumoral, ya que la inviabilidad no es tan marcada como a las 72 horas de tratamiento, y segundo, que es necesario realizar estudios de ciclo celular para dilucidar todas las causas que producen toda la inhibición de la proliferación a las 48 horas.

RESUMEN

- La fluvastatina produce una pérdida de la integridad de la membrana plasmática en las MDA-MB-231 y 3LL de forma dependiente de la concentración:

- A las 72 horas de tratamiento con la fluvastatina, la inviabilidad se corresponde cuantitativamente con la disminución de la proliferación (apartado 2).
- A las 48 horas de tratamiento con la fluvastatina, en cambio, la inviabilidad no es responsable de toda la disminución de la proliferación estudiada. Esto significa que la estatina inhibe la proliferación a través de otro mecanismo. Puede que exista una inhibición del progreso de ciclo celular que termine produciendo la inviabilidad. También es posible que ambos procesos sean independientes y ocurran de forma paralela o simultánea.

- 48 horas de tratamiento con fluvastatina parece ser un tiempo adecuado para estudiar acciones sobre la MEC, ya que la inviabilidad no es tan acusada como a las 72 horas.

- Las células desadheridas por la acción de la fluvastatina no son totalmente inviables sino “casi” inviables.

Experimentos descritos más adelante que estudian el ciclo de división celular ahondarán en el mecanismo por el cual la fluvastatina inhibe la proliferación celular y relacionarán los resultados con el estudio de inviabilidad.

4.2. Caracterización fenotípica de la muerte: morfología nuclear.

La muerte celular ocurre normalmente mediante la ejecución de un programa de muerte controlada que se pone en marcha como consecuencia de daños irreparables o intensos en las estructuras y el material genético de la célula, inducidos por procesos biológicos, fisiopatológicos o sustancias tóxicas. Este tipo de muerte celular se desarrolla de una forma determinada y da lugar a un fenotipo característico que se denomina apoptosis (Fink y Cookson, 2005). La apoptosis es un fenómeno muy antiguo desde el punto de vista evolutivo que proporciona a los seres pluricelulares e incluso algunos intracelulares una forma altruista y limpia de muerte de las células que, por unos motivos u otros, deben desaparecer sin causar daños en su entorno (Aravind y cols., 1999). Por el contrario, cuando la célula no tiene tiempo

de poner este programa en marcha, o cuando éste resulta total o parcialmente inhibido por las circunstancias o por tóxicos específicos, la muerte no se desarrolla con el fenotipo apoptótico, sino mediante el proceso conocido como necrosis (Golstein y Kroemer, 2007), que resulta mucho menos conveniente para el organismo. Entre otras cosas, el contenido celular se vierte al medio extracelular, lo que origina un proceso de daño e inflamación y desencadena una respuesta inmunológica destinada a la retirada de los restos celulares y a la reparación del daño tisular (Proskuryakov y cols., 2005).

Una de las características de la apoptosis es que el contenido celular queda atrapado en la propia célula que, finalmente se desmantela en fragmentos más pequeños rodeados por segmentos de la membrana celular, los llamados cuerpos apoptóticos. Estos corpúsculos tienen señales de identificación que permiten que las células vecinas o del sistema inmunológico los reconozcan, los fagociten y se deshagan de ellos limpiamente (Gardai y cols., 2006). El proceso de desmantelamiento celular implica la destrucción proteolítica de las enzimas claves de la célula, la interrupción de los procesos vitales más importantes, la degradación específica del material genético (condensación de la cromatina y fragmentación del ADN entre los nucleosomas), y división del núcleo en fragmentos más pequeños cada uno de los cuales va a parar, junto con una fracción del citosol, y parte de las organelas a cada uno de los cuerpos apoptóticos (Rogalinska, 2002).

El fenotipo característico y diferenciador de la apoptosis, puede distinguirse, detectarse, y cuantificarse mediante la determinación de múltiples eventos celulares. Entre ellos, dos aspectos cardinales del programa apoptótico son la rotura de los núcleos (y la condensación de la cromatina) y la fragmentación internucleosomal del ADN. Nosotros hemos estudiado estos dos aspectos como índice de apoptosis (descritos en el apartado 5 de Materiales y Métodos).

El colorante Hoestch 33258 se une al ADN y emite fluorescencia tras ser estimulado (p.e. con luz ultravioleta). La visualización de esta fluorescencia nos informa de la localización del material genético, disperso y homogéneamente distribuido por todo el núcleo, o condensado e incluso formando parte de diferentes corpúsculos procedentes de un núcleo escindido. Las fotografías mostradas en la figura 35 son campos representativos de los cultivos celulares realizados en presencia o ausencia de fluvastatina. Se puede observar que, tras 72 horas de tratamiento, tiempo en el que ésta produce una marcada inhibición de la proliferación como consecuencia de la inviabilidad celular, esta estatina no induce ningún efecto nuclear relacionado con la apoptosis. Los núcleos permanecen íntegros y la cromatina dispersa en ambas líneas celulares.

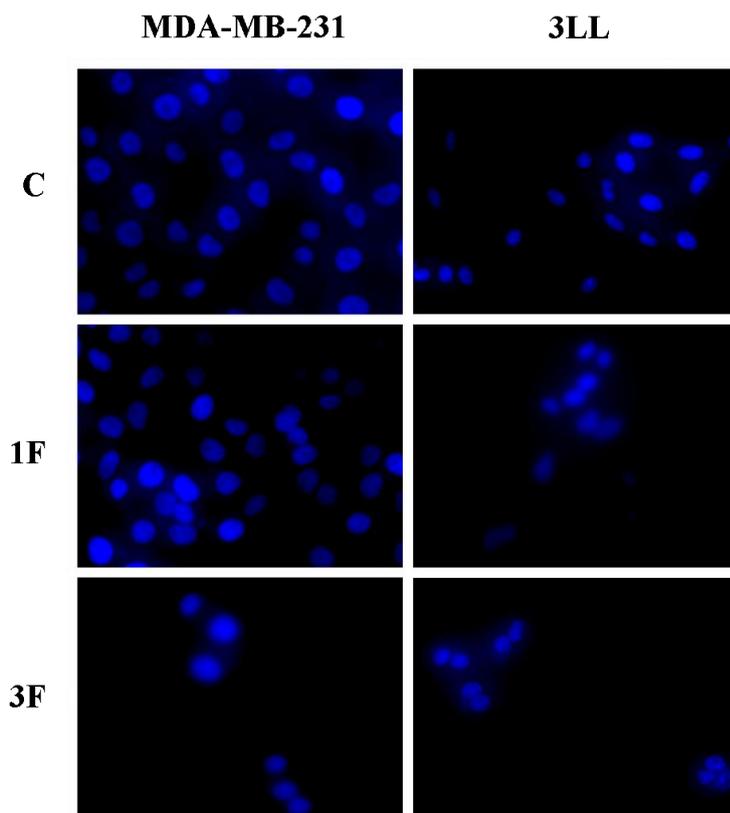


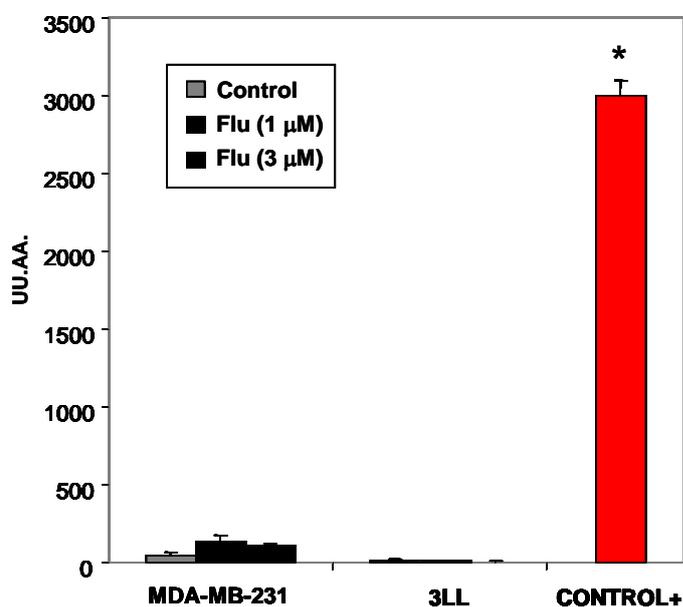
Figura 35. La fluvastatina no produce fragmentación nuclear. Las células MDA-MB-231 y 3LL se trataron durante 72 horas con fluvastatina 1 (1F) y 3 μ M (3F) o agua (C). Tras ello, se fijaron, "permeabilizaron" y tiñeron con el colorante fluorescente Hoestch 33258 que se une irreversiblemente al ADN. Los experimentos se realizaron tres veces y se obtuvieron resultados idénticos. Las fotografías (x200) se hicieron a través de un microscopio de fluorescencia invertido.

4.3. Detección de ADN fragmentado en el citosol.

Otra característica distintiva del proceso de apoptosis es la aparición de fragmentos del ADN nuclear en el citosol, procedentes de cortes internucleosomales realizados por nucleasas específicas (Rogalinska, 2002). Por lo tanto, la detección y cuantificación de ese ADN en este compartimento citoplasmático se ha utilizado ampliamente como marcador de apoptosis (López-Hernández y cols., 2004). Para ello se ha utilizado un ELISA comercial de tipo "sándwich" denominado "Cell Death Detection ELISA^{PLUS}" (Roche Diagnostics). Concretamente, este ELISA determina *in vitro* cualitativa y cuantitativamente los fragmentos de ADN asociados a histonas (mono y oligonucleosomas) presentes en el citosol tras la inducción de la muerte celular por apoptosis.

Nuestros experimentos (figura 36) ponen de manifiesto que el tratamiento con fluvastatina durante 72 horas no induce la fragmentación nuclear en ninguna de las dos líneas, a concentraciones a las que este fármaco produce una marcada inhibición de la proliferación,

afecta al progreso del ciclo de división celular (ver figura 38, más adelante) e incluso a la viabilidad (figura 34).



*Figura 36. La fluvastatina no induce fragmentación del ADN. La gráfica representa la cuantificación de los fragmentos del ADN nuclear en el citosol, en las líneas MDA-MB-231 y 3LL mediante un ELISA. Las células fueron tratadas durante 72 horas con fluvastatina (1 y 3 μM) o con agua (como control). Como control positivo (control +) se utilizó un extracto de células HeLa apoptósicas. Los experimentos se realizaron tres veces. Los datos se expresan como media ± D.E. UU:AA: Unidades arbitrarias. * p <0,05 con respecto al control*

Así pues, podemos decir que la muerte celular inducida por la fluvastatina no presenta indicios fenotípicos de apoptosis, o por lo menos no presenta indicios de que exista un proceso de apoptosis clásico y completo. Este hecho es contrario a lo esperado, ya que el efecto de la fluvastatina se demora lo suficiente como para que se pueda poner en marcha el programa de la apoptosis, bien por efecto directo de la estatina, bien como consecuencia indirecta de otros efectos tales como la inhibición de la adhesión celular o la intervención en el ciclo celular (que se describe en el apartado siguiente, en la que se retomará esta discusión). En cualquier caso, nuestros resultados más bien parecen indicar que, en las condiciones de nuestros experimentos, la estatina produce, en algún punto, una inhibición de la correcta ejecución de la apoptosis que resulta en la desaparición de ciertos aspectos del fenotipo apoptótico en estas células de tumores epiteliales. Se ha estudiado que, cuando RhoA está inactivado, p21^{Waf1/Cip1} se transloca del núcleo al citoplasma y es capaz de inhibir la apoptosis

por inhibición con la caspasa 3 (Zhang y cols, 2009). Éste podría ser uno de los mecanismos por los cuales la fluvastatina evita que los procesos apoptóticos se desencadenen.

Aunque sí es cierto que las estatinas se indican en la bibliografía como inductoras del proceso de apoptosis, en otras líneas tumorales, principalmente mesenquimales (Sahai y Marshall, 2002; Wong y cols., 2002; Chan y cols, 2003; Hindler y cols., 2006; Tang y cols., 2008) también se ha observado que existen determinadas estirpes celulares que son refractarias a este proceso, entre las que se encuentran las células tumorales de próstata y de mama (Dimitroulakis y cols., 2001). Concretamente, las MDA-MB-231 se han caracterizado por no presentar características de apoptosis cuando son tratadas con diferentes estatinas (Denoyelle y cols., 2001). Por el contrario, se ha observado que las estatinas inducen directamente apoptosis en las MCF-7, línea tumoral no invasiva de cáncer de mama (Kotamraju y cols, 2007).

RESUMEN

- *No existen signos fenotípicos característicos de muerte celular por apoptosis en presencia de la fluvastatina.*
- *Es posible que la estatina inhiba la ejecución del proceso de apoptosis en las líneas tumorales utilizadas.*

5. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN EL CICLO CELULAR.

Dado que la muerte celular parece ser responsable sólo parcialmente del efecto antiproliferante de la fluvastatina a las 48 horas de tratamiento, y puesto que es posible que la muerte sea una consecuencia de la parada del ciclo celular, investigamos si este fármaco era capaz de alterar el ciclo de división celular en las células MDA-MB-231 y 3LL.

La citometría de flujo permite determinar la distribución de la población en las fases del ciclo celular, lo que puede poner de manifiesto una alteración de la secuencia temporal de paso por las diferentes fases y, como consecuencia, una acumulación en alguna de ellas derivada de un aumento del tiempo de tránsito o parada del ciclo, o de la muerte de las células específicamente en alguna de las fases.

Nuestros resultados (figura 37) indican que, en las MDA-MB-231, la fluvastatina induce de forma dependiente de la concentración una acumulación de las células en la fase G0/G1, que corresponde al primer pico del gráfico (la población de células que tiene la

cantidad normal, $2n$, de material genético). Sin embargo, en las células 3LL la acumulación se produce en la fase G2/M, que corresponde al segundo pico del gráfico, que representa la población de células con el doble de material genético ($4n$) y, por lo tanto con doble cantidad de fluorescencia.

La parada de la fase G1 a la S de las células tumorales tratadas con estatinas está ya descrita en la bibliografía para muchas líneas celulares de tumores de origen mesenquimal (Olson y cols., 1995; Keyomarsi y cols., 1991; Wong y cols., 2002), e incluso para células tumorales de cáncer de mama (Denoyelle y cols., 2001) y se confirma con nuestros resultados en las MDA-MB-231. Existen varios artículos que achacan la parada en G0/G1 por las estatinas a la inducción de la síntesis de los inhibidores dependientes de kinasas (CDKIs) relacionados con la transición del ciclo celular de la fase G1 a la S (Denoyelle y cols., 2001; Zhang y cols., 2009). Además, es RhoA el que regula el ciclo celular en las células tumorales, mientras que Ras tiene un papel secundario (Weber y cols., 1997; Olson y cols., 1998; Sahai y Marshall, 2002; Zhang y cols., 2009): RhoA actúa a través de su efector Rho Kinasa (ROCK) regulando la síntesis de los inhibidores de ciclo celular INK4 ($p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, $p18^{INK4c}$ y $p19^{INK4d}$) y a través de su efector Diaphanous 1 (mDial) regulando la acumulación de las proteínas de la familia Cip/Kip ($p21^{Waf1/Cip1}$ y $p27^{Kip1}$). La inactivación de RhoA, en este caso por la fluvastatina, podría producir la *sobrerregulación* de estos CDKIs, lo que inhibiría los complejos ciclina/CDK (kinasa dependiente de ciclina) necesarios en la progresión del ciclo de la fase G1 a la S: ciclina D/CDK4, ciclina D/CDK6 y ciclina E/CDK2 (Rao y cols., 1998; Zhang y cols., 2009). Además, existen trabajos que han probado la necesidad de que RhoA se geranile para suprimir la transcripción de $p21^{Waf1/Cip1}$ (Rao y cols., 1998; Denoyelle y cols., 2001). Pero RhoA no es la única proteína de la familia de Rho relacionada con la regulación de la proliferación y el ciclo celular. Rac1 y Cdc42 tienen un papel importante en la regulación de la ciclina D1, crucial para la proliferación y también para la tumorigénesis (Sahai y Marshall, 2002). Nuestro estudio no ha profundizado sobre esas dos proteínas de la familia de Rho, si bien es importante recordar que la fluvastatina inhibe la prenilación de todas las proteínas de la familia de Ras, por lo que Rac1 y Cdc42 también se encontrarían afectadas.

En cambio, el efecto de la estatina en las células 3LL es completamente distinto, y constituye un raro caso en el que las estatinas tienen la capacidad de modular el ciclo de división celular también en la fase G2/M (Engelke y Hacker, 1994; Baetta y cols., 1997, Fuchs y cols., 2008). Se describió que los inhibidores específicos de la farnesilación producían una ralentización de la transición por la fase G2/M asociada a la inhibición de la proteína del cinetocoro Cenp-F. Esta se activa por farnesilación y, aunque su efecto neto en el ciclo celular

está por determinar así como su presencia interespecífica, resulta curioso que apenas se haya descrito el efecto de las estatinas sobre la fase G2/M, puesto que éstas también inhiben la farnesilación (Hussein y Taylor, 2002).

Es probable que el efecto principal y más marcado de las estatinas tras inhibir ambas formas de prenilación (farnesilación y geranilación) sea la parada del ciclo en la fase G0/G1, y que este hecho enmascare el posible efecto en la fase G2/M. Cabe la posibilidad de que, en algunas estirpes celulares tumorales como las 3LL, por sus características propias, o por una expresión de proteínas preniladas relacionadas con el control del ciclo celular diferente, el efecto de la fluvastatina en la fase G0/G1 no tenga lugar, y la parada en G2/M sea más patente.

En ambas líneas celulares, el efecto de la fluvastatina se bloquea mediante la administración simultánea de GG (figura 38), lo que indica de nuevo que la inhibición de la geranilación de determinadas proteínas constituye el aspecto fundamental de estos efectos de la fluvastatina. En las células 3LL, el GG, sólo consigue revertir parcialmente el efecto de la fluvastatina. En cambio, en las células MDA-MB-231 la reversión es completa a pesar de la mayor magnitud del efecto.

Como ya hemos mencionado anteriormente, se ha involucrado a la proteína RhoA con la progresión del ciclo celular de las células cancerosas. La reversión por el GG de la parada del ciclo celular, sea cual sea la fase en la que esto ocurre, es un indicio de que la estatina afecta la geranilación de GTPasas relacionadas con la progresión del ciclo celular y RhoA, que exclusivamente se geranila, es un candidato potencial.

Ya destacamos la importancia de analizar las mismas condiciones de tratamiento, con una menor duración de éste. Los resultados obtenidos a las 48 horas de tratamiento con la fluvastatina y con los diferentes cotratamientos se resumen en la figura 39. Observamos que, en el tratamiento con la fluvastatina, ambas líneas celulares sufren una parada más acusada del ciclo celular que a las 72 horas. Como hipótesis, a las 48 horas la célula podría sufrir las consecuencias del tratamiento con la fluvastatina y se produciría una fuerte parada del ciclo celular. A las 72 horas, esto se traduciría en una marcada inhibición de la proliferación y de la inviabilidad. Por eso, a este tiempo, la parada del ciclo celular no sería tan acentuada: la integridad de la membrana se encontraría comprometida y los efectos de la estatina sobre el ciclo celular se verían atenuados o enmascarados por una mayor inviabilidad (figura 34).

En las MDA-MB-231, el cotratamiento con GG ejerce una protección prácticamente total de la parada en la fase G0/G1, lo que coincide con lo ocurrido 24 horas después. El cotratamiento con FOH ni siquiera reduce mínimamente la alteración del ciclo celular de la fluvastatina. Finalmente, al añadir ambos sustratos de prenilación, GG y FOH, la reversión

que producía el GG sólo disminuye, lo que indica nuevamente la competencia de ambos sustratos en algunas proteínas relacionadas con el ciclo celular, siendo los productos farnesilados nada o menos eficaces que los geranilados. Este comportamiento coincide con los perfiles de inviabilidad, adhesión y proliferación en que hemos estudiado hasta el momento.

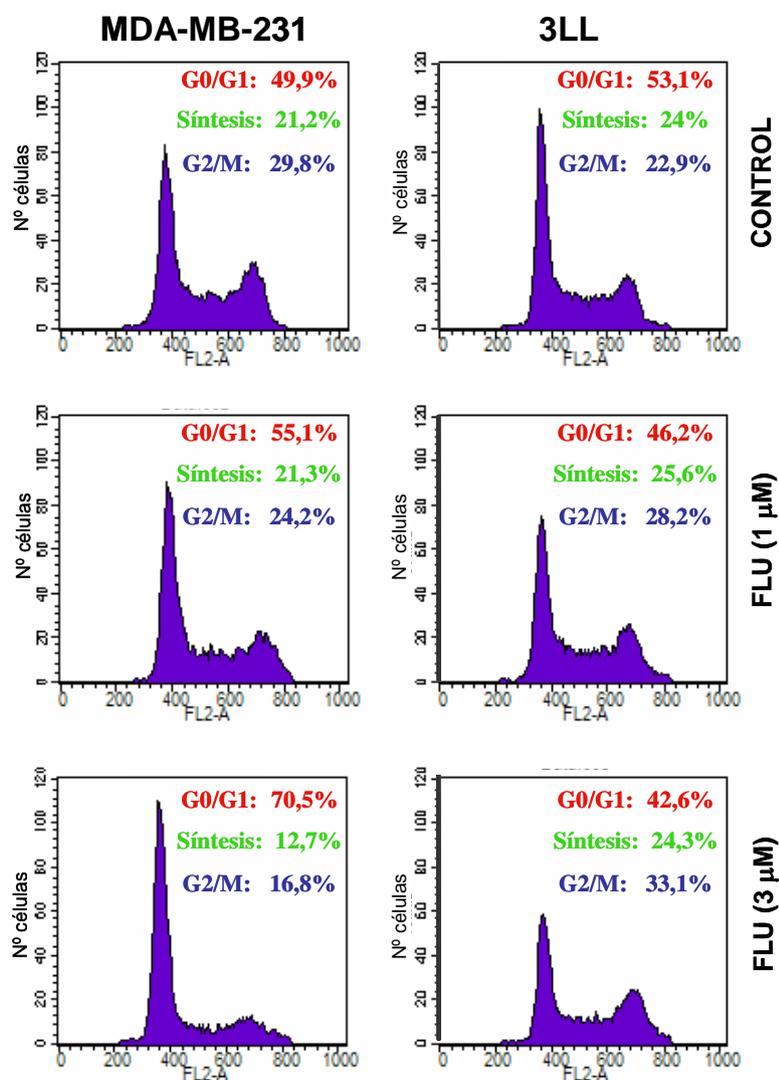


Figura 37. Efecto de la fluvastatina en la distribución de las células en las fases del ciclo celular. Las células MDA-MB-231 y 3LL se trataron durante 72 horas con 1 y 3 μM de fluvastatina (FLU) o con agua (como control). Tras el tratamiento se fijaron, se permeabilizaron, se tiñó su ADN con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. La adquisición de datos y el análisis de los resultados se llevaron a cabo empleando el programa informático Cell QUEST. En el análisis solamente se tuvieron en cuenta células individuales (singletes) identificadas mediante la representación de la anchura del pulso (canal FL2-W del citómetro) generado por la fluorescencia del yoduro de propidio, frente al área del pulso de la misma señal (FL2-A). En la figura se representa la fluorescencia FL2-A frente al número de células, del mismo número de singletes en cada muestra. Los experimentos se realizaron tres veces y se obtuvieron resultados muy similares. La figura muestra uno de ellos.

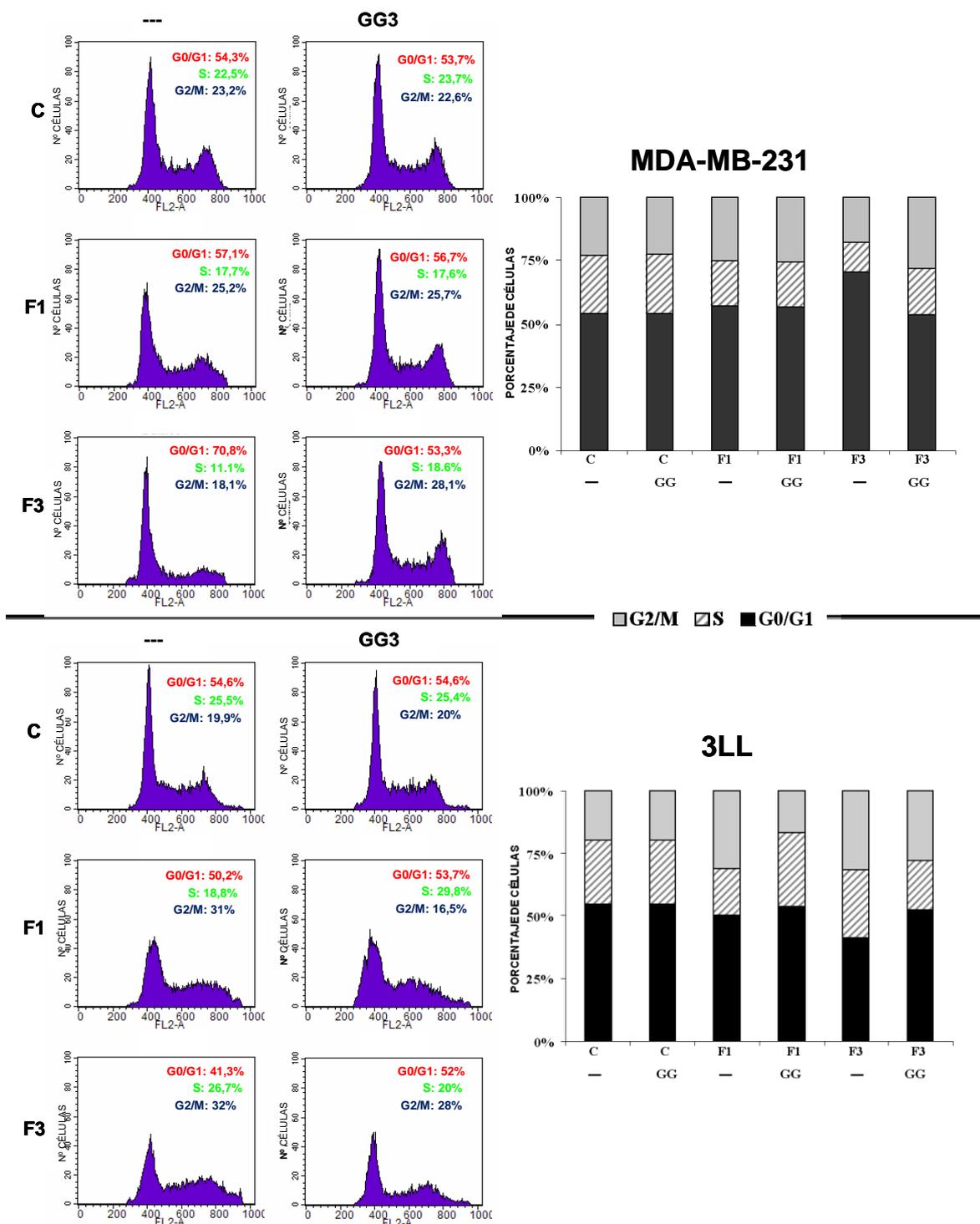


Figura 38. Efecto del geranilgeraniol en la distribución de las células en cada fase del ciclo celular causada por la fluvastatina a las 72 horas. Se trataron las células durante 72 horas con fluvastatina 1µM (F1) o 3µM (F3) o agua (como control) en presencia o ausencia de geranilgeraniol (GG) 3 µM o etanol como control. Las células se fijaron y “permeabilizaron”, se tiñó el ADN con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. Los experimentos se realizaron tres veces y se obtuvieron resultados muy similares.

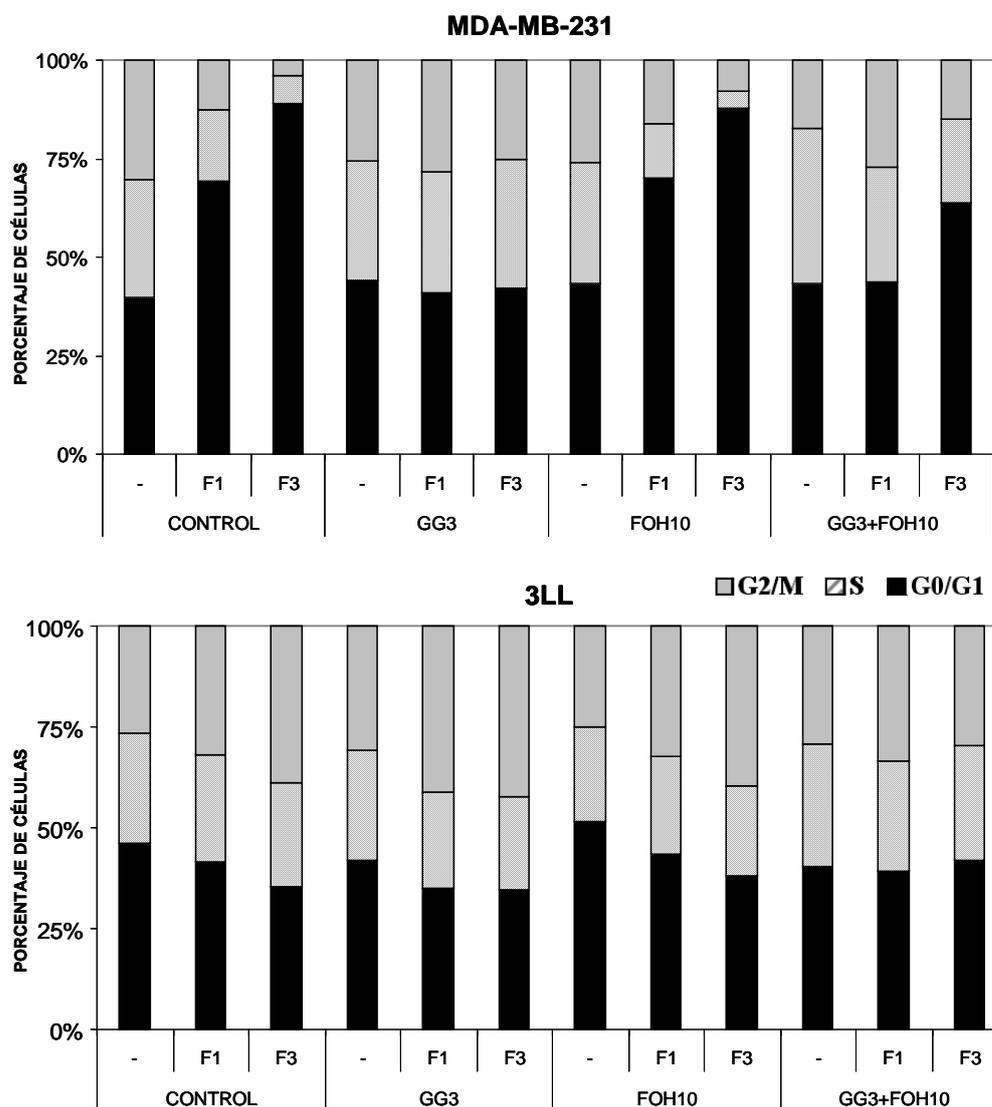


Figura 39. Efecto del geranilgeraniol y farnesol en la distribución de las células en cada fase del ciclo celular causado por la fluvastatina a las 48 horas. Se trataron las células durante 48 horas con fluvastatina 1 μ M (F1) o 3 μ M (F3) o agua como control en presencia o ausencia de geranilgeraniol (GG) 3 μ M y farnesol (FOH) 10 μ M o etanol como control. Las células se fijaron y “permeabilizaron”, se tiñó el ADN con yoduro de propidio y se analizaron mediante citometría de flujo. Los experimentos se realizaron tres veces y se obtuvieron resultados muy similares.

En cambio, en las 3LL, el GG, al igual que le FOH, produce una reversión de la parada del ciclo celular muy tenue, algo que difiere de lo observado a las 72 horas, en las que este análogo del GGPP revierte la acumulación de las células en G2/M al menos parcialmente. Al cotreatar con ambos productos juntos, GG y FOH, curiosamente la mínima protección de la parada del ciclo que producen por separado se suma obteniéndose una reversión aditiva,

aunque todavía parcial. La farnesilación, en este caso tiene un papel más importante que en las MDA-MB-231, no limitándose a un simple competidor con el geranilgeraniol por la prenilación de proteínas comunes. Es posible que, solo a las 72 horas de tratamiento con la fluvastatina, cuando la acción sobre el ciclo celular es menos acusada y el efecto sobre el ciclo celular puede estar enmascarado por la inviabilidad, el GG sí sea capaz de revertir la parada del ciclo celular.

RESUMEN

- *La fluvastatina produce una ralentización o parada de la progresión del ciclo celular:*
 - o *En las MDA-MB-231, se produce en el paso de la fase G1 a la S.*
 - o *En las 3LL, se produce en el paso de la fase G2 a la M.*
- *La parada es más acentuada a las 48 horas de tratamiento con fluvastatina que a las 72 horas.*
- *Es posible que la parada del ciclo celular sea la causa de la inviabilidad observada en el apartado 4 o que ambos procesos sean independientes y ocurran paralelamente.*
- *En cualquier caso, ésta explica parte de la inhibición de la proliferación no justificada por la inviabilidad, especialmente a las 48 horas de tratamiento con fluvastatina.*
- *En el cotratamiento con los donadores de grupos prenilo:*
 - o *En las MDA-MB-231, el GG revierte la acción de la fluvastatina totalmente. Con el FOH la reversión disminuye; probablemente ambos sustratos compiten por la prenilación de las GTPasas, siendo las geraniladas más activas que las farnesiladas.*
 - o *En las 3LL, a las 48 horas, el GG y el FOH por separado revierten mínimamente la parada y juntos suman su acción. Esto sugiere que cada uno prenila sus propias proteínas implicadas la progresión del ciclo celular. A las 72 horas el GG toma mayor importancia y revierte la parada del ciclo celular parcialmente.*

6. EFECTO DEL CISPLATINO SOBRE LAS CÉLULAS PREVIAMENTE “SENSIBILIZADAS” POR LA FLUVASTATINA.

La posible utilización de las estatinas como agentes anticancerosos ha sido ampliamente documentada. Como ejemplo, en este trabajo, se han demostrado los efectos antitumorales *in vivo* de la fluvastatina (apartado 1 de esta sección). Otros grupos también han ahondado en la dosificación conjunta de las estatinas con otro agente anticanceroso de uso común en la clínica (ya sea un agente farmacológico antitumoral, o incluso radiación) (Chan y cols., 2002; Wong y cols., 2002; Hindler y cols, 2006).

Para ilustrar la posible potenciación *in vitro* de la actividad antitumoral de un agente anticanceroso de eficacia probada por acción de la fluvastatina, se cotrataron ambas líneas celulares, MDA-MB-231 y 3LL, con fluvastatina y cisplatino (Feleszko y cols., 1998). El cisplatino es un fármaco anticanceroso muy utilizado en la clínica que pertenece a la familia química de los complejos del platino. Su mecanismo de acción requiere de su activación para quedar libres dos valencias del ión platino que forman dos enlaces estables con productos nucleofílicos del ADN, usualmente con dos moléculas de guanina adyacentes en la misma cadena, pero también formando puentes entre las cadenas. El resultado es la producción de errores de transcripción y la imposibilidad de que las cadenas de ADN se separen para la replicación.

Por otro lado, el hecho de que las células desadheridas por acción de la fluvastatina sean viables (ver apartado 4.1), aporta la posibilidad de que los tumores sólidos den lugar a metástasis; de ahí la importancia de conocer la efectividad de los agentes anticancerosos de forma específica entre ambas poblaciones adheridas y desadheridas por acción de la fluvastatina.

6.1. Efecto del cisplatino en la proliferación de células previamente “sensibilizadas” por la fluvastatina.

Para sensibilizar previamente a las células se trataron 1 y 3 μM de fluvastatina. A las 48 y 72 horas se añadió el cisplatino reponiendo de nuevo la fluvastatina y se trataron durante 24 horas. La concentración de cisplatino y el tiempo de tratamiento en estos experimentos se determinaron en estudios previos de proliferación mediante MTT con las mismas células (resultados no mostrados). Se decidió tratar con una concentración 30 y 300 μM durante 24 horas.

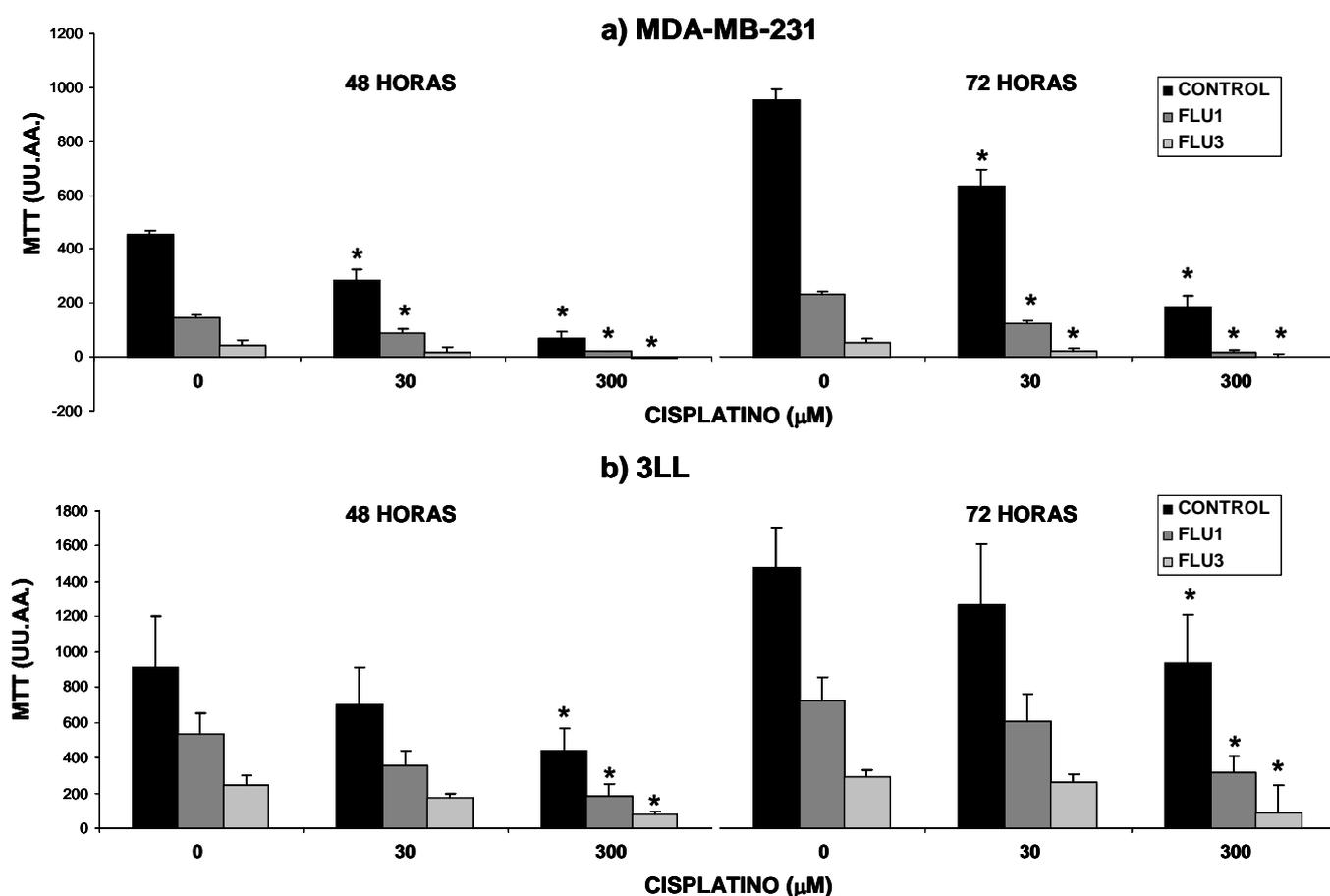


Figura 40. Efecto del cisplatino sobre las células a) MDA-MB-231 y b) 3LL previamente sensibilizadas con la fluvastatina. Proliferación celular evaluada mediante la técnica del MTT. Tras el tratamiento durante 48 y 72 horas con 1 μM (F1) y 3 μM (F3) de fluvastatina se añadió el agente antineoplásico cisplatino (30 μM y 300 μM) durante 24 horas. Los experimentos se realizaron tres veces. Los datos se expresan medias de los tres experimentos ± D.E. * p < 0,05 con respecto a cada grupo sin tratar con cisplatino a cada tiempo de tratamiento. U.U.AA: Unidades arbitrarias.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 40 y 41. Las células 3LL mostraron menos sensibilidad antiproliferante por el cisplatino que las MDA-MB-231. Es posible que las MDA-MB-231 se repliquen con mayor rapidez y, por tanto, debido a que el mecanismo de acción del cisplatino actúa inhibiendo la replicación, éstas sean más sensibles al agente inhibidor de la replicación.

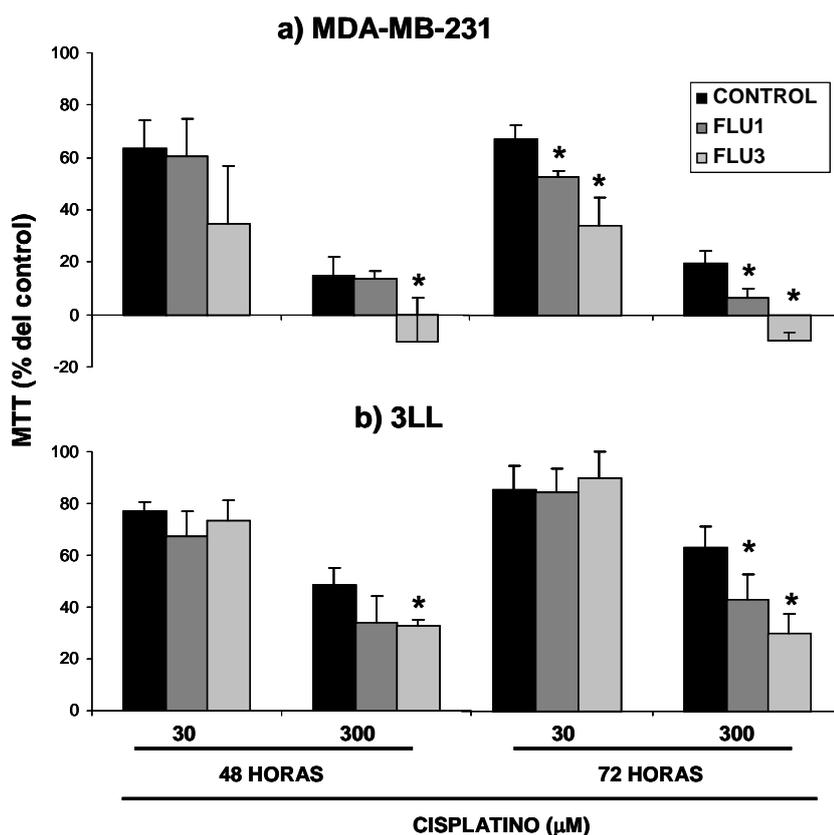


Figura 41. Efecto del cisplatino sobre las células previamente sensibilizadas con la fluvastatina en las células a) MDA-MB-231 y b) 3LL. Proliferación celular evaluada mediante la técnica del MTT. Tras el tratamiento durante 48 y 72 horas con 1 μM (F1) y 3 μM (F3) de fluvastatina se añadió el agente antineoplásico cisplatino (30 μM y 300 μM) y se trató con ambos fármacos durante las 24 horas. Los experimentos se realizaron tres veces. Los datos se expresan como las medias de los porcentajes ± D.E. dándole valor de 100% a cada control sin tratar con cisplatino respectivamente. * p < 0,05 con respecto a cada control a cada tiempo y cada concentración de cisplatino.

Además, el tratamiento antiproliferante de la fluvastatina sola es diferente al obtenido en el apartado 2 de esta sección (ver figura 29). Por ejemplo, a las 72 horas de tratamiento en los estudios anteriores, que equivalen al tratamiento 48 horas de este experimentos (ya que la fluvastatina se trató sola durante 48 horas pero conjunta con cisplatino durante 24 horas más), la inhibición de la proliferación es ligeramente menor. Esto es más palpable en las células 3LL, con las que anteriormente nunca disminuyó su proliferación tan acusadamente como en las MDA-MB-231. Ahora (figura 40) la inhibición es mucho mayor que antes. Muy probablemente esto es debido a que a las 48 horas del primer tratamiento con la fluvastatina, volvemos a añadir la estatina junto con el cisplatino (figura 15). Por lo tanto, a este tiempo de tratamiento, la cantidad de moléculas de la estatina sea mayor que si sólo tratáramos al inicio del tratamiento.

Entrando en los resultados obtenidos al cotratar con ambos fármacos, fluvastatina y cisplatino, es mejor estudiar la figura 41, ya que representa el porcentaje de proliferación con respecto a cada control no tratado con cisplatino. Así, podemos conocer la disminución de la proliferación como consecuencia del cisplatino en células no tratadas y tratadas previamente con fluvastatina. De nuevo vemos que con las células MDA-MB-231, el cisplatino actúa más agresivamente. Existe una sinergia de potenciación del efecto antiproliferante del cisplatino cuando tratamos con fluvastatina, muy clara en las células MDA-MB-231. Para las 3LL necesitamos la concentración de fluvastatina mayor y las 72 horas de sensibilización para ver una potenciación y no solo una sinergia aditiva de la inhibición de la proliferación de ambos agentes.

6.2. Efecto del cisplatino en la proliferación de células previamente desadheridas por la fluvastatina.

Quisimos relacionar este efecto potenciador de la fluvastatina en la inhibición de la proliferación por un agente antineoplásico con la inhibición de la adhesión y de la expresión de la MEC que es otro punto prometedor en la posible utilidad terapéutica de las estatinas. Para ello separamos las poblaciones adheridas a la placa de las despegadas tras la acción de la fluvastatina durante 72 horas (tiempo 0) y estudiamos su grado de sensibilización frente al agente anticanceroso cisplatino durante las 24 horas siguientes. Las concentraciones de cisplatino utilizadas para este experimento las elegimos a partir de los experimentos anteriores (figura 40): 30 μM para las MDA-MB-231 y 100 μM para las 3LL.

Los resultados se muestran en la figura 42. Para determinar la inhibición de la proliferación por acción del cisplatino primero tenemos que tener en cuenta que antes de tratar con éste (a tiempo 0) la cantidad de células en cada población no es la misma. Así, en las MDA-MB-231, hay más cantidad de células adheridas y menos despegadas cuando tratamos con fluvastatina 1 μM , y con una concentración de 3 μM la distribución en ambas poblaciones es más homogénea. En las 3LL la cantidad en ambas poblaciones es más similar. Por eso la figura 43 es más esclarecedora, ya que restamos la proliferación del “tiempo 0” de la obtenida tras el tratamiento con cisplatino 24 horas después. De esta manera podemos saber la proliferación neta durante el tratamiento de cisplatino y observar qué población ha crecido menos. A pesar de que, especialmente las células MDA-MB-231 parten de una menor proliferación a tiempo 0, todas las poblaciones de ambas líneas celulares parecen disminuir su proliferación hasta unos valores similares. Esto indica que la sensibilización de las células adheridas y las desadheridas por acción de la fluvastatina es similar. Esto coincide con los

experimentos realizados en el apartado 4.1 sobre la viabilidad celular, en el que concluimos que las células desadheridas no eran las que aportaban la inviabilidad al conjunto de células tratadas, sino que éstas se encontraban en vías de la inviabilidad. De ser así, en el escenario biológico del tumor sólido, esta población tiene gran peligro de invadir tejidos adyacentes y producir metástasis, y más teniendo en cuenta que estas células son altamente invasivas. Por eso, el hecho de que el cisplatino pueda inhibir su proliferación tanto como las células adheridas como en las pegadas de la placa adquiere mayor valor terapéutico.

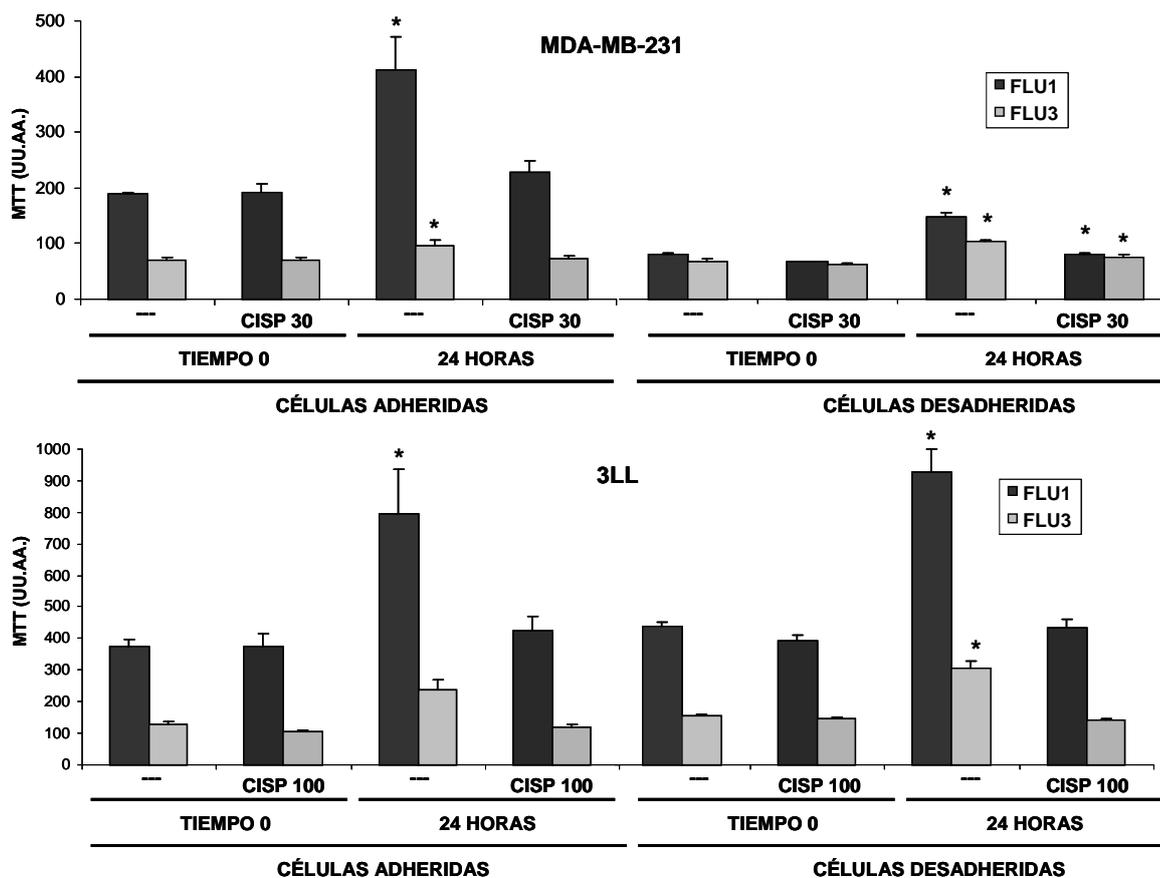


Figura 42. Efecto del cisplatino sobre las células MDA-MB-231 Y 3LL previamente sensibilizadas con la fluvastatina y separadas en función de su adhesión al sustrato. Proliferación celular evaluada mediante la técnica del MTT. Se trató con 1 μM (FLU1) y 3 μM (FLU3) de fluvastatina y tras 72 horas (tiempo 0), se separaron las poblaciones adheridas y las desadheridas de la placa y se trató con cisplatino 30 μM (CISP 30) para las células MDA-MB-231 y 100 μM (CISP100) para las 3LL, durante 24 horas. Los experimentos se realizaron tres veces obteniendo resultados similares. Los datos se expresan como las medias ± D.E. dándole valor. * p < 0,05 con respecto a cada control (---) a tiempo 0. U.U.AA: unidades arbitrarias.

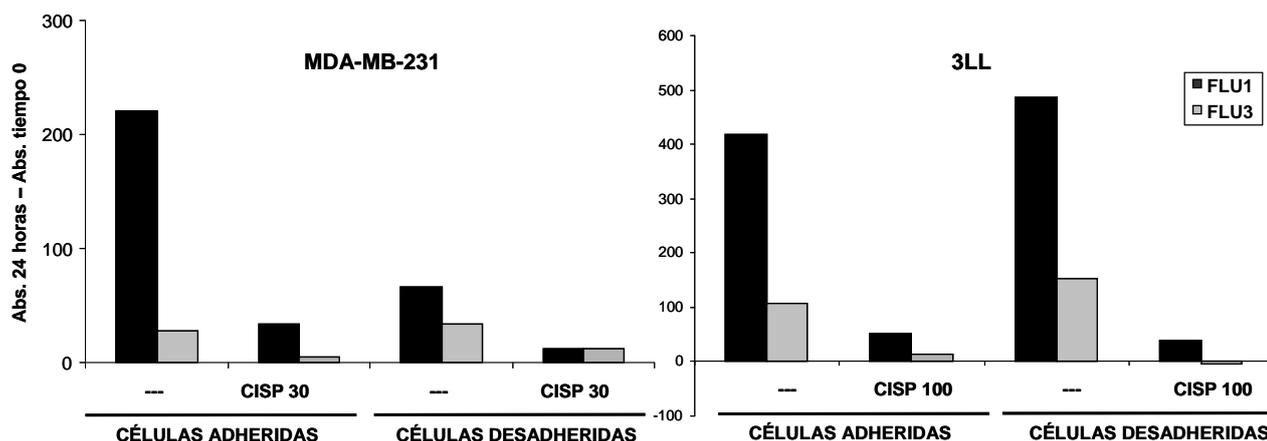


Figura 43. Crecimiento neto de las células MDA-MB-231 Y 3LL tratadas durante 24 horas con cisplatino y previamente sensibilizadas con la fluvastatina y separadas en dos poblaciones en función de su adhesión al sustrato. Proliferación celular evaluada mediante la técnica del MTT. Se trató con 1 μ M (FLU1) y 3 μ M (FLU3) de fluvastatina y tras 72 horas (tiempo 0) se separaron las poblaciones adheridas y las desadheridas y se trató con cisplatino 30 μ M (CISP 30) para las células MDA-MB-231 y 100 μ M (CISP100) para las 3LL, durante 24 horas. Los experimentos se realizaron tres veces obteniendo resultados similares. Los datos se expresan como el crecimiento neto durante el tratamiento con el cisplatino resultante de restar la absorbancia obtenida tras las 24 horas de tratamiento con cisplatino y la absorbancia obtenida tras tratar durante 72 horas con fluvastatina y separar las poblaciones en función de su adhesión.

RESUMEN

- La acción de la fluvastatina sobre la proliferación de las células MDA-MB-231 produce una sinergia de potenciación en la actividad antitumoral del cisplatino.
- El efecto antitumoral del cisplatino es idéntico en las células previamente desadheridas por la fluvastatina de las que mantienen su adhesión a la placa.

7. EFECTO DE LA FLUVASTATINA EN LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

Uno de los objetivos principales de este trabajo es el estudio de la expresión de genes de proteínas constituyentes de la matriz extracelular del parénquima de los tumores epiteliales, y del efecto que la fluvastatina tiene en ella. Para ello hemos estudiado el patrón de expresión de algunos de estos genes en células de tumores epiteliales de dos especies diferentes (el hombre y el ratón) y de dos orígenes diferentes (mama y pulmón). La línea de ratón es la misma que nos sirvió para determinar la efectividad de esta estatina in vivo en un

tumor epitelial (apartado 1), lo que permitiría en un futuro establecer validaciones bidireccionales entre los resultados obtenidos *in vitro* y lo obtenidos *in vivo*.

La mayoría de los abordajes observados hasta la fecha relacionan la degradación o producción de la MEC en las células tumorales con la motilidad, invasividad y, por lo tanto, con la metástasis (Sahai y Marshall, 2002; Rennebeck y cols., 2005; Narumiya y cols., 2009; Hindler y cols, 2006). Pero la degradación de la MEC también puede ser utilizada como una posible herramienta que permita el paso de fármacos de elevado peso molecular. Éstos, en el entorno de un tumor sólido, con la ayuda adecuada serían capaces de acceder a la diana y, por tanto, de ejercer su acción antitumoral, lo cual puede ocurrir sin necesidad de que las células malignas se desprendan de la masa sólida tumoral. De esta manera se solventaría uno de los principales problemas que presenta la farmacología dirigida en el tratamiento de los tumores sólidos, tan efectivos *in vitro* pero totalmente ineficaces *in vivo* (Pirker, 1988; Van Horsen y cols., 2000; Li y cols., 2005). Se sabe que Rho está relacionado con la producción de matriz extracelular en las células tumorales, por lo tanto, las estatinas, como agentes capaces de inhibir la localización de Rho y Ras, se plantean como herramientas farmacológicas necesarias para aumentar la permeabilidad en los tumores sólidos. El posible efecto antifibrótico tumoral de las estatinas no se ha estudiado con profundidad. Sin embargo, sí se ha establecido su capacidad de prevenir y reducir la fibrosis en otros tejidos, como los de riñón e hígado (Buemi, 2001; Takemoto y Liao., 2001; Tandon y cols, 2004). Los planteamientos de nuestro trabajo se basan en que la fibrosis de diferentes tejidos quizá se produzca por algunos mecanismos comunes y que, tal vez, alguno de éstos esté relacionado con las vías afectadas por las estatinas.

Como se puede observar en la figura 44, la fluvastatina inhibe de forma dependiente de la concentración la expresión de los genes de colágeno IV y fibronectina, elementos de la matriz extracelular (MEC), en las dos líneas celulares a las 72 horas de tratamiento. Aunque hemos concretado en las secciones anteriores de este apartado que, a las 72 horas de tratamiento y con estas concentraciones de fluvastatina, la inviabilidad observada correspondía con la inhibición de la proliferación, y ésta probablemente sea consecuencia de la parada del ciclo celular, cualquier efecto sobre la expresión de genes podría no deberse a una acción específica directa sino a un efecto indirecto o derivado de la muerte de las células. Pero la expresión del gen de la subunidad ribosómica 18S, gen *housekeeping* utilizado con frecuencia en los estudios de RT-PCR (Valenti y cols., 2006), parece indicar que la disminución de expresión que obtenemos se trata de un efecto restringido a un grupo de genes y no una acción indiscriminada relacionada con la inhibición general de la expresión génica o derivada de la

muerte celular. Por tanto, para la misma expresión de la subunidad 18S, hay una menor expresión de los genes colágeno IV y fibronectina en aquellas células tratadas con la fluvastatina.

Así pues, es posible que el efecto en la expresión de genes de la MEC esté relacionado con la disminución de la proliferación o de la adhesión, pero no parece ser un fenómeno derivado de la muerte de las células.

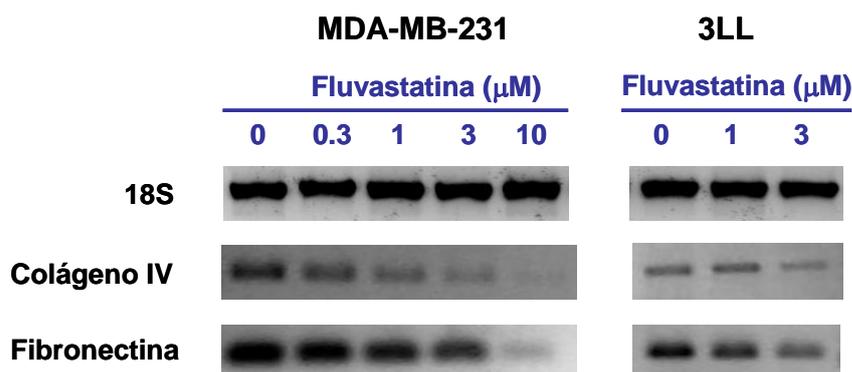


Figura 44. Efecto de la fluvastatina a las 72 horas de tratamiento en la expresión de las proteínas de la MEC colágeno IV y fibronectina, en las células MDA-MB-231 y 3LL, determinada por RT-PCR. Las células fueron tratadas durante 72 horas con 0,3, 1, 3 y 10 μM de fluvastatina o con agua como control. Los experimentos se realizaron tres veces y se muestra uno representativo. 18S: subunidad ribosómica 18S.

Para conocer si la disminución de la expresión de elementos de la MEC por la fluvastatina se debía a la inhibición de la ruta del mevalonato y no por la acción de la fluvastatina sobre alguna otra vía, tratamos ambas líneas celulares con fluvastatina y con concentraciones seriadas de mevalonato durante 72 horas (datos no mostrados). Al igual que en las funciones anteriormente estudiadas (proliferación y adhesión) el mevalonato revirtió por completo la disminución de la expresión de estos elementos de la MEC.

7.1. Papel de la farnesilación y la geranilación en la inhibición de la expresión de la MEC por la fluvastatina.

Para profundizar si la disminución en la expresión de componentes de la MEC por acción de la fluvastatina era dependiente de la falta de sustratos de la prenilación GGPP y FPP, sometimos a las líneas celulares a un tratamiento con la fluvastatina (1 y 3 μM), en presencia de GG (3 μM) o FOH (10 μM) o ambos a la vez durante 72 horas. Como se puede observar en la figura 45 el GG, revierte totalmente la disminución de la expresión de

elementos de la MEC producida por la fluvastatina, excepto en el caso de la fibronectina en las células 3LL. En ellas, la concentración alta de fluvastatina (3 μ M) produce una inhibición de la expresión de fibronectina parcialmente independiente de la geranilación.

Este resultado refuerza la idea señalada anteriormente de que la inhibición de los diferentes genes de la MEC por parte de la fluvastatina en las células 3LL está mediada por rutas de señalización diferentes. También señala las diferencias entre las líneas celulares en cuanto al control de la expresión de los mismos genes, y, por lo tanto, en cuanto a la sensibilidad de esas vías a la fluvastatina. No obstante, a pesar de las diferencias de los mecanismos de control de la expresión de los genes entre líneas celulares, la fluvastatina muestra un patrón de inhibición génica semejante. Esto podría indicar que, aunque puedan existir diferencias en las isoformas específicas de la GTPasas que controlen estos procesos en diferentes especies, todas estén sujetas a modulación por un grupo prenilo u otro. Es decir, que el plan general de regulación de la expresión de genes de la MEC puede tener características muy similares en las dos especies, y compartir mecanismos semejantes, en los que la prenilación de las proteínas de la superfamilia Ras puede tener un papel importante.

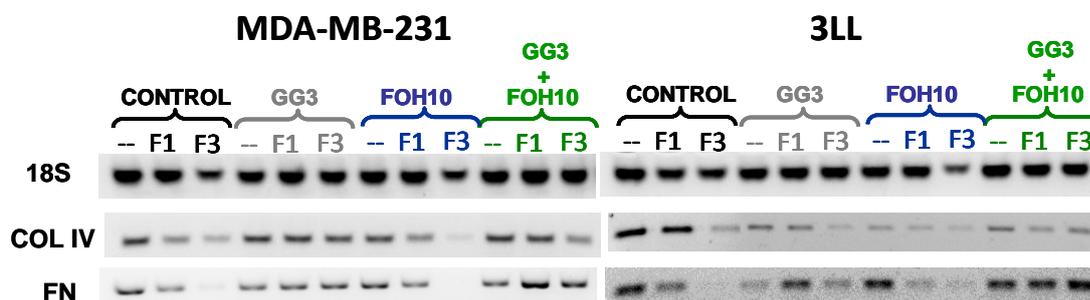


Figura 45. Efecto del geranylgeraniol en la inhibición de la expresión de genes de la MEC en células MDA-MB-231 y 3LL por el tratamiento de la fluvastatina durante 72 horas. Las células fueron tratadas durante 72 horas con fluvastatina 1 (F1) y 3 (F3) μ M o con agua como control (-), en presencia y ausencia de 3 μ M de geranylgeraniol (GG3), 10 μ M de farnesol (FOH10) o ambos. Se utilizó como control de carga de ADNc la expresión del gen “housekeeping” 18S RNA ribosómico. Los experimentos se realizaron cuatro veces y se obtuvieron resultados similares. 18S: subunidad ribosómica 18S; COL I: colágeno I; COL IV: colágeno IV; FN: fibronectina.

Como viene ocurriendo con los estudios anteriormente descritos, el cotratamiento con FOH no protege de la inhibición de la expresión de los elementos de la MEC. Esto coincide con la teoría de que la producción de la MEC esté regulada principalmente por proteínas que geranilan (Denoyelle y cols., 2001; Sahai y Marshall, 2002; Tang y cols., 2008) y relacionaría a la familia Rho, que principalmente se geranila, con la adhesión y síntesis

de la MEC. Parece que, en los mecanismos observados hasta ahora, el FPP tiene un efecto subsidiario. Cuando cotratamos con ambos agonistas de GGPP y FPP, la protección del GG no se ve reducida por la presencia del FOH, como se ha observado en los estudios anteriores. Esto parece indicar que las proteínas implicadas en la expresión y síntesis de la MEC sólo se geranilan, y no tienen esa posible dualidad que defienda la existencia de un derivado farnesilado menos o nada activo.

También estudiamos el efecto sobre la expresión de la MEC de la fluvastatina tratando durante 48 horas. Es importante realizar los estudios sobre la expresión de genes a las 48 horas, tiempo de tratamiento que no produce tanta inviabilidad celular (figura 34 a) e inhibición de la proliferación (figura 29) como a las 72 horas. Como podemos observar en la figura 46, la inhibición de la expresión de los elementos de la MEC ya ocurre a las 48 horas. Esto no sólo es importante porque demuestra una inhibición directa y específica de la expresión de estos genes por parte de la fluvastatina en un entorno celular no deteriorado significativamente, sino que demuestra que también existe una disminución de la expresión cuando las células no se encuentran tan confluentes, ya que, en estas circunstancias, las diferencias en la proliferación son menos patentes. Por un lado la fluvastatina sólo ha podido inhibir la proliferación durante 48 horas y por otro, las células que no se han tratado con fluvastatina han tenido 24 horas menos para multiplicarse.

Es posible que la síntesis de ciertos elementos de la MEC requiera la confluencia de las células. El contacto intercelular o una suficiente densidad celular permitirían que determinados factores de crecimiento paracrinos y yuxtacrinos alcanzaran concentraciones suficientes en el medio de cultivo o se transmitan a través de las uniones "gap" entre una célula y la adyacente. Si esta confluencia y adhesión al medio (en este caso a la placa de cultivo) se pierden, la síntesis de dichos constituyentes de la MEC podría inhibirse. Como hipótesis, es posible que la interacción intercelular, o el incremento de la proliferación -quizá también derivado del aumento de densidad celular- induzcan la síntesis de colágeno IV y fibronectina en estas células. También es posible que el origen de la estirpe celular, y su tendencia natural a formar MEC o a la formación de membranas basales (en las que el colágeno IV es un constituyente fundamental), relacionen la adhesión y la proliferación con la síntesis de elementos de la MEC, en lugar de que la fluvastatina ejerza un efecto directo sobre los mecanismos que regulan la expresión de la matriz. Pero esta hipótesis se ve rebatida por el hecho de que, incluso a las 48 horas, cuando hay menores diferencias de confluencia, adhesión

y proliferación entre las muestras, el perfil inhibitorio de la fluvastatina es idéntico al de las 72 horas de tratamiento.

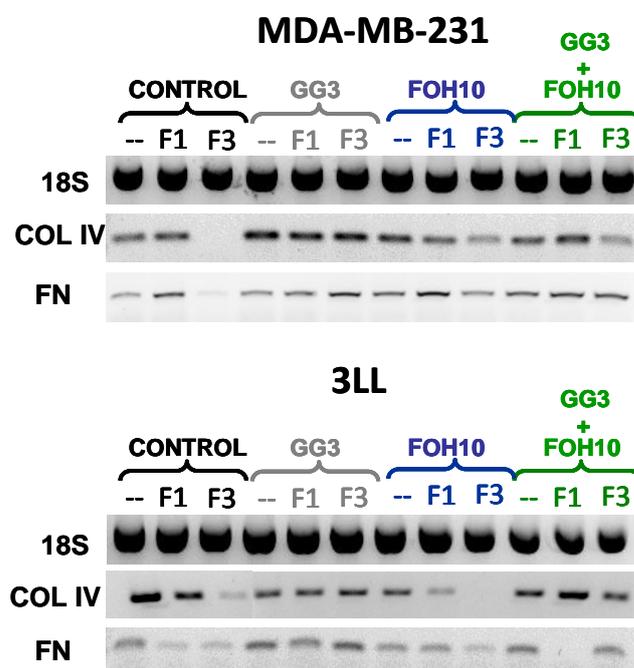


Figura 46. Efecto del geranilgeraniol en la inhibición de la expresión de genes de la MEC en células MDA-MB-231 y 3LL por el tratamiento de fluvastatina durante 48 horas. Las células fueron tratadas durante 48 horas con fluvastatina 1 (F1) y 3 (F3) μ M o con agua como control (-), en presencia y ausencia de 3 μ M de geranilgeraniol (GG3) o 10 μ M de farnesol (FOH10) o ambos. Se utilizó como control de carga de ADNc la expresión del gen “housekeeping” 18S ribosómico. Los experimentos se realizaron tres veces y se obtuvieron resultados similares. 18S: subunidad ribosómica 18S; COL IV: colágeno IV; FN: fibronectina

Con GG, de nuevo la protección de la expresión de los elementos de la MEC tiene el mismo perfil que a las 72 horas, con la excepción de que en las 3LL la expresión de fibronectina se recupera totalmente y no parcialmente como ocurre 24 horas después. El cotratamiento con el agonista del sustrato de farnesilación FPP, FOH, en cambio, parece revertir ligeramente la inhibición de la expresión colágeno IV, mientras que el cotratamiento de éste con GG demuestra que realmente sí existe competencia de ambos sustratos por la prenilación de las proteínas implicadas en la transcripción de los genes de la MEC. Contrariamente a esto, a las 72 horas el cotratamiento GG y FOH juntos, la reversión de la expresión de elementos de la MEC no parece disminuir la reversión que el GG producía sólo. Una hipótesis sería que, a las 72 horas de tratamiento, las supuestas proteínas duales que pueden geranilarse y farnesilarse y que son responsables en parte de la expresión de la MEC,

se encontrarían degradadas y la ruta de señalización que produciría la transcripción de los elementos de la MEC se sostendría principalmente por proteínas que exclusivamente se geranilan. Futuros experimentos que estudien la cantidad, prenilación y activación de parte de las proteínas de la familia de Ras tratarán de aportar información al respecto.

Finalmente, cabe resaltar la importancia de los efectos de las concentraciones más bajas de fluvastatina (1 μ M) a las 72 horas y de ambas a las 48 horas, que ponen de manifiesto que incluso, con concentraciones más permisivas para la supervivencia celular, se produce cierta inhibición de la síntesis de la MEC. En la situación patológica real, lo más probable es que una parte de la masa tumoral sobreviva a la acción de la fluvastatina, ya que las células tumorales generan resistencia a los fármacos con facilidad. Estas resistencias se deben a la expresión o *sobreexpresión* de sistemas transportadores de membrana que sacan los fármacos al compartimento extracelular y limitan su concentración intracelular. En estas condiciones, es posible que la fluvastatina todavía mantenga sus efectos sobre la inhibición de la producción de los constituyentes de la MEC. Esto permitiría su uso con la intención terapéutica que se ha planteado en este estudio, es decir, la de reducir la fibrosis parenquimal del tumor y permitir el acceso de conjugados antitumorales específicos, lo que podría contribuir a crear la base de una nueva estrategia terapéutica contra la enfermedad.

RESUMEN

- *La fluvastatina inhibe la expresión de los elementos de las MEC, colágeno IV y fibronectina, de forma dependiente de la concentración en las MDA-MB-231 y 3LL.*
- *Esta acción es:*
 - o *específica, ya que la expresión de la subunidad ribosómica 18S se mantiene intacta, e*
 - o *independiente de la confluencia celular, ya que a las 48 horas de tratamiento se repite el mismo patrón de inhibición que a las 72 horas.*
- *El cotratamiento con mevalonato restituye totalmente la inhibición de la MEC por la fluvastatina.*
- *El GG revierte la inhibición de la expresión de la MEC, no así el FOH. Esto indica la necesidad de la geranilación de las GTPasas que modulan la expresión de la MEC.*
- *El cotratamiento con ambos análogos de GGPP y FPP, muestra un comportamiento idéntico al del GG solo a las 48 horas de tratamiento con fluvastatina, pero a las 72 horas la reversión de la expresión es menor.*

8. SÍNTESIS, PRENILACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LAS FAMILIAS DE PROTEÍNAS G INTRACELULARES, RHO Y RAS.

Hasta el momento hemos estudiado algunos de los efectos que la fluvastatina produce sobre las células tumorales humanas de cáncer de mama MDA-MB-231 y de pulmón de ratón 3LL. Como hemos expuesto en la Introducción, las estatinas inhiben la síntesis de mevalonato a partir del HMG-CoA, lo que supone una *depleción* de los productos isoprenoides derivados de éste (figura 10). Dentro de estos derivados del mevalonato encontramos los sustratos de la prenilación de las proteínas “CAAX”: GGPP y FPP. En función de los aminoácidos del extremo carboxi-terminal de estas proteínas, la afinidad de las transferasas que introducen el derivado isoprenoide variará. Así, unas serán preniladas por la farnesil transferasa (acoplado un grupo farnesilo a la cisteína del extremo carboxi-terminal) y otras por la geranil-geranil transferasa I ó II (que acopla un grupo geranilgeranilo). Entre estas proteínas “CAAX” se encuentran las pequeñas GTPasas monoméricas de la superfamilia Ras como Ras o Rho. Éstas actúan como transductores en múltiples cascadas de señalización en funciones celulares como la proliferación, la supervivencia, la migración, la reorganización del citoesqueleto, etc. También tienen actividad en el citosol y el núcleo, actuando como activadores de la transcripción de elementos de respuesta a sustrato (SRE), aunque para esta actividad no requieren estar prenilados ni anclados a la membrana plasmática.

La desregulación de estas proteínas es un punto clave en la transformación celular y, por tanto, la superfamilia Ras constituye una diana tumoral, de ahí que las estatinas se hayan postulado como posibles agentes antitumorales: la falta de sustratos prenilo necesarios para la correcta localización de estas proteínas en la membrana supone su deslocalización y, por lo tanto, evita su correcta función como transductores de señales.

En los apartados anteriores hemos demostrado que la fluvastatina inhibe *in vivo* el crecimiento del tumor e *in vitro* la proliferación, la viabilidad, el ciclo celular, la adhesión al sustrato y la expresión de elementos de la MEC. En los siguientes apartados estudiaremos los efectos de la fluvastatina sobre estas proteínas de la familia de Ras: primero observaremos los posibles cambios en la síntesis y expresión estas proteínas, después estudiaremos su localización celular, lo que indicará su grado de prenilación y cuantificaremos la activación de RhoA (RhoA unido a GTP). Finalmente, intentaremos relacionar causalmente ambos estudios.

8.1. Estudio de la cantidad de GTPasas “totales” de la superfamilia Ras.

Para determinar la cantidad de proteínas de la superfamilia Ras que había en la célula utilizamos la técnica del Western blot, que permite separar las proteínas que se cargan en un gel de acrilamida por electroforesis en función de su peso molecular y, posteriormente, identificarlas, localizarlas y cuantificarlas por su capacidad para unirse a anticuerpos específicos (Towbin y cols, 1979). Para obtener las muestras de proteínas, lisamos las células con un tampón específico que contenía como detergente Tritón X-114 (TX-114). En todo momento trabajamos a 4 °C. De esta manera conseguimos tanto las proteínas citosólicas como las proteínas integrales de membrana que se encontraban ancladas a la membrana por su dominio hidrofóbico. Es decir, conseguimos extraer, junto con el resto de las proteínas de las células, las pequeñas GTPasas no preniladas que se localizaban en el citosol y también las preniladas ancladas a la membrana por el grupo prenilo (ver apartado 8 de Material y Métodos).

Cada muestra fue normalizada por la concentración de proteínas totales y así compensamos la diferente cantidad de proteínas entre las muestras debido a la inhibición de la proliferación por la fluvastatina. En las figuras 47 y 48 observamos la cantidad de proteínas detectadas mediante anticuerpos específicos en cada condición de cultivo.

8.1.1. Estudio de las proteínas Ras en las MDA-MB-231.

En las células MDA-MB-231 (figura 47) la cantidad de RhoA aumenta tras el tratamiento con la fluvastatina. Debemos recordar la situación general en la que se encuentran las células a las 48 horas de tratamiento; la fluvastatina ha inhibido la expresión de la MEC, ha parado ciclo celular en la fase G₀/G₁ y, como consecuencia de ello, hay cierta inviabilidad celular. Ambos efectos se traducen en una bajada de la proliferación. En este marco, RhoA, la proteína mayoritaria de la familia de Rho, aumenta su cantidad dentro de la célula. Una posible explicación es que la célula tratada con la fluvastatina sintetice más cantidad de RhoA para compensar las inhibiciones que está sufriendo en las rutas en la que ésta participa. En los tratamientos con los agonistas de los sustratos de prenilación, observamos un perfil muy similar al obtenido hasta ahora: el GG revierte el aumento de la cantidad de RhoA, no así el FOH. De nuevo el cotratamiento de ambos a la vez, GG y FOH, disminuye la protección que se observaba al tratar con GG sólo. Esto puede tener una explicación: cuando tratamos con fluvastatina, RhoA no puede geranilarse y, por lo tanto, no se localiza adecuadamente en la membrana plasmática, por lo que no puede hacer sus funciones de forma adecuada. Como mecanismo para contrarrestar la pérdida de las funciones, la célula activa la síntesis de novo

de RhoA, inhibe su degradación o ambas a la vez. Con el cotratamiento con GG conseguimos que RhoA obtenga el sustrato para geranilarse y así, éste realizará sus funciones adecuadamente. Es por esto que la célula no necesita aumentar la síntesis de RhoA y, por tanto, recupera los valores normales. En cambio, con FOH, RhoA no consigue realizar con normalidad sus funciones y la síntesis de RhoA vuelve a estimularse. Lo mismo ocurre con las isoformas RhoB y RhoC.

Los resultados obtenidos confirman estudios anteriores en los que la cantidad de RhoA, RhoB, Rap1 y Ras total de la célula aumentaba al *deplectar* el mevalonato. Los mecanismos por los que ocurría esto se basaban en una modulación transcripcional, con un aumento del ARN mensajero de estas proteínas, aumentando la síntesis de novo de las mismas; y post-traducciona, inhibiendo la degradación de las proteínas ya existentes (Holstein y cols., 2002; Turner y cols., 2007; Von Zee y cols., 2009).

A las 72 horas la concentración de 1 μM sigue la tendencia observada a las 48 horas y aumenta la cantidad de RhoA aunque con 3 μM de fluvastatina la cantidad de la proteína cae significativamente. Algo similar aunque no tan exagerado ocurre con el cotratamiento con FOH. El escenario celular a las 72 horas de tratamiento es ligeramente diferente: la inviabilidad celular es mucho mayor como consecuencia de la parada del ciclo celular que alcanzó su máximo 24 horas antes y esto se traduce en un efecto antiproliferante mayor. Por eso, con el tratamiento de 3 μM de fluvastatina, la cantidad de RhoA no aumenta. Esto puede ser debido al grado de inviabilidad que la célula ha alcanzado a las 72 horas (figura 34 b). En este escenario la maquinaria de la traducción debe encontrarse dañada así que la célula deja de sintetizar RhoA.

También estudiamos los cambios moleculares que la fluvastatina realizaba en las GTPasas Ras ya que, éstas también participan en muchas de las funciones celulares que hemos estudiado anteriormente (Sahai y Marshall, 2002). Además, la fluvastatina inhibe la síntesis tanto del sustrato de la geranilación GGPP, que prenila a las proteínas Rho, como el FPP, sustrato de la farnesilación, que principalmente prenila a las proteínas de Ras. Las proteínas que se eligieron fueron H-Ras, que sólo se farnesila, y K-Ras, que se ha descrito que en condiciones fisiológicas se farnesila, pero que, cuando se agotan las reservas de FPP puede geranilarse alternativamente, siendo el producto geranilado igual de activo que el producto farnesilado (Philips y Cox, 2007; Turner y cols., 2007).

MDA-MB-231

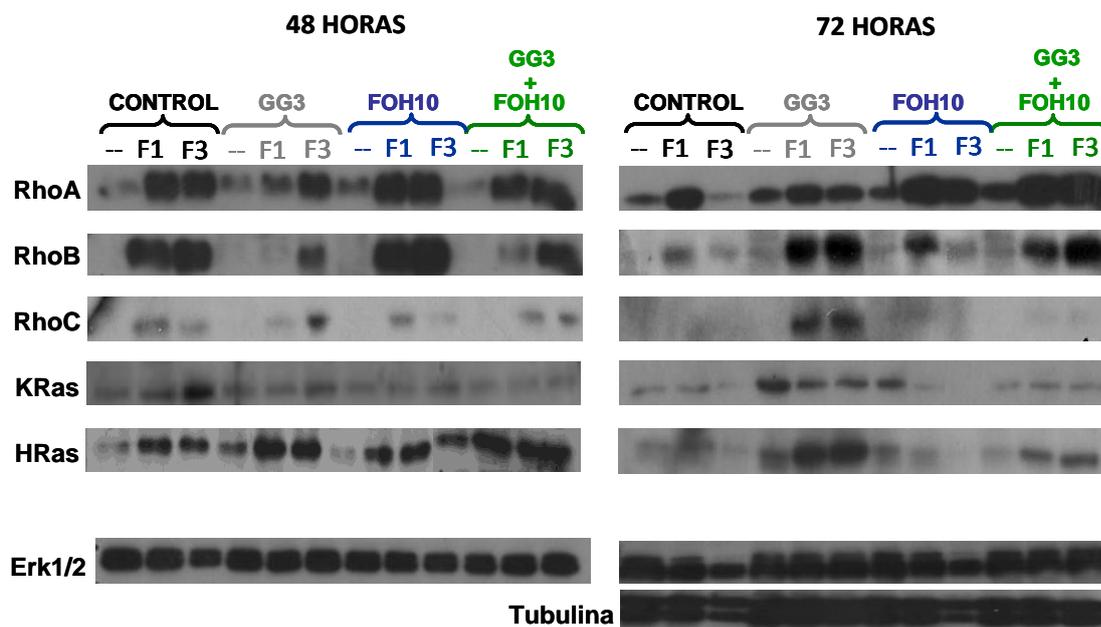


Figura 47. Efecto de la fluvastatina sobre la síntesis de proteínas de la familia de Ras totales. Las células MDA-MB-231 se trataron durante 48 y 72 horas con 1 y 3 μM de fluvastatina (F1 y F3 respectivamente) o con agua como control, en presencia o ausencia de 3 μM de geranilgeraniol (GG3), 10 μM de farnesol (FOH10), o ambos. Se cargó la misma cantidad de proteínas en todas las muestras. Posteriormente se separaron por electroforesis en función de su peso molecular y finalmente se detectaron mediante la unión a anticuerpos específicos. Los experimentos se realizaron tres veces con resultados muy similares.

A las 48 horas de tratamiento con fluvastatina (figura 47), la cantidad de K-Ras y H-Ras aumenta de forma dependiente de la concentración, al igual que ocurre con la familia de Rho. Tanto el cotratamiento de GG como el de FOH revierten el aumento de la cantidad de proteínas K-Ras experimentado con la fluvastatina, lo que indica la posibilidad de que K-Ras se geranile alternativamente y se obtenga un producto geranilado que realice sus funciones con la misma eficacia (Philips y Cox, 2007). El cotratamiento con GG y FOH a la vez no varía la disminución de la cantidad de K-Ras, lo que confirma esta dualidad de K-Ras. En cambio, con el cotratamiento con GG, la cantidad de H-Ras aumenta, lo que indica que ésta no se geranila alternativamente como K-Ras.

El perfil observado a las 72 horas de tratamiento con fluvastatina es muy similar al de Rho; el deterioro de la maquinaria de transcripción y síntesis de proteínas afecta por igual a ambas proteínas. Esto explica que K-Ras y H-Ras disminuyan con la concentración de fluvastatina 3 μM , efecto contrario al observado 24 horas antes.

8.1.2 Estudio de las proteínas Ras en las 3LL.

Analizamos los resultados obtenidos para las 3LL (figura 48). Recordemos que las células 3LL, no tienen el mismo comportamiento que las MDA-MB-231 en los estudios de proliferación, adhesión, ciclo celular y expresión de elementos de la MEC. La farnesilación tiene un papel más importante que en las células MDA-MB-231, aunque la geranilación sigue siendo el proceso principal cuya inhibición provoca los cambios observados en los estudios anteriormente descritos.

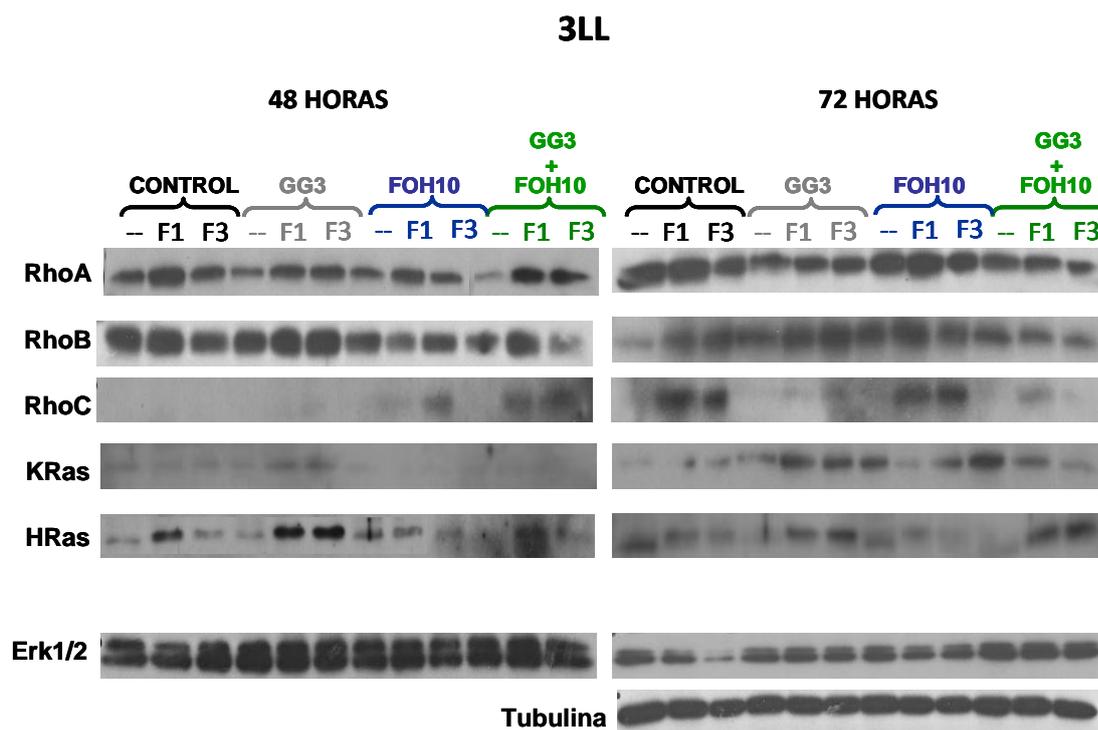


Figura 48. Efecto de la fluvastatina sobre la síntesis de proteínas de la superfamilia Ras totales. Las células 3LL se trataron durante 48 y 72 horas con 1 y 3 μ M de fluvastatina (F1 y F3 respectivamente) o con agua como control, en presencia o ausencia de 3 μ M de geranilgeraniol (GG3), 10 μ M de farnesol (FOH10), o ambos. Se cargó la misma cantidad de proteínas en todas las muestras. Posteriormente se separaron por electroforesis en función de su peso molecular y finalmente se detectaron mediante la unión a anticuerpos específicos. Los experimentos se realizaron tres veces con resultados muy similares.

Tanto a las 48 horas como a las 72 horas de tratamiento con la fluvastatina, el perfil es bastante similar de las MDA-MB-231 aunque aumento de la cantidad de RhoA y RhoB es más tenue aquí. En cambio la expresión de RhoC sigue un perfil diferente; es la proteína más minoritaria de Rho pero parece aumentar su cantidad respecto a las demás en las situaciones en las que realmente existe una inhibición de las funciones básicas o un deterioro celular, como en el tratamiento con 3 μ M de fluvastatina y FOH.

En las GTPasas Ras, K-Ras apenas es detectable mediante Western blot a las 48 horas, pero a las 72 horas el cotratamiento con GG aumenta su expresión, mientras que el FOH lo disminuye. Con ambos donadores de grupos prenilo hace que la expresión disminuya aunque menos que con FOH sólo. El mismo resultado con K-Ras a las 72 horas de tratamiento obtuvo con las células MDA-MB-231 (figura 47). La expresión de H-Ras también se ajusta a lo esperado de una proteína que exclusivamente se farnesila; a las 48 horas el cotratamiento con GG aumenta su expresión, en cambio el FOH la disminuye. A las 72 horas ocurre lo mismo, al igual que en las MDA-MB-231, salvo que la muestra tratada con 3 μ M de fluvastatina se encuentra lo suficientemente inhibida para observar un aumento de la expresión de H-Ras.

RESUMEN

- *La fluvastatina produce un aumento de la cantidad de las proteínas de la familia de Ras como consecuencia de la depleción del mevalonato. Su origen podría ser el aumento de la síntesis de éstas, la inhibición de su degradación o ambas.*
 - o *La familia Rho sólo recupera sus valores proteicos basales cuando se geranila.*
 - o *La cantidad de proteínas de la familia Ras vuelve a sus valores normales cuando estas vuelven a farnesilarse.*
 - o *La cantidad de K-Ras también disminuye en presencia de GG pero menos con GG y FOH juntos que sólo con FOH. Esto apunta a que en ausencia de los grupos farnesilo, la proteína se geranila alternativamente.*
- *A las 72 horas de tratamiento con fluvastatina (3 μ M) la cantidad de proteínas de la superfamilia Ras disminuye en vez de aumentar. Es posible que, a tiempos de tratamiento con la fluvastatina superiores a 48 horas, la inhibición transcripcional y traduccional impida la síntesis de estas proteínas.*

8.2. Estudio de la prenilación de las GTPasas de la superfamilia Ras.

Para determinar la prenilación de las proteínas Ras y Rho y, por tanto, si éstas se encuentran localizadas en el citosol celular, o ancladas a las membranas celulares a través de su grupo prenilo, realizamos una extracción con el detergente no iónico Tritón X-114 (TX-114). Así pudimos determinar si el tratamiento con la fluvastatina estaba afectando realmente a la prenilación de las diferentes GTPasas y si el contratamiento con los diferentes agonistas

de los productos del mevalonato (GG y FOH) era capaz de revertir esta inhibición de la prenilación de forma selectiva entre las distintas GTPasas.

Las proteínas integrales de membrana (como es el caso de las GTPasas Ras que se encuentran preniladas) tienen una estructura anfifílica, es decir, tienen una parte hidrofílica en contacto con el citosol, y un dominio hidrofóbico que se ancla a la bicapa lipídica. Mediante la solución con el TX-114 podemos extraer aquellas proteínas que se encuentran ancladas en la membrana y separarlas de las proteínas citosólicas (Bordier, 1981; Turner y cols, 2007). Durante el proceso de solubilización, el TX-114 consigue reemplazar a las moléculas lipídicas en contacto con el dominio hidrofóbico de la proteína integral de membrana, dando lugar a micelas formadas por detergente y proteínas de membrana. En cambio, las proteínas hidrofílicas localizadas en el citosol presentan mínima interacción con las micelas que forman los detergentes no iónicos.

Mediante la separación de proteínas con TX-114 obtuvimos 3 fracciones diferentes: la fase A, con las proteínas citosólicas de la muestra (entre las que se encontraban las proteínas de la familia de Ras no preniladas), la fase D, con las proteínas integradas en la membrana (y entre ellas las proteínas preniladas) y el lisado T, que equivale a la suma de ambas fases A y D, es decir, al extracto total de proteínas de cada muestra. A diferencia del punto anterior en el que determinábamos la cantidad total de proteínas de la superfamilia Ras mediante las fracciones T de esta separación, en estos experimentos las muestras no están normalizadas por la concentración proteica y, por lo tanto, en aquellos tratamientos en los que la inviabilidad o la inhibición de la proliferación es muy elevada (como a las 72 horas de tratamiento con 3 μ M de fluvastatina o en cotratamiento con farnesol 10 μ M), la cantidad de proteínas será indetectable por Western blot.

En la figura 49 observamos la distribución de las proteínas detectadas en las diferentes fracciones obtenidas en la separación y, por lo tanto, en las diferentes partes de la célula.

8.2.1. Estudio de las GTPasas Rho y Ras en las MDA-MB-231.

En condiciones basales, RhoA se encuentra casi totalmente anclado a la membrana (figura 49). El tratamiento con la fluvastatina produce un “desplazamiento” de las proteínas de RhoA de la fase D a la A, es decir, que las proteínas sintetizadas no se prenilan y se localizan en el citosol en vez de estar ancladas a la membrana. El cotratamiento con GG dona los grupos geranylgeranilo necesarios para la prenilación de RhoA, y éstas vuelven a estar mayoritariamente ancladas a la membrana. Aún así, tanto a las 48 como a las 72 horas de tratamiento, la administración de 3 μ M de GG no es suficiente para conseguir prenilar todas

las proteínas RhoA que se encuentran ancladas a la membrana en condiciones basales. Con FOH, en cambio, no se consigue evitar la falta de prenilación de RhoA. El cotratamiento con ambos donadores de grupos prenilo, GG y FOH, es muy similar al de GG solo, lo que confirma la hipótesis de que RhoA sólo se geranile y no se farnesile.

La discusión de estos resultados debe ser contextualizada con los obtenidos en el apartado anterior (8.1 de esta sección). Una hipótesis podría ser que la inhibición de la síntesis de GGPP por la fluvastatina impediría la geranilación del RhoA sintetizado de novo y, por tanto, este no se localizaría en la membrana. Así, RhoA no podría actuar como transductor en las diferentes cascadas de señalización en las que interviene. Como consecuencia, observaríamos los efectos sobre la célula descritos en los apartados anteriores. Para compensar las inhibiciones sobre las diferentes funciones cruciales para la célula, muy probablemente se produciría un aumento de la cantidad de RhoA mediante la activación de su transcripción y de la síntesis de novo y la disminución de su degradación (figura 47) (Holstein y cols., 2002; Turner y cols., 2007; Von Zee y cols., 2009). Pero éstas continuarían sin prenilarse y, a falta de los grupos geranilo, RhoA se localizaría en el citosol. El cotratamiento con GG que dona los grupos geranilo necesarios para la prenilación de RhoA le permitiría localizarse de nuevo en la membrana plasmática y se reduciría la síntesis de novo de RhoA, lo que se traduciría en una reversión de los efectos observados con la fluvastatina. El cotratamiento con FOH que dona grupos pero no se observa reversión alguna de las inhibiciones ejercidas por la fluvastatina ya que RhoA no se farnesila.

En las GTPasas Ras, cuya prenilación es la farnesilación, tanto K- como H-Ras se deslocalizan en presencia de fluvastatina y las proteínas aparecen en el citosol. Esta deslocalización es más tenue que en las proteínas de la familia de Rho. La posible explicación de que la farnesilación esté ligeramente menos afectada que la geranilación puede ser la diferente afinidad por el sustrato de las enzimas de la ruta del mevalonato que utilizan FPP (figura 10). La K_m de la farnesil transferasa (que incorpora el FPP a las proteínas) por el FPP es mucho menor que la K_m de la geranil-geranil difosfosintasa (la enzima que produce el GGPP a partir de FPP y que posteriormente utilizará la geranil-geranil transferasa para geranilar las proteínas) por el mismo sustrato. Esto significa que la afinidad de la farnesil transferasa por FPP es mucho mayor que la geranil-geranil difosfosintasa por el mismo. Por lo tanto, cuando los grupos isoprenoides están reducidos debido a las estatinas, la geranilación estará más afectada que la farnesilación (Turner y cols., 2007).

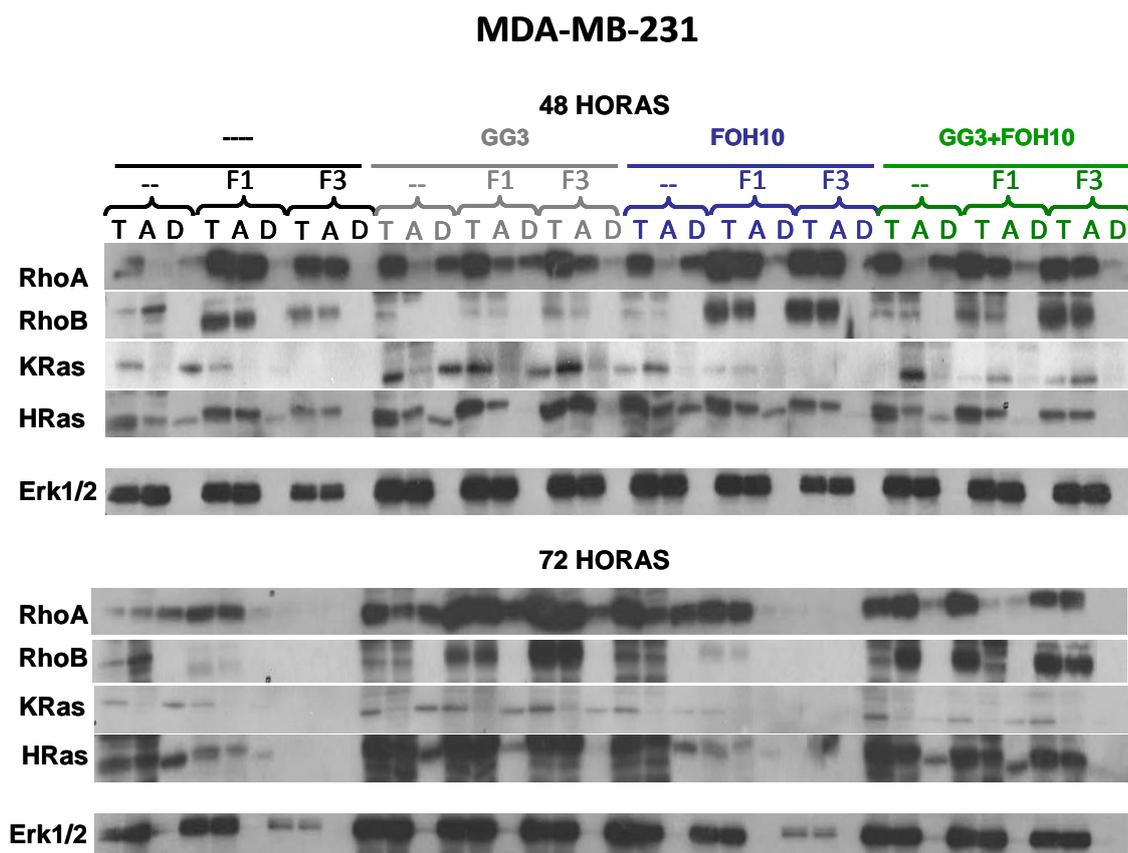


Figura 49. Distribución de las proteínas de la superfamilia Ras en los diferentes compartimentos celulares. Las células MDA-MB-231 se trataron durante 48 y 72 horas con 1 (F1) y 3 μ M (3) de fluvastatina o con agua como control, en presencia o ausencia de geranilgeraniol (3 μ M) (GG3), farnesol (10 μ M) (FOH10), o ambos, o etanol como control. Las proteínas se extrajeron con un búfer de lisis de TX-114 1%. “A” es la fase acuosa que sólo contiene proteínas citosólicas; “D” es la fase detergente que contiene las proteínas de membrana y “T” corresponde al lisado total formado por la mezcla de las fase “A” y “D”. Posteriormente se separaron por electroforesis en función de su peso molecular y finalmente se detectaron mediante la unión específica a anticuerpos específicos. Los experimentos se realizaron tres veces con resultados muy similares.

Hasta ahora hemos mantenido que K-Ras es capaz de geranilarse alternativamente en ausencia de su sustrato de prenilación principal FPP. En cambio, H-Ras exclusivamente se farnesila (Turner y cols., 2007). El cotratamiento con GG revierte ligeramente la unión a la membrana de K-Ras, no así de H-Ras. El cotratamiento con FOH, en cambio, actúa revirtiendo a ambas por igual. En general, la recuperación de las proteínas Ras con FOH es menos clara que las proteínas Rho con GG. Recordemos que, en este estudio y, a diferencia del apartado anterior (apartado 8.1), las muestras no están normalizadas por proteínas. Además, como hemos apuntado antes, a veces esta concentración de fluvastatina inhibe la proliferación (especialmente a las 72 horas de tratamiento) y la cantidad de proteínas que se encuentra en

cada una de las fracciones no es suficiente para ser detectable por Western blot. Esto se traduce en un “blot” más tenue en aquellas muestras más degradadas y con menos células.

8.2.2. Estudio de las GTPasas Rho y Ras en las 3LL.

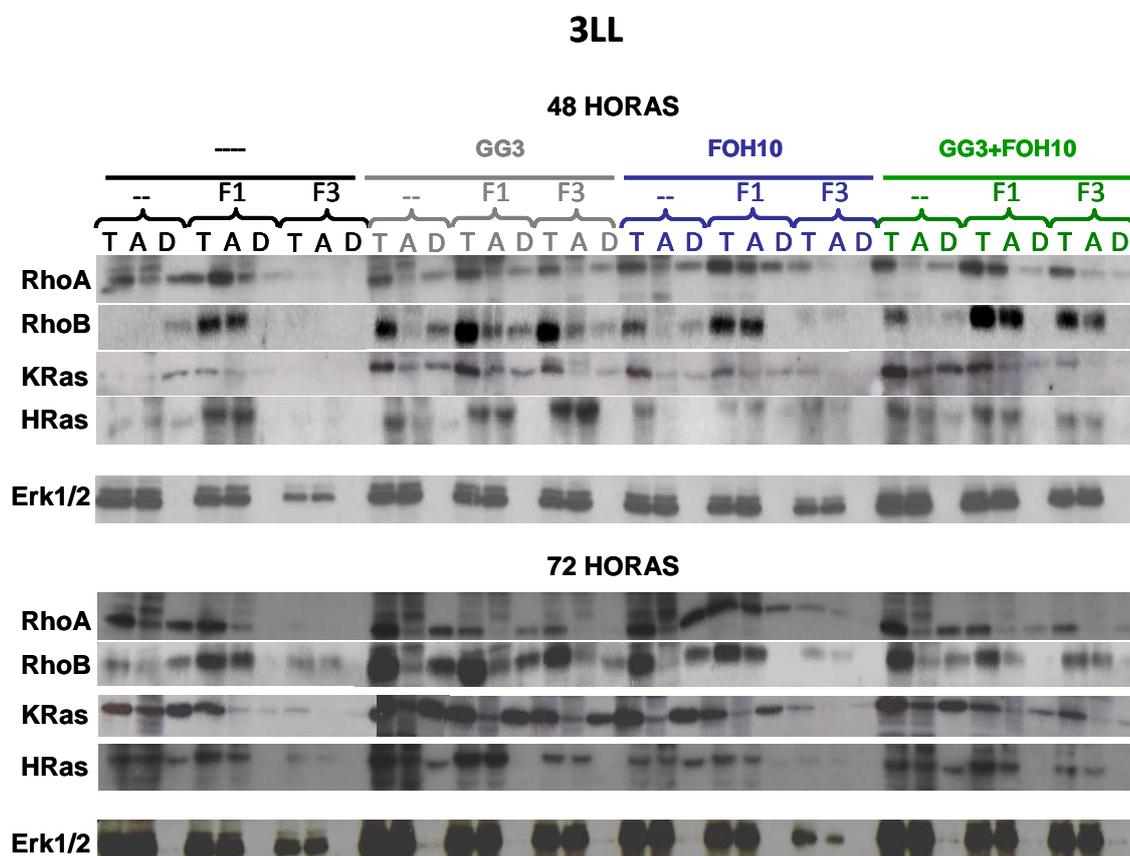


Figura 50. Distribución de las proteínas de la superfamilia Ras en los diferentes compartimentos celulares. Las células 3LL se trataron durante 48 y 72 horas con 1 (F1) y 3 μM (F3) de fluvastatina o con agua como control, en presencia o ausencia de geranilgeraniol (3 μM) (GG3), farnesol (10 μM) (FOH10), o ambos, o etanol como control. Las proteínas se extrajeron con un búfer de lisis de TX-114 1%. “A” es la fase acuosa que sólo contiene proteínas citosólicas; “D” es la fase detergente que contiene las proteínas de membrana y “T” corresponde al lisado total formado por la mezcla de las fase “A” y “D”. Posteriormente se separaron por electroforesis en función de su peso molecular y finalmente se detectaron mediante la unión específica a anticuerpos específicos. Los experimentos se realizaron tres veces con resultados muy similares.

En las 3LL (figura 50), el planteamiento descrito para las células MDA-MB-231 encaja para RhoA y RhoB, con la diferencia de que la deslocalización producida por la fluvastatina a la concentración de 1 μM no es tan acusada sobre todo a las 48 horas. Explicando estos resultados en conjunto con los resultados del apartado anterior (7.1 de esta sección) en los que mostrábamos la expresión proteica, podemos sugerir que la ligera deslocalización de las

proteínas de la familia de Rho hace que no se dispare tan dramáticamente la síntesis de novo de estas proteínas como en las MDA-MB-231 (figura 48). La explicación de la MDA-MB-231 también se ajusta a las GTPasas Ras; la falta de prenilación de K-Ras se restaura con ambos donadores, GG y FOH, mientras que la reversión exclusiva de H-Ras con FOH no es tan clara debido a la escasa cantidad de proteínas en estas muestras.

RESUMEN

- *La fluvastatina inhibe la prenilación de las GTPasas de de Ras: RhoA, B y C y H- y K-Ras en las MDA-MB-231 y 3LL. Como consecuencia de ello éstas se localizan en el citosol en vez de estar ancladas a la membrana plasmática por su grupo prenilo.*
- *RhoA vuela a localizarse en la membrana cuando se aportan los grupos necesarios para su geranilación en el cotratameinto con el GG, no así cuando se cotrata con FOH. Por tanto, RhoA sólo se geranila y no se farnesila.*
- *En las proteínas de la familia de Ras:*
 - o *K-Ras vuelve a prenilarse y, por tanto, a anclarse en la membrana al aportar tanto grupos geranilo como farnesilo, es decir, que puede farnesilarse y geranilarse.*
 - o *H-Ras sólo se vuelve localizar en la membrana cuando se restituye la farnesilación con el cotratamiento de FOH.*

8.3. Estudio de la activación de RhoA (RhoA-GTP).

Ya hemos explicado en la Introducción la regulación funcional de la familia de Ras. Estas GTPasas ciclan entre la forma activa unida a GTP y la forma inactiva unida a GDP. Para su activación requieren que la conformación inactiva se disocie y libere el GDP. Este es, generalmente, el paso limitante en el proceso de activación y es estimulado por los GEFs. Otra clase de reguladores conocidos son las proteínas GAPs, que previenen la activación prolongada de las GTPasas Ras (Konstantinopoulus y cols., 2007)(figura 23).

En la familia de Rho, existe un nivel adicional de regulación, llevado a cabo por las GDIs (del inglés, *Guanine nucleotide exchange Inhibitor*), que forman complejos solubles en el citoplasma con las GTPasas Rho preniladas e inactivas, es decir, unidas a GDP (Dransart y cols., 2005; Konstantinopoulus y cols., 2007). En general las GDI se unen a Rho-GDP para

bloquear el intercambio de GDP por GTP pero también se unen débilmente a Rho-GTP con un efecto inhibitorio en la actividad GTPasa intrínseca de la proteína.

El ciclo ambas proteínas (GEFs y GAPs) está continuamente *desregulado* en los procesos tumorales (Sahai y Marshall, 2002; Konstantinopoulus y cols., 2007). De hecho, a diferencia de las proteínas de la familia de Ras, no se han encontrado proteínas de Rho constitutivamente activas o mutadas en tumores humanos, aunque sí *sobreexpresadas*.

Muchos autores aseguran que las estatinas inhiben la señalización de Rho mediante el bloqueo de la activación de Rho (Eto y cols., 2002; Kusama y cols., 2003; Turner y cols., 2007). Estos estudios generalmente se llevaron a cabo a tiempos cortos (menos de 6 horas). En cambio, algunos autores realizaron los estudios a tiempos largos (24-48 horas) y obtuvieron resultados contrarios: las estatinas inducían un aumento de Rho-GTP, siendo este Rho activado no prenilado. Como explicación a esto se sugirieron que la unión de Rho a las GDIs era más débil cuando la proteína Rho no estaba prenilada. Esta disminución de la los complejos Rho-GDI hace que las GDIs no bloqueen la acción de las GEFs, aumentando así la activación de Rho (Turner y cols., 2007).

Con objeto de estudiar la activación de RhoA a un tiempo de tratamiento largo en el cual ya hemos observado los cambios en la proliferación, adhesión, expresión de la MEC, etc., realizamos los experimentos a las 72 horas. Para ello utilizamos el ELISA comercial G-LISA™ RhoA Activation Assay Biochem Kit™ (BK121, Cytoskeleton Inc.) (Engvall y cols., 1971; Voller y cols., 1978), que mide la activación de RhoA, es decir, la cantidad de RhoA unido a GTP. Este método solventa los inconvenientes del “pull-down” clásico realizado para determinar la actividad de la activación de Rho (ver sección Métodos, apartado 10). Este ELISA se basa en una proteína de unión a Rho-GTP que tapiza los pocillos de la placa. Así, el Rho-GTP de los lisados se une a los pocillos, mientras que el Rho-GDP se elimina con los lavados. La forma activa de RhoA se detecta gracias a un anticuerpo específico anti-RhoA, que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario unido a HRP. Así, se puede determinar cuantitativamente la cantidad de Rho activado mediante una reacción de quimioluminiscencia.

Analizando los resultados obtenidos en la figura 51, tanto en las MDA-MB-231 (a) como en las 3LL (b) el tratamiento con fluvastatina 3 μ M durante 72 horas disminuye la activación de RhoA. Resultados similares se han obtenido anteriormente para otras líneas celulares (Eto y cols., 2002; Kusama y cols., 2003). A pesar de que Turner y cols. observaron un aumento de la activación de Rho cuando éste no se encontraba prenilado con largos tiempos de tratamiento con estatinas (Turner y cols., 2007), nuestros resultados muestran lo contrario.

La clave podría encontrarse en la afinidad de las GEFs por RhoA en función de su asociación a las GDIs: las GEFs, encargadas de sustituir el GDP unido a Rho por GTP, actúan sobre las proteínas que se encuentran preniladas y ancladas a la membrana y, por tanto, no unidas a GDI (Tang y cols., 2008), por lo que cabría esperar que la inhibición de la prenilación disminuyera el recambio de GDP a GTP (Turner y cols., 2007; Eto y cols., 2002; Kusama y cols., 2003). El cotratamiento con GG revierte esta disminución de la activación de RhoA. Es interesante ver cómo, incluso a las 72 horas de tratamiento, tiempo en el que nuestras líneas tienen una alta inviabilidad celular, el GG sigue restaurando los valores basales de activación de RhoA. Se confirma de nuevo que RhoA se geranila y que el resultado geranilado es el que se localiza en la membrana (ver figuras 49 y 50) y, por lo tanto, puede activarse a través de las GEFs. En las células 3LL (figura 51 b), a pesar de que las diferencias no son estadísticamente significativas con respecto a su control tratado sólo con GG, la restauración no llega a ser tan completa como en las MDA-MB-231 (figura 51 a).

El tratamiento con FOH, en cambio, no modifica la inactivación de RhoA producida por la fluvastatina. Y, de nuevo hay ligeras divergencias entre nuestras estirpes celulares, ya que en las 3LL (figura 51 b), aunque la diferencia sigue sin ser estadísticamente significativa, existe una mínima restauración de la activación de RhoA, algo que no se observa en las MDA-MB-231. El cotratamiento con ambos donadores de grupos isopropilo no modifica la restauración de la activación de RhoA que se observa sólo con GG. Por lo tanto, aporte exógeno de los grupos geranilgeranilo, y no de los grupos farnesilo, protegería de la inactivación RhoA cuando existe *depleción* de los sustratos derivados del mevalonato.

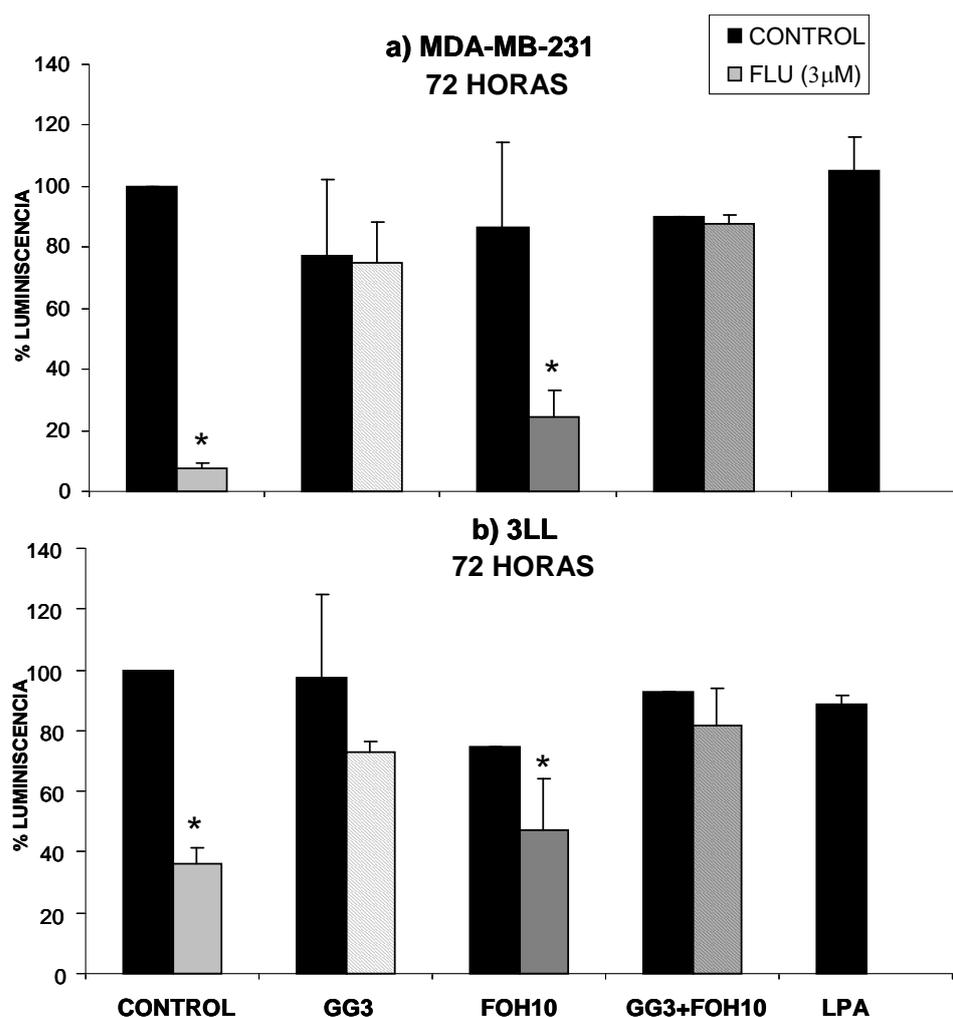


Figura 51. Activación de RhoA (RhoA-GTP) en las células MDA-MB-231(a) y 3LL (b) a las 72 horas de tratamiento con 3 µM de fluvastatina (FLU3), en presencia o ausencia de 3 µM de gernanilgeraniol (GG3), 10 µM de farnesol (FOH10) o ambos a la vez. La unión de RhoA a GTP se cuantificó mediante el ELISA G-LISA™ RhoA Activation Assay Biochem Kit™ a través de una reacción final de quimioluminiscencia. Como control positivo tratamos a las células con 1 µg/mL de ácido lisofosfatídico (LPA) durante 2 minutos. Los experimentos se realizaron dos veces por duplicado. Los datos se expresan como porcentaje de las medias ± D.E. dando al control el valor de 100%. * p < 0,05 con respecto cada control no tratado con fluvastatina.

Es importante tener en cuenta que el ELISA que utilizamos normaliza los lisados proteicos en función de la concentración de proteínas que existe en cada muestra pero, como ya hemos visto en el apartado 7.1 (figuras 47 y 48) la cantidad de RhoA varía en función del tipo y tiempo de tratamiento. Por ello, para ver el grado de unión de RhoA a GTP normalizamos las cuentas de luz obtenidas en el ELISA por la cantidad de proteínas de RhoA medidas mediante cuantificación de la densidad óptica de las bandas obtenidas para RhoA en el Western blot de las figuras 47 y 48 mediante el programa informático Scion Image. De esta

manera tuvimos la relación entre RhoA-GTP y RhoA total dando como valor 1 al ratio obtenido en las condiciones basales. La figura 52 muestra la medida de RhoA-GTP normalizado por la cantidad de RhoA cuantificado en cada muestra. La activación de RhoA apenas varía de los valores no normalizados (figura 49) y la discusión de éstos podría extrapolarse aquí.

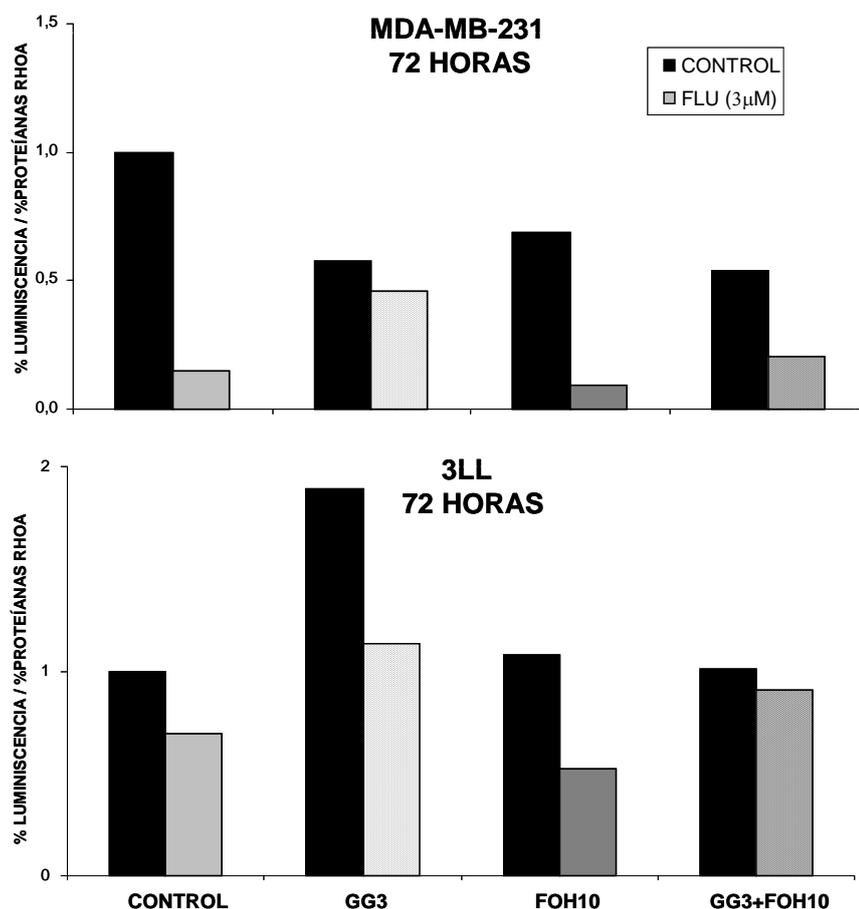


Figura 52. Activación de RhoA (RhoA-GTP) normalizado por la cantidad de proteínas RhoA en las células MDA-MB-231 y 3LL a las 72 horas de tratamiento con 3 µM de fluvastatina (FLU3), en presencia o ausencia de 3 µM de gernanilgeraniol (GG3), 10 µM de farnesol (FOH10) o ambos a la vez. La unión de RhoA a GTP se cuantificó mediante el ELISA G-LISA™ RhoA Activation Assay Biochem Kit™ a través de una reacción final de quimioluminiscencia. La cuantificación de las proteínas de RhoA determinó por la densidad óptica de las bandas obtenidas en los Western blots normalizados por proteínas a través del programa informático Scion Image. Los experimentos se realizaron dos veces por duplicado. Los datos se expresan como porcentaje de las medias / porcentaje de la cantidad de RhoA con respecto al control.

Unificando los resultados del apartado 8, resumimos que la fluvastatina produce en las líneas celulares de cáncer MDA-MB-231 y 3LL una inhibición de la prenilación de las GTPasas

de la superfamilia Ras, lo que supone una deslocalización de las formas no preniladas en el citosol y una inhibición de la activación de RhoA. Como consecuencia de la falta de estos transductores anclados a la membrana plasmática, la célula aumenta la síntesis de proteínas de novo o inhibe su degradación, o ambos. El resultado final es una mayor cantidad de proteínas de la familia de Ras no preniladas, deslocalizadas en el citosol e inactivas, es decir unidas a GDP; ya que al menos en el caso de RhoA, los GEFs no pueden actuar favoreciendo el intercambio de GDP por GTP debido a la ausencia de éstas en la membrana.

RESUMEN

- *La fluvastatina inhibe la activación de RhoA (RhoA-GTP) en las líneas tumorales MDA-MB-231 y 3LL a las 72 horas de tratamiento.*
- *El GG revierte la inactivación de RhoA totalmente en las MDA-MB-231 y parcialmente en las 3LL. La restitución de la geranilación permite la localización de RhoA en la membrana y su separación de GDI. Esto podría favorecer que las GEFs actúen sustituyendo el GDP unido a RhoA por GTP.*
- *El FOH no recupera la activación basal de RhoA, aunque sí existe una mínima recuperación en las 3LL. Esto sugiere que la farnesilación no es capaz de restaurar la localización de RhoA en la membrana y por tanto no permite la acción de las GEFs sobre el ciclo GDP-GTP.*

9. PAPEL DEL EFECTOR DE RHOA, RHO KINASA (ROCK) EN LAS CÉLULAS TUMORALES MDA-MB-231 Y 3LL.

Ya hemos comentado a lo largo de todo este trabajo que la familia de las pequeñas GTPasas de Rho actúan como transductores de procesos celulares a través de rutas de señalización celular lo que relacionamos con la morfogénesis, la adhesión, la migración, la progresión del ciclo celular, la citocinesis, etc. (Narumiya y cols., 2009).

Como hemos explicado en la Introducción, RhoA, RhoB y RhoC comparten el mismo grupo de efectores. El principal efector estudiado es ROCK (del inglés *Rho associated coiled-coil forming kinase*) también llamado Rho kinasa que es activado principalmente por RhoA. Para ello, Rho debe estar unido a GTP, es decir, activo y, por lo tanto, debe localizarse en la membrana plasmática. Rho-GTP estimula la actividad serina/treonina kinasa de ROCK. ROCK tiene un papel muy importante en muchos fenómenos celulares como la proliferación,

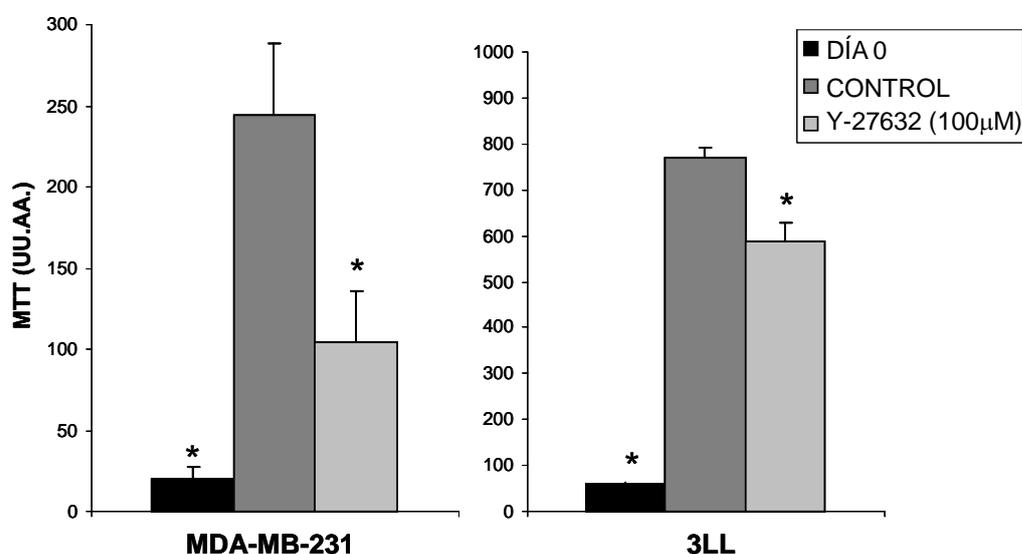
la progresión del ciclo celular, la formación de fibras de estrés, la motilidad, la migración, la invasividad e incluso la transformación oncogénica. Debido a la importancia de estas funciones y a su especial implicación en la regulación del citoesqueleto y de la adhesión celular, hemos investigado el papel de ROCK en la proliferación, adhesión celular y expresión de la MEC. En caso de que ROCK intervenga en estas acciones, la fluvastatina podría tener como diana su inactivación, debida a la inhibición de la prenilación de Rho ya probada (apartado 8.2). Para ello se trataron con el inhibidor de ROCK Y-27632 (dihidrocloruro de (+)-(R)-trans-4-(1-aminoetil)-N-4-piridil ciclohexancarbox-amida). Éste es el fármaco inhibidor de ROCK más empleado experimentalmente e inhibe los dos tipos de ROCK (ROCK-1 y ROCK-2) con constantes de inhibición similares ($K_i = 0.22 \mu\text{M}$ y $0.30 \mu\text{M}$, respectivamente) (Itoh y cols., 1999; Somlyo y cols., 2003; Sommer y Carvajal, 2009). La concentración de Y-27632 utilizada se determinó previa revisión bibliográfica y realizando una titulación con diluciones seriadas del fármaco en estudios piloto (datos no mostrados). Con estas consideraciones elegimos la concentración $100 \mu\text{M}$.

9.1. Papel de ROCK en la proliferación de las células MDA-MB-231 y 3LL.

En la figura 53 observamos que el inhibidor de ROCK Y-27632 inhibe la proliferación de ambas líneas celulares, lo que indica la implicación de ROCK en la actividad proliferante. Así, probablemente la fluvastatina inhibe la activación de ROCK mediante la inhibición de la activación de Rho.

Pero en la proliferación no sólo interviene ROCK, también son importantes otros efectores de Rho y Ras como mDia (Diaphanous 1) o PAK (p21-Activated Kinasa). Por ejemplo, la parada en G₀/G₁ que producen las estatinas es debida a la inducción de la síntesis de los inhibidores dependientes de kinasas (CDKs), relacionados con la transición del ciclo celular de la fase G₁ a la S (Denoyelle y cols., 2001; Zhang y cols., 2009) y se ha demostrado que RhoA es la principal proteína de la superfamilia de Ras encargada de regular el ciclo celular en las células tumorales (Weber y cols., 1997; Olson y cols., 1998; Sahai y Marshall, 2002; Zhang y cols., 2009). RhoA actúa sobre su efector ROCK regulando la síntesis de los inhibidores de ciclo celular INK4 (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}), pero sobre mDia regulando la acumulación de las proteínas de la familia Cip/Kip (p21^{Waf1/Cip1} y p27^{Kip1}). Además, ya se ha descrito que la proliferación celular sigue existiendo a falta de actuación de ROCK, mediante la actuación del efector mDia, o incluso a través de la acción de Rac1 y Cdc42 sobre la ruta de

las MAPKs (Narumiya y cols., 2009; Zhang y cols., 2009). Por lo tanto, cabe pensar que la fluvastatina inhibe la activación de todos los efectores de Rho implicados en la proliferación.



*Figura 53. Acción de ROCK en la proliferación de las células MDA-MB-231 y 3LL. Proliferación celular evaluada mediante la técnica del MTT, tras el tratamiento durante 72 horas con del inhibidor de ROCK Y-27632 (100 µM) o agua como control. Los experimentos se realizaron tres veces. Los datos se expresan como medias de los porcentajes ± D.E. dando al control el valor del 100%. *: $p < 0,05$ con respecto al control. UU.AA: unidades arbitrarias.*

9.2 Papel de ROCK en la adhesión celular de las células MDA-MB-231 y 3LL.

En la figura 54 se puede observar que el tratamiento con el inhibidor de ROCK Y-27632 por sí solo produce un cambio morfológico de la célula, no relacionado con la pérdida de la adhesión celular observado anteriormente con el tratamiento con fluvastatina (apartado 3 de Resultados y Discusión). Esto sugiere que la inhibición de la adhesión producida por la fluvastatina no es debida a la inhibición del efector ROCK, aunque éste produzca modificaciones del citoesqueleto relacionadas con la forma celular (Núñez y cols., 2010). Puesto que la pérdida de adhesión se revierte con el aporte de GG, la adhesión debe estar mediada por la otro efector de Rho que no sea ROCK, como mDia, o cualquier otro efector de alguna GTPasa que se geranile.

Al analizar el mecanismo de acción, se demostró que la señalización activada por Rho a través del efector mDia1 daba lugar a las activación de Rac y la posterior fosforilación de del complejo Cas/Crk/DOCK180. Precisamente este complejo es inhibido por ROCK. Por tanto, en este caso, ambos efectores de Rho, ROCK y mDia, tienen efectos antagónicos y el balance entre ambos determina la forma y el patrón de las fibras de estrés. Cuando inhibimos ROCK

con el tratamiento con Y-27632, la acción estimulante de mDia se mantendría y la célula adquiriría esta morfología estrellada.

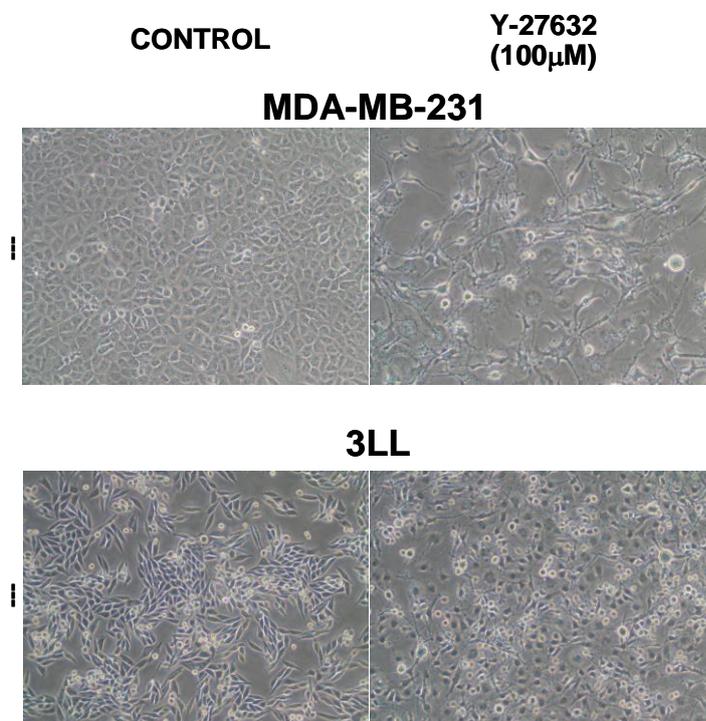


Figura 54. Acción de ROCK en el fenotipo de las células MDA-MB-231 y 3LL. Las células fueron tratadas durante 72 horas con el inhibidor de la ROCK Y-27632 (100 μ M) o agua mQ como control tras lo cual fueron fotografiadas a través de un microscopio invertido con contraste de fases (x200). La figura muestra imágenes representativas de tres experimentos independientes.

9.3. Papel de ROCK en expresión de la matriz extracelular de las células MDA-MB-231 y 3LL.

La figura 55 muestra que la inhibición de ROCK con Y-27632 no produce una inhibición de la expresión de los elementos de la matriz extracelular (MEC) a diferencia del tratamiento con la fluvastatina (apartado 7 de esta sección). Esto demuestra que ROCK no interviene en la expresión de la MEC y que la MEC cuya expresión disminuye por la fluvastatina está controlada por otro efector de Rho, como mDia, o por otro transductor diferente de Rho pero que también se geranile.

Los dos efectores principales de Rho, ROCK y mDia, tienen muchas funciones antagónicas en multitud de procesos (Arakawa y cols., 2003; Narumiya y cols., 2009). En la Introducción hemos ejemplificado este antagonismo con la activación/inhibición de Rac así como la ruptura/formación de las uniones adherentes. El balance de la actividad de ambos

determinará el resultado final. Es posible que la inhibición de ROCK *desregule* este balance y la acción de mDia o de cualquier otro efector de la superfamilia Ras se vea destacada.

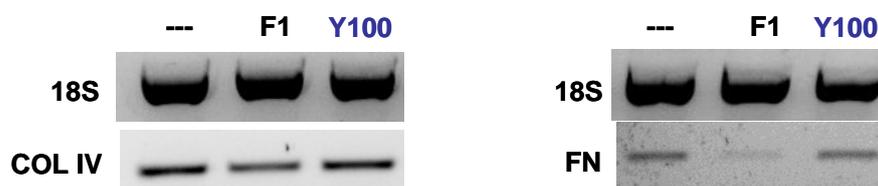


Figura 53. Implicación de ROCK en la expresión de genes de la MEC en células MDA-MB-231 y 3LL. Las células fueron tratadas durante 72 horas con 1 μ M de fluvastatina (F1), con el inhibidor de ROCK Y-27632 (100 μ M) o agua como control (-). Se utilizó como control de expresión el gen 18S ribosómico. Los experimentos se realizaron dos veces y se obtuvieron resultados similares. 18S: subunidad ribosómica 18S; COL IV: colágeno IV; FN: fibronectina.

En resumen, los experimentos con el inhibidor de ROCK Y-27632, sugieren que éste efector interviene en la proliferación de las células MDA-MB-231 y 3LL, lo que sugiere que, en condiciones normales, ROCK actúa como efector de esta función. En cambio, Y-27632 no produce cambios en la adhesión al sustrato ni en la expresión de los elementos de la MEC.

RESUMEN

- El tratamiento con el inhibidor de ROCK Y-27632, disminuye la proliferación, lo que indica que, en condiciones normales, ROCK interviene en este proceso.
- En cambio, Y-27632 no modifica la adhesión al sustrato ni la expresión de la MEC, por lo que estas acciones no se llevan a cabo a través de este efector.
- Es posible que la adhesión y la expresión MEC sea reguladas por otros efectores de Rho, p.e. mDia, o por otro transductor que se genere.

10. ACCIÓN DE LA *SOBREEXPRESIÓN* DE RHOA CONSTITUTIVAMENTE ACTIVO (RHOA-Q63L) SOBRE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LA FLUVASTATINA.

La relación entre la actividad de RhoA (y la familia de Rho en general) y su prenilación o localización en la membrana plasmática es un punto que suscita controversia. El tratamiento con las estatinas impide que se generen los sustratos necesarios para la prenilación de las proteínas de la superfamilia de Ras, y la falta de prenilación impide que éstas adquieran la hidrofobicidad necesaria para anclarse a la membrana plasmática. Por ello, no pueden llevar a cabo sus principales funciones como transductores en la membrana. Pero se ha demostrado que tanto RhoA como RhoB no preniladas pueden tener una función parcial en el citoplasma y núcleo, manteniendo su actividad transcripcional, aunque no tan eficientemente como si estuvieran prenilados (Lebowitz y cols., 1997; Allal y cols., 2000; Turner y cols., 2007).

Para conocer la importancia de la actividad nuclear de Rho sobre las acciones estudiadas anteriormente por la fluvastatina, infectamos a las células MDA-MB-231 con un plásmido que expresaba una proteína de fusión EGFP-RhoA(Q63L). RhoA(Q63L) es la proteína RhoA con una mutación en la glutamina 63 que supone su intercambio por una leucina. Este cambio se produce en el llamado *bolsillo de unión al nucleótido*, donde se localiza el fosfato γ del GTP, lo que disminuye la capacidad de la propia GTPasa de disociar este fosfato y de pasar, por tanto, al estado inactivo (RhoA-GDP). Así, la actividad de las GAPs se ve comprometida. Consecuentemente, la cantidad de Rho-GDI es drásticamente menor que en las células infectadas con el plásmido control y, además, este GDI a veces se une a Rho-GTP, algo que no ocurre en condiciones basales (Longenecker y cols., 2003).

Para comparar los resultados obtenidos en todas las muestras infectadas con el vector que generaba la proteína de fusión EGFP-RhoA(Q63L) y evitar atribuir acciones derivadas de la infección a la presencia de RhoA(Q63L), utilizamos una población de células infectadas con el plásmido vacío obtenido a partir del vector pEGFP-C1, que únicamente expresaba EGFP. Además, ambos vectores poseen el gen de resistencia a la puromicina, lo que nos permitió seleccionar aquellas células se habían infectado mediante el tratamiento con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina.

Para los experimentos elegimos una población de células infectadas con el vector “control” y dos poblaciones infectadas con la construcción de estudio (que, a su vez, las llamamos poblaciones “A” y “B”). La eficacia de la clonación en cada población superó el 95%. Prácticamente todas las células mostraron fluorescencia verde al ser excitadas con luz

ultravioleta, algo característico de la proteína EGFP (figura 56). En los clones A y B, aunque eran fluorescentes, cabía la posibilidad de que el plásmido estuviera truncado y, por tanto la proteína de fusión sólo expresara EGFP y parte de la cadena de RhoA(Q63L), que se traduciría en una proteína de fusión formada por EGFP y una secuencia de aminoácidos no correspondiente a RhoA(Q63L). Para asegurarnos de la integridad del mensajero de la proteína de fusión, realizamos una RT-PCR utilizando los oligonucleótidos que en 5' se unieran a la EGFP y en 3' se unieran una región del extremo del gen codificante de RhoA(Q63L). Como vemos en la figura 57 tanto la población A como B dieron positivo, en cambio, como era de esperar, la población infectada con el plásmido control (que sólo expresa la proteína EGFP) y las células MDA-MB-231 no infectadas dieron negativo.

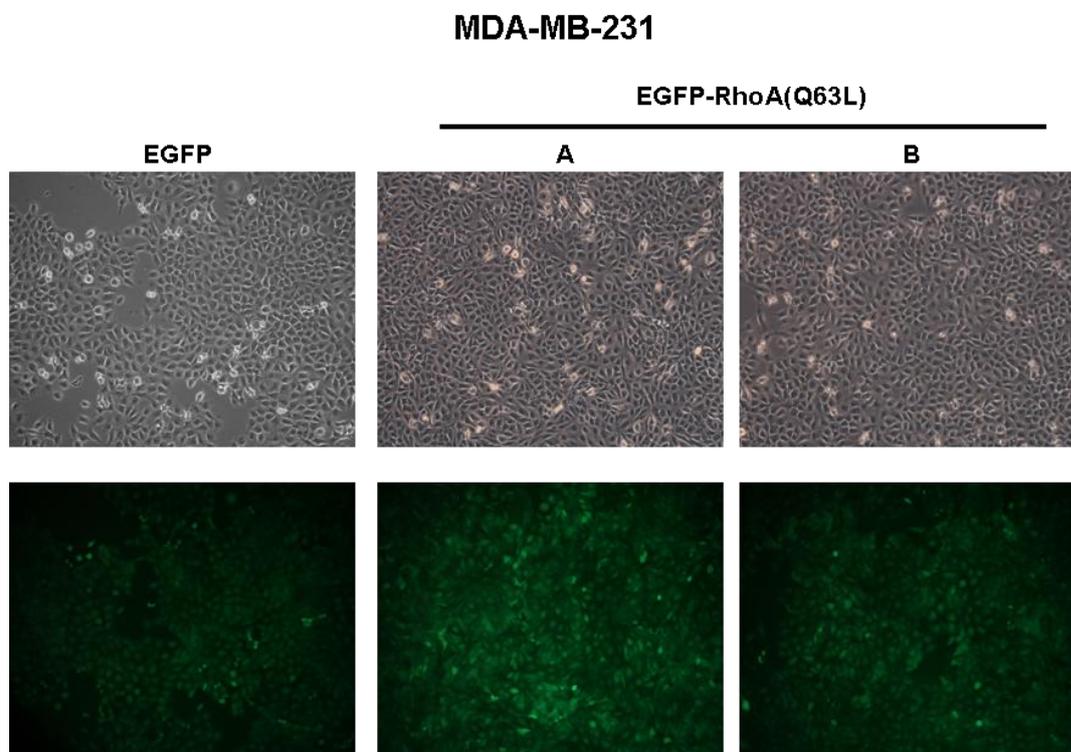


Figura 56. Fenotipo y fluorescencia de las células MDA-MB-231 infectadas con el vector “control” (pEGFP-C1) o el plásmido EGFP-RhoA(Q63L) (poblaciones A y B). Las células infectadas fueron seleccionadas mediante el tratamiento con puomicina (1 µg/mL) y posterior dilución límite. Las fotografías (x200) se hicieron a través de un microscopio de fluorescencia invertido.

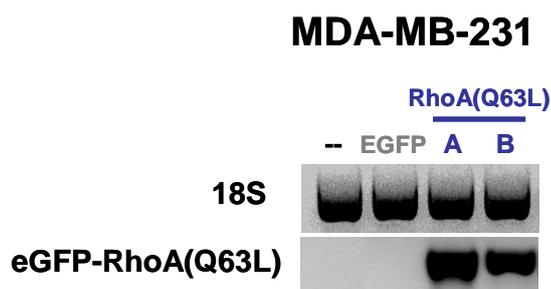


Figura 57. Expresión de la construcción génica EGFP-RhoA(Q63L) en células MDA-MB-231. Las células fueron infectadas con el vector EGFP-RhoA(Q63L) en las poblaciones A y B. Los controles negativos son las células no infectadas (-) y las infectadas con el vector vacío “control” (EGFP). Se utilizó como control de carga de ADNc la expresión del gen “housekeeping” 18S ribosómico (18S).

RhoA(Q63L), a pesar de estar mutado, sí necesita la prenilación para su correcta localización: las células infectadas con RhoA(Q63L) y tratadas con fluvastatina van tener más cantidad de RhoA activado (unido a GTP) y menos asociado a GDI, pero este RhoA activado no estará prenilado y, por tanto, se localizará en el citosol y no en la membrana. Así, las células infectadas y tratadas con la estatina tendrán más actividad en las actividades nucleares de RhoA sobre la transcripción de elementos de respuesta a sustrato (SRE) con respecto a las células infectadas con el plásmido control, pero la misma actividad localizada en la membrana. Por ello las poblaciones A y B son una buena herramienta para probar si hay cambios en las acciones sobre la proliferación, adhesión y expresión de los elementos de la MEC producidos por la fluvastatina sobre las MDA-MB-231. Si RhoA(Q63L) produjera una “protección” en estos cambios significaría que las acciones nucleares de RhoA-GTP no prenilado son importantes para la realización de estas funciones celulares y que el mecanismo de acción de la fluvastatina actúa inhibiendo las actividades de RhoA no prenilado y activo en el citosol. Si, por el contrario, la infección de RhoA(Q63L) no revierte los efectos de la fluvastatina, las actuaciones nucleares de RhoA no serían importantes para estos procesos.

10.1. Acción de RhoA(Q63L) en la inhibición de la proliferación producida por la fluvastatina.

La figura 58 a) muestra un experimento representativo en el que hemos tratado con fluvastatina tanto a las células MDA-MB-231 no infectadas (-), las infectadas con el vector vacío (EGFP) y con la construcción de estudio que expresa RhoA constitutivamente activo, RhoA(Q63L). Existe una ligera disminución de la proliferación en las células no infectadas y

no tratadas con respecto a las infectadas con algún tipo de vector, que es fruto de la manipulación a la que las células son sometidas. El tratamiento con fluvastatina no parece mostrar diferencias entre las distintas poblaciones celulares. Como podemos ver en la figura 58 b), en la que se representa el porcentaje de proliferación con respecto al control de cada periodo de tiempo (48 y 72 horas), la inhibición producida por la fluvastatina apenas varía entre las células controles (no infectadas), las infectadas con el vector vacío “control” y en las poblaciones A y B infectadas con el plásmido que expresa la proteína de fusión EGFP-RhoA(Q63L). Parece ser que la presencia de RhoA activado constitutivamente pero localizado en el citosol debido a la inhibición de su prenilación por acción de la fluvastatina, no revierte la inhibición de la proliferación ejercida por la ésta.

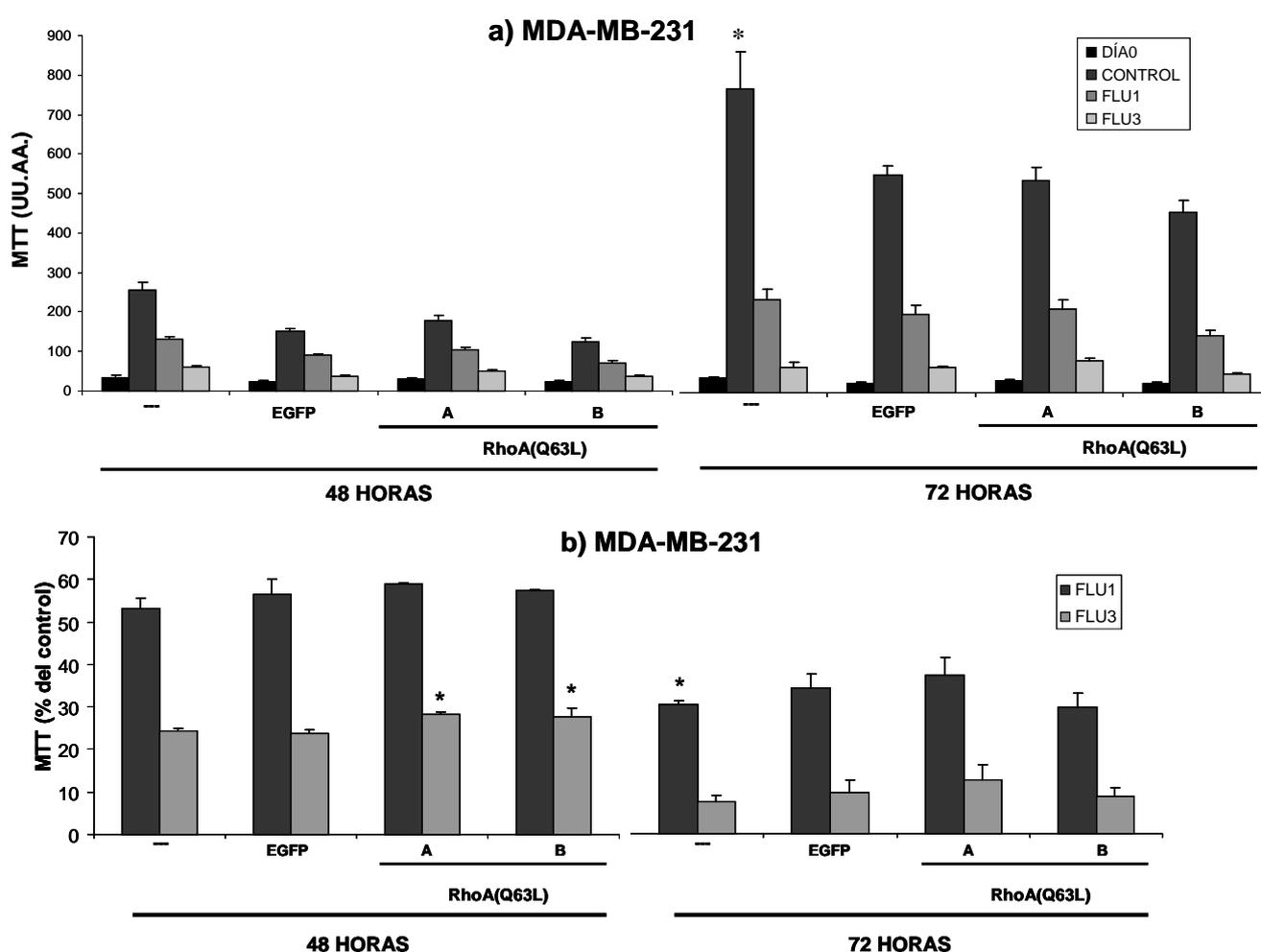


Figura 58. Efecto antiproliferante de la fluvastatina en las células MDA-MB-231 no infectadas (--), infectadas con el vector vacío (EGFP) o con la construcción RhoA(Q63L). Proliferación celular evaluada mediante la técnica del MTT, tras el tratamiento durante 48 y 72 horas con fluvastatina 1 μ M (FLU1) o 3 μ M (FLU3) o agua como control. Los experimentos se realizaron tres veces. a) Los datos muestran un experimento representativo y se expresan como media \pm D.E. U.U.AA: Unidades arbitrarias b) Los datos se expresan como medias de los porcentajes \pm D.E. dando al control de cada periodo el valor de 100%. * $p < 0,05$ con respecto al control de infección (EGFP) de cada tratamiento de cada periodo.

10.2. Acción de RhoA(Q63L) en la inhibición de la adhesión producida por la fluvastatina.

Las fotografías de la figura 59 revelan, primero, que no existen diferencias fenotípicas entre las células no infectadas y las células infectadas. Además, tampoco se observan diferencias entre las células infectadas sin tratar, ya sea con el plásmido vacío (EGFP) como con el plásmido que expresa la proteína de fusión EGFP-RhoA(Q63L), algo que ya se observaba en la figura 56. Es decir, que en condiciones basales el aumento de RhoA activo en el citosol no supone ningún cambio fenotípico ni relacionado con la adhesión.

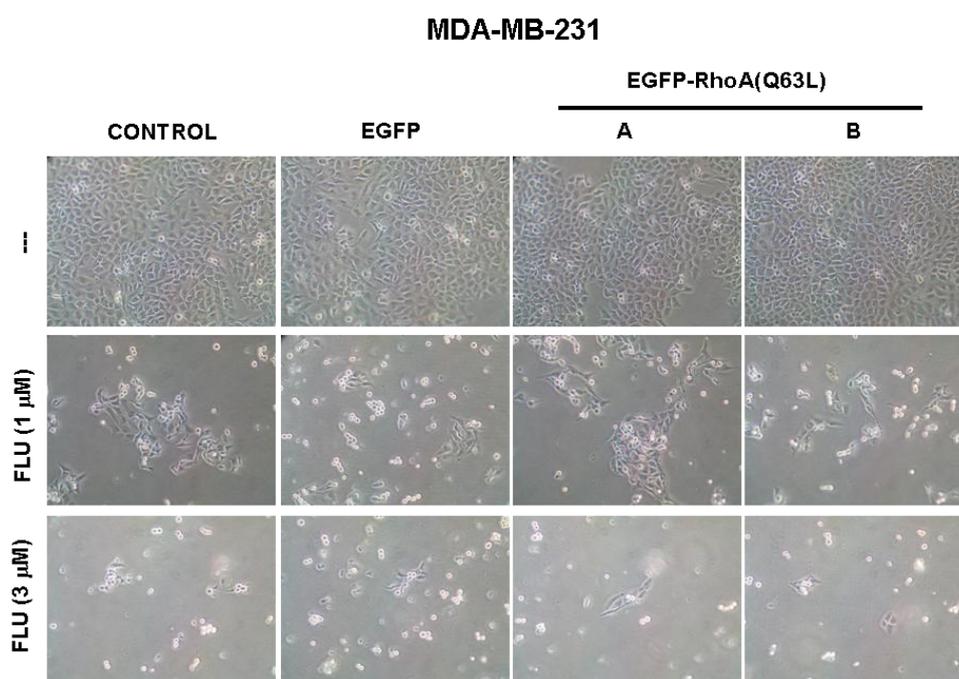


Figura 59. Efecto sobre la adhesión de la fluvastatina (1 y 3 μ M) en las células MDA-MB-231 infectadas con el vector “control” (EGFP), la construcción EGFP-RhoA(Q63L) (poblaciones A y B) o sin infectar (CONTROL). Las células fueron tratadas durante 72 horas con 1 y 3 μ M de fluvastatina (FLU) o agua. Las fotografías se realizaron con un microscopio invertido con contraste de fases (x200).

Cuando tratamos todas las poblaciones celulares con la fluvastatina (figura 59) no observamos ningún cambio reseñable en la inhibición de la adhesión producida por la estatina. Es decir, el hecho de que la célula tenga más RhoA activo en el citosol no la protege de la pérdida de la adhesión. Esto sugiere que la localización de RhoA anclado a la membrana es más importante para la proliferación y adhesión que la propia la inhibición de la activación.

10.3. Acción de RhoA(Q63L) en la inhibición de la expresión de los elementos de la MEC producida por la fluvastatina.

Si comparamos la expresión de la MEC en las células no infectadas (control) y en las células infectadas (figura 60) vemos que la infección no modifica la expresión génica de los elementos de la MEC. Además, comparando la expresión basal de las dos poblaciones A y B de las células infectadas con EGFP-RhoA(Q63L) con la infectada con el vector vacío, observamos que la expresión no varía por el hecho aumentar el nivel de RhoA activo citosólico. Por tanto, la presencia de RhoA constitutivamente activo localizado en el citosol no modifica la inhibición de la expresión de los elementos de la matriz que produce el tratamiento con la estatina. Esto sugiere que la expresión de la MEC no depende de las acciones de RhoA sobre la activación de la transcripción, sino que depende de la actividad de RhoA en la membrana como transductor de señales a sus efectores.



Figura 60. Efecto de la fluvastatina a las 48 y 72 horas de tratamiento en la expresión de los elementos de la MEC colágeno I, colágeno IV y fibronectina, en las células MDA-MB-231 infectadas con el vector control (EGFP), la construcción EGFP-RhoA(Q63L) (poblaciones A y B) o sin infectar (Control), determinada por RT-PCR. Las células fueron tratadas durante 48 y 72 horas con 1 μ M (F1) y 3 μ M (F3) de fluvastatina con agua como control (-). Se utilizó como control de carga de ADNc la expresión del gen “housekeeping” 18S ribosómico. Los experimentos se realizaron tres veces y se muestra uno representativo. 18S: subunidad ribosómica 18S; COL I: colágeno I; COL IV: colágeno IV; FN: Fibronectina.

En resumen, ya que muchos autores han señalado la posibilidad de que Rho no prenilado pudiera tener una funcionalidad parcial en el núcleo, manteniendo su actividad transcripcional, aunque no tan eficientemente como los análogos prenilados (Lebowitz y cols., 1997; Allal y cols., 2000; Turner y cols., 2007) y de que las moléculas de Rho puedan activarse incluso sin estar preniladas (Turner y cols., 2007), nos pareció interesante estudiar este

aspecto de la regulación de Rho. La infección de las células MDA-MB-231, línea de cáncer que ya de por sí tiene *sobreexpresado* RhoA, con un mutante de RhoA activo constitutivamente (RhoA (Q63L)), permitió aportar a la célula una cantidad de RhoA-GTP que, en presencia de la fluvastatina, también se encontraría sin prenilar y localizado en el citosol. Así, reforzando la actividad transcripcional, pudimos estudiar si se revertían los efectos producidos por la fluvastatina sobre varias funciones celulares.

La conclusión final de este apartado es que la actividad transcripcional de RhoA en el núcleo no es importante para las funciones estudiadas: proliferación, adhesión celular y expresión de algunos elementos de la MEC. Probablemente, estas funciones dependen más de la adecuada localización de Rho anclado a la membrana plasmática y de las funciones de transducción celular en respuesta a señales y, por tanto, de la activación de determinados efectores de Rho. Hodge y cols. también observaron que la proliferación y la invasión celular no se modificaba al transfectarles este mutante RhoA(Q63L) en una línea celular humana de cáncer de próstata (Hodge y cols., 2003).

RESUMEN

- *Infectamos a las MDA-MB-231 con una construcción que expresaba la proteína de fusión EGFP-RhoA(Q63L) para estudiar la importancia de la actividad transcripcional de RhoA en el núcleo.*
- *RhoA(Q63L) es una mutación de RhoA con una mayor afinidad por el GTP. Por tanto, será activo constitutivamente aunque, al igual que la proteína nativa, necesita prenilarse para anclarse a la membrana.*
- *La infección con el vector EGFP-RhoA(Q63L) no modificó la inhibición sobre la proliferación, la adhesión y la expresión de la MEC producida por la fluvastatina.*
- *Esto significa que la actividad transcripcional de RhoA no es importante para realizar estas funciones y que el mecanismo de acción de la fluvastatina no se basa en la inhibición las actividades nucleares de RhoA.*

El principal objetivo de esta tesis fue conocer el efecto antifibrótico que las estatinas podían ejercer sobre los tumores sólidos, dados sus efectos en otros órganos (Takemoto y Liao, 2001; Buemi y cols, 2002; Tandon y cols, 2004). Cabe destacar la importancia de esta acción, ya que, en caso afirmativo, supondría el uso de las estatinas como un coadyuvante que disminuyera la fibrosis tumoral y, por tanto, que permitieran el acceso de las inmunotoxinas tumorales a su diana, algo imposible en el escenario real de un tumor sólido por su alto peso molecular.

En las líneas tumorales de estudio, MDA-MB-231 y 3LL, la fluvastatina inhibió la expresión de los elementos de la MEC, colágeno I, colágeno IV y fibronectina de forma dependiente de la concentración (figura 44). Además, se demostró que esta acción es específica porque la expresión de la subunidad ribosómica 18S no varió y porque la inhibición fue independiente del grado de confluencia celular, ya que tanto a las 48 como a las 72 horas de tratamiento se repetía el patrón inhibitorio. Esto último es importante sobre todo cuando utilizamos modelos experimentales celulares en los que la confluencia celular es crucial en el comportamiento del cultivo celular.

Con objeto de dilucidar si el efecto de la estatina en la expresión de elementos de la MEC era consecuencia de una pérdida de la viabilidad celular o independiente de ella, y si estaba relacionado con el estado de proliferación celular, se caracterizó el escenario biológico en el que se producía esta acción. Para ello, se determinó el efecto de la fluvastatina en el crecimiento de los tumores sólidos *in vivo* y, en la proliferación, viabilidad, ciclo celular y muerte celular en las líneas celulares de tumores epiteliales estudiadas. En muchas estirpes celulares la producción de MEC se reduce sustancialmente cuando están proliferando, y vuelve a aumentar cuando dejan de dividirse. Esto ocurre especialmente con células que se han desdiferenciado y han adquirido un fenotipo más mesenquimal, lo que les permite migrar, proliferar, y posteriormente, fijarse en nuevas ubicaciones, rediferenciarse y reconstituir y poblar otros tejidos. En ellos dejan de proliferar y reanudan la producción de MEC para restaurar la matriz extracelular, el andamiaje tisular, las uniones intercelulares y las membranas basales (Lopez-Novoa y Nieto, 2009). En este sentido, las células cancerosas sufren, durante el proceso de transformación maligna, una cierta desdiferenciación que les permite migrar y colonizar otros órganos distantes y formar allí nuevos focos tumorales. Nuestros experimentos han demostrado que el efecto inhibitorio de la producción de ciertos componentes de la MEC por la fluvastatina, es

independiente de estado de proliferación y no se correlaciona con la parada del ciclo celular.

La fluvastatina ejerció un efecto antitumoral *in vivo*, demostrado en un modelo experimental de tumor epitelial singeneico en ratones (figuras 25 y 26). En los estudios *in vitro* sobre las líneas celulares MDA-MB-231 y 3LL, la estatina produjo una inhibición dependiente de la concentración que fue mayor en las MDA-MB-231 que en las 3LL (figura 27).

Para conocer las razones de esta inhibición de la proliferación se realizaron estudios que relacionaban la inviabilidad celular con la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Se observó que la fluvastatina alteraba la integridad de la membrana plasmática, lo que conllevaba la penetración del colorante yoduro de propidio de forma dependiente de la concentración en ambas líneas celulares y más dramáticamente sobre las MDA-MB-231 (figura 34). Aunque a las 72 horas de tratamiento toda la disminución de la proliferación medida mediante el reactivo MTT correspondía con la inviabilidad cuantificada, a las 48 horas de tratamiento la inviabilidad no era capaz de explicar toda la disminución de la proliferación. Es decir, debía existir otro mecanismo que fuera independiente de la inviabilidad y que ocurriera de forma simultánea a ésta o cuyo proceso desencadenara la pérdida de la viabilidad, como p.e. la parada del ciclo celular. También se estudiaron indicios de muerte celular por apoptosis. No se observaron signos fenotípicos característicos de este tipo de muerte en las células tratadas con fluvastatina: ni la cromatina estaba condensada (algo característico de los cuerpos apoptóticos) (figura 35), ni existían fragmentos internucleosomales de ADN en el citoplasma (figura 36). Aunque se ha descrito que las estatinas son inductoras del proceso de apoptosis en otras líneas tumorales, principalmente mesenquimales (Tang y cols., 2008; Hindler y cols., 2006; Wong y cols., 2002; Sahai y Marshall, 2002; Chan y cols, 2003) también se ha observado que existen determinadas estirpes celulares que son refractarias a este efecto, entre ellas células tumorales de próstata y de mama (Denoyelle y cols., 2001; Dimitroulakos y cols., 2001). En nuestros experimentos con las líneas celulares MDA-MB-231 y 3LL, la estatina no produjo apoptosis. Esto no significa que carezcan de los mecanismos para desarrollarla, ya que pudimos observar este tipo de muerte celular cuando las sometimos a otros agentes citotóxicos con otros propósitos diferentes a los de este trabajo.

Dado que la muerte celular parecía ser responsable sólo parcialmente del efecto antiproliferante de la fluvastatina a las 48 horas de tratamiento, y puesto que es posible

que ésta sea una consecuencia de la parada del ciclo celular, se investigó si este fármaco era capaz de alterar el ciclo de división celular. Se observó una ralentización o parada del ciclo celular (figura 37). En las MDA-MB-231 se producía en el paso de la fase G1 a la S, algo ya descrito para las estatinas (Olson y cols., 1995; Keyomarsi y cols., 1991; Denoyelle y cols., 2001; Wong y cols., 2002). Sin embargo, en las 3LL, la parada ocurría en el paso de la fase G2 a la M, algo muy poco observado hasta el momento (Engelke y Hacker, 1994; Baetta y cols., 1997, Fuchs y cols., 2008).

En todos los experimentos se observó que la fluvastatina inhibía la adhesión celular de forma dependiente de la concentración, siendo de nuevo este hecho, más acusado en las MDA-MB-231 que en las 3LL (figura 30). Las células despegadas no eran inviables, pero captaban una cantidad de yodo de propio intermedia entre las células viables y las inviables.

El cotratamiento con el mevalonato, producto cuya síntesis es directamente inhibida por la acción de las estatinas sobre la enzima HMG-CoA reductasa, revirtió todos los efectos observados en la expresión de la MEC, proliferación (figura 28) y adhesión (figura 31) por la fluvastatina. Esto demostró una relación directa entre la inhibición de la ruta del mevalonato y todas las alteraciones observadas y descartó la posibilidad de que éstas se debieran a la acción de la fluvastatina sobre otras vías metabólicas diferentes.

Los productos del mevalonato GGPP y FPP tienen una gran importancia biológica como sustratos en la prenilación de las proteínas CAAX, entre las que se encuentran las proteínas de la superfamilia Ras. Éstas participan como transductores en multitud de rutas de señalización celular, por lo que la falta de GGPP y FPP podría explicar, al menos en parte, las acciones observadas con la fluvastatina. Cuando las células se cotrataron con los precursores del GGPP y FPP, el GG y FOH respectivamente junto con la fluvastatina, el GG revirtió el efecto inhibitorio observado con la fluvastatina en todos los procesos: expresión de la MEC (figuras 45 y 46), proliferación (figura 29), viabilidad (figura 34), ciclo celular (figura 38) y adhesión (figura 32). En cambio, el FOH apenas restituyó los valores inhibidos. Se observaron ciertas diferencias entre ambas líneas celulares en función del proceso biológico examinado. De forma general, en las MDA-MB-231 el GG revirtió casi totalmente la inhibición producida por la fluvastatina en todos los procesos estudiados, mientras que el FOH apenas modificó los valores alterados con la estatina. En cambio, en las 3LL, el GG restituyó los valores en las funciones estudiadas sólo parcialmente, mientras que el

FOH produjo una mínima reversión sólo observable en algunas funciones como la proliferación o la progresión del ciclo celular. Esto sugiere que:

- Ambas estirpes celulares tienen comportamientos diferentes y, frente a un mismo efecto inhibitorio de las funciones celulares por acción de la estatina, los mecanismos por los que se produce esta inhibición no son del todo idénticos. Muy probablemente las proteínas de la superfamilia Ras implicadas en ambas estirpes celulares no participan en la misma medida.
- La prenilación, y más concretamente la geranilación (incorporación del grupo geranylgeranilo) de las proteínas de la superfamilia de Ras parece ser la diana terapéutica sobre la que las estatinas actúan para llevar a cabo los efectos observados.

Una vez estudiada la acción de la fluvastatina en funciones vitales para las células tumorales, esta estatina se perfiló como un buen agente anticanceroso, no sólo por su inhibición de la proliferación, viabilidad, y progresión del ciclo celular, sino también por su capacidad de disminuir la producción de matriz extracelular tumoral. Esto último podría tener nuevas aplicaciones terapéuticas, como se ha comentado anteriormente. Además, también estudiamos la sensibilización de la fluvastatina a la acción citotóxica de un fármaco antineoplásico como el cisplatino sobre las células tumorales MDA-MB-231 y 3LL. La fluvastatina ejerció un efecto potenciador de la acción antitumoral del cisplatino sobre ambas líneas de cáncer (figuras 40 y 41). Además, las células despegadas por la fluvastatina tenían una tasa de proliferación similar a las adheridas (figura 42).

Tras haber intuido el mecanismo de acción por el cual la estatina ejercía sus acciones, se estudiaron más concretamente los efectos de ésta sobre las proteínas de la superfamilia Ras, en concreto, cambios en la síntesis estas proteínas, su localización celular (lo que indicó su grado de prenilación) y la activación de RhoA (RhoA unido a GTP).

El tratamiento con la fluvastatina aumentó de la cantidad de las proteínas de la superfamilia Ras: RhoA, RhoB, RhoC, H-Ras y K-Ras determinada mediante Western blot en las células MDA-MB-231 y 3LL (figuras 47 y 48). Además, estas GTPasas se localizaron en el citoplasma y, por tanto, no ancladas a la membrana plasmática por su grupo prenilo (figuras 49 y 50). Por otra parte, a las 72 horas de tratamiento, la estatina inhibió la activación de RhoA, es decir, la unión de RhoA a GTP (figuras 51 y 52). En conjunto, se sugirió que la fluvastatina producía una inhibición de la prenilación de las

GTPasas Rho y Ras en las líneas celulares de cáncer, lo que produjo una deslocalización de las formas no preniladas en el citosol y una inhibición de la activación de RhoA. Probablemente, para compensar la falta de estos transductores anclados a la membrana plasmática, la célula aumentó la síntesis de proteínas de novo e inhibió su degradación (Holstein y cols., 2002; Turner y cols., 2007; Von Zee y cols., 2009). El resultado final fue una mayor cantidad de GTPasas no preniladas en el citosol e inactivas, es decir unidas a GDP lo que presumiblemente desencadenó las inhibiciones estudiadas anteriormente en la proliferación, la adhesión, la progresión del ciclo celular y la expresión de MEC.

El cotratamiento con GG aportó los grupos necesarios para la prenilación y, por tanto, restituyó la cantidad normal de GTPasas Rho (figuras 47 y 48), que volvieron a prenilarse y a anclarse en la membrana (figuras 49 y 50). Además RhoA volvió a encontrarse activado (figuras 51 y 52). En cambio el cotratamiento con FOH no reestableció ninguna de estas modificaciones. Esto confirmó que las GTPasas Rho principalmente se geranilaban en nuestros sistemas experimentales. En cambio, las Ras GTPasas, que normalmente se farnesilan, reestablecieron sus características normales cuando se cotrataron con FOH. Sin embargo, el cotratamiento con GG sólo disminuyó las acciones de la fluvastatina en K-Ras, ya que ésta proteína tiene la capacidad de geranilarse en ausencia del sustrato FPP. Como hipótesis, y debido a que muchas acciones inhibitorias de la fluvastatina, como la expresión de la MEC o la adhesión, no se revirtieron con el cotratamiento con FOH pero sí con GG, se sugirió que las GTPasas implicadas en estas acciones eran aquellas que sólo se geranilaban, es decir, las Rho GTPasas.

Ya que las Rho GTPasas también tienen actividad transcripcional cuando no están preniladas y se encuentran en el citosol (Lebowitz y cols., 1997; Allal y cols., 2000; Turner y cols., 2007), analizamos el papel de la modulación de la expresión génica producida por RhoA en las acciones observadas con la fluvastatina. Para ello se infectó a las células MDA-MB-231 con un plásmido que expresaba la proteína de fusión EGFP-RhoA(Q63L). RhoA(Q63L) tiene una mutación que le permite tener más afinidad por GTP y menos por GDP, es decir, está activo constitutivamente de forma independiente de su prenilación. Así, tras el tratamiento con la fluvastatina, RhoA(Q63L) estaría activo constitutivamente pero no prenilado y, por lo tanto, con sus actividades en el núcleo y citoplasma intactas pero con sus funciones como transductor en la membrana inhibidas. La infección no supuso ningún cambio en la disminución de la proliferación

(figura 58), adhesión (figura 59) y expresión de la MEC (figura 60). Por ello, se concluye que la actividad transcripcional de RhoA no es importante en las funciones estudiadas, y que la fluvastatina no ejerce sus efectos a través de la inhibición de la actividad transcripcional directa de RhoA. Esto parece sugerir que, probablemente, la fluvastatina produce sus efectos mediante la inhibición de la geranilación de Rho y, por tanto, mediante la inhibición de las actividades de éste como transductor de señales en las cascadas de señalización en las que interviene en la membrana. Así, la inhibición de ROCK, uno de los efectores de Rho prenilado, fue capaz de reducir la proliferación de forma similar a la fluvastatina (figura 53), pero no ejerció ningún efecto en la adhesión al sustrato (figura 54) ni en la regulación de la expresión de los genes de los componentes de la MEC (figura 55). Por tanto, estas últimas acciones de la fluvastatina podrían articularse a través de otros efectores de Rho prenilado, como mDia, o a través de otra GTPasa que fundamentalmente se geranile.

Así, una de las perspectivas para el futuro inmediato es identificar la vía de señalización concreta implicada en el efecto antifibrótico de la fluvastatina en tumores epiteliales, de forma que podamos actuar más específicamente sobre este proceso sin causar efectos indeseables. Claramente, otro objetivo próximo para continuar en esta línea es el estudio del efecto de este fármaco en la fibrosis intersticial tumoral y en la permeabilidad del parénquima tumoral en tumores sólidos de tipo epitelial.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. La fluvastatina tiene efecto antitumoral *in vivo* en un modelo experimental de tumor epitelial singeneico.

2. La fluvastatina inhibe de forma dependiente de la concentración la proliferación de células en cultivo de tumores epiteliales de mama humanas (MDA-MB-231) y de pulmón de ratón (3LL) como resultado de una ralentización del ciclo de división celular. Probablemente esto último es la causa de la pérdida de la viabilidad observada, que no muestra signos evidentes de apoptosis.

4. En las mismas condiciones, la fluvastatina produce una inhibición de las uniones intercelulares y de la adhesión al sustrato.

5. La fluvastatina potencia la acción antitumoral del agente anticanceroso cisplatino *in vitro*. La sensibilización celular al cisplatino por la fluvastatina es la misma tanto en las células adheridas y como en las desadheridas.

6. La fluvastatina inhibe la expresión de los genes de la fibronectina y del colágeno I y IV en estas líneas celulares. Este efecto no parece ser consecuencia de la pérdida de la viabilidad celular o de la confluencia celular, ni se relaciona inversamente con los cambios en la proliferación.

7. La falta del geranilgeranil pirofosfato y, presumiblemente, la inhibición de la geranilación de las GTPasas media en estos efectos de esta estatina.

8. La fluvastatina inhibe la degradación y estimula la síntesis de novo de las proteínas de la superfamilia Ras, inhibe su prenilación (farnesilación o geranilación dependiendo de la proteína) e inhibe la activación de la proteína RhoA en las células tumorales estudiadas.

9. El efector de Rho, ROCK, interviene en la proliferación de nuestras líneas epiteliales de cáncer, pero no parece jugar un papel en la adhesión ni en la expresión de la MEC. Esto indica que, estas últimas funciones celulares dependen de otro efector de Rho u otra GTPasa que se geranile.

10. La falta de prenilación de las GTPasas y, por tanto, la inhibición de la actividad en la membrana como transductores, y no la inhibición de la actividad transcripcional directa de estas GTPasas, es lo que produce las alteraciones observadas con la fluvastatina.

- Abal M, Andreu JM y Barasoain I. *Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action*. *Curr Cancer Drug Targets*,3 (3), 193-203. 2003
- Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG y Holt PR. *Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells*. *Clin Cancer Res*,5 (8), 2223-9. 1999
- Alberts AW, MacDonald JS, Till AE y Tobert JA. *Lovastatin*. *Cardiovasc Drug Rev* 7: 89-109; 1989.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson JD. *Biología Molecular de la célula*. 3º Ed.; Editorial Omega. Pág G-19, 1996.
- Al-Hajj M y Clarke MF. *Self-renewal and solid tumor stem cells*. *Oncogene*,23 (43), 7274-82. 2004
- Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R, Fedi P, Aaronson SA, Di Fiore PP y Kraus MH. *Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas*. *Oncogene*,10 (9), 1813-21. 1995
- Allal C, Favre G, Couderc B, Salicio S, Sixou S, Hamilton AD, Sebti SM, Lajoie-Mazenc I y Pradines A. *RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription*. *J Biol Chem*,275 (40), 31001-8. 2000
- Allen WE, Zicha D, Ridley AJ y Jones GE. *A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis*. *J Cell Biol*,141 (5), 1147-57. 1998
- American Cancer Society: www.cancer.org. Entrada: julio, 2010
- Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Kimura K, Nozaki K, Hashimoto N y Narumiya S. *Control of axon elongation via an SDF-1alpha/Rho/mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons*. *J Cell Biol*,161 (2), 381-91. 2003
- Aravind L, Dixit VM y Koonin EV. *The domains of death: evolution of the apoptosis machinery*. *Trends Biochem Sci*,24 (2), 47-53. 1999
- Asociación Española Contra el Cáncer: www.aecc.es. Entrada: julio, 2010
- Aumailley M y Krieg T. *Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes*. *J Invest Dermatol*,106 (2), 209-214. 1996
- Baetta R, Donetti E, Comparato C, Calore M, Rossi A, Teruzzi C, Paoletti R, Fumagalli R y Soma MR. *Proapoptotic effect of atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells*. *Pharmacol Res*,36 (2), 115-21. 1997
- Bafico, A y Aaronson, SA (2003) *Growth factors and signal transduction in cancer*. *Cancer Medicine*. Editado por Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., Bast, R.C. Jr., Gansler, T.S., Holland, J.F. and Frei III, E. Hamilton (Canadá): BC Decker Inc, Sexta Edición
- Balmain A. *Transforming ras oncogenes and multistage carcinogenesis*. *Br J Cancer*,51 (1), 1-7. 1985

- Baltz JK. *Vaccines in the treatment of cancer*. Am J Health Syst Pharm,52 (22), 2574-85; quiz 2594-5. 1995
- Benetka W, Koranda M y Eisenhaber F. *Protein Prenylation: An (Almost) Comprehensive Overview on Discovery History, Enzymology, and Significance in Physiology and Disease*. Monatshefte für Chemie 137, 1241-1281. 2006
- Berdeaux RL, Diaz B, Kim L y Martin GS. *Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function*. J Cell Biol,166 (3), 317-23. 2004.
- Birnboim HC y Doly J. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res,7 (6), 1513-23. 1979.
- Bischoff H, Angerbauer R, Bender J, Bischoff E, Faggiotto A, Petzinna D, Pfitzner J, Porter MC, Schmidt D y Thomas G. *Cerivastatin: pharmacology of a novel synthetic and highly active HMG-CoA reductase inhibitor*. Atherosclerosis,135 (1), 119-30. 1997
- Bordier C. *Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution*. J Biol Chem,256 (4), 1604-7. 1981
- Borg TK. *It's the matrix! ECM, proteases, and cancer*. Am J Pathol,164 (4), 1141-2. 2004
- Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, Yin S, Barrett JC, Kolodner RD y Kunkel TA. *Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines*. Cancer Res,55 (24), 6063-70. 1995
- Brown JC y Timpl R. *The collagen superfamily*. Int Arch Allergy Immunol,107 (4), 484-90. 1995
- Bryan TM y Cech TR. *Telomerase and the maintenance of chromosome ends*. Curr Opin Cell Biol,11 (3), 318-24. 1999
- Buemi M, Senatore M, Corica F, Aloisi C, Romeo A, Cavallaro E, Floccari F, Tramontana D y Frisina N. *Statins and progressive renal disease*. Med Res Rev,22 (1), 76-84. 2002
- Camps C, Sirera R, Iranzo V, Taron M y Rosell R. *Gene expression and polymorphisms of DNA repair enzymes: cancer susceptibility and response to chemotherapy*. Clin Lung Cancer,8 (6), 369-75. 2007
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F y Collen D. *Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation*. Nat Genet,17 (4), 439-44. 1997
- Carnero A. *High throughput screening in drug discovery*. Clin Transl Oncol,8 (7), 482-90. 2006
- Clark EA y Hynes RO. *Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization*. J Biol Chem,271 (25), 14814-8. 1996
- Cleary EG y Gibson MA. *Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins*. Int Rev Connect Tissue Res,10 97-209. 1983
- Cohen J. *Cancer vaccines get a shot in the arm*. Science,262 (5135), 841-3. 1993

- Colognato H, Winkelmann DA y Yurchenco PD. *Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network*. J Cell Biol,145 (3), 619-31. 1999
- Colognato H y Yurchenco PD. *Form and function: the laminin family of heterotrimers*. Dev Dyn,218 (2), 213-34. 2000
- Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P y Peto R. *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial*. Lancet,361 (9374), 2005-16. 2003
- Comoglio PM y Trusolino L. *Cancer: the matrix is now in control*. Nat Med,11 (11), 1156-9. 2005
- Corsini A, Raiteri M, Soma MR, Bernini F, Fumagalli R y Paoletti R. *Pathogenesis of atherosclerosis and the role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors*. Am J Cardiol,76 (2), 21A-28A. 1995
- Coussens LM y Werb Z. *Matrix metalloproteinases and the development of cancer*. Chem Biol,3 (11), 895-904. 1996
- Cox AD y Der CJ. *Protein prenylation: more than just glue?* Curr Opin Cell Biol,4 (6), 1008-16. 1992
- Crabbe T, O'Connell JP, Smith BJ y Docherty AJ. *Reciprocated matrix metalloproteinase activation: a process performed by interstitial collagenase and progelatinase A*. Biochemistry,33 (48), 14419-25. 1994
- Chan JK y Berek JS. *Impact of the human papilloma vaccine on cervical cancer*. J Clin Oncol,25 (20), 2975-82. 2007
- Chan KK, Oza AM y Siu LL. *The statins as anticancer agents*. Clin Cancer Res,9 (1), 10-9. 2003
- Chang JW, Chen YC, Chen CY, Chen JT, Chen SK y Wang YC. *Correlation of genetic instability with mismatch repair protein expression and p53 mutations in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res,6 (5), 1639-46. 2000
- Chang JW, Yang WS, Min WK, Lee SK, Park JS y Kim SB. *Effects of simvastatin on high-sensitivity C-reactive protein and serum albumin in hemodialysis patients*. Am J Kidney Dis,39 (6), 1213-7. 2002
- Cheng YS, Champlaud MF, Burgeson RE, Marinkovich MP y Yurchenco PD. *Self-assembly of laminin isoforms*. J Biol Chem,272 (50), 31525-32. 1997
- Chomczynski P. *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. Biotechniques,15 (3), 532-4, 536-7. 1993
- Chomczynski P y Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem,162 (1), 156-9. 1987
- Christofori G y Semb H. *The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene*. Trends Biochem Sci,24 (2), 73-6. 1999
- Dalglish AG y Whelan MA. *Cancer vaccines as a therapeutic modality: The long trek*. Cancer Immunol Immunother,55 (8), 1025-32. 2006
- Davidson MH. *Safety profiles for the HMG-CoA reductase inhibitors: treatment and trust*. Drugs,61 (2), 197-206. 2001

- Dawson M y Moore M. *Inmunidad frente a los tumores*. Editado por Roitt M, Brostoff J y Male D. Inmunología. Segunda Edición. Barcelona: Salvat; 1991. p. 18.1-18.17
- DeClerck YA, Mercurio AM, Stack MS, Chapman HA, Zutter MM, Muschel RJ, Raz A, Matrisian LM, Sloane BF, Noel A, Hendrix MJ, Coussens L y Padarathsingh M. *Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section*. Am J Pathol,164 (4), 1131-9. 2004
- Denny WA y Baguley BC. *Dual topoisomerase I/II inhibitors in cancer therapy*. Curr Top Med Chem,3 (3), 339-53. 2003
- Denoyelle C, Vasse M, Korner M, Mishal Z, Ganne F, Vannier JP, Soria J y Soria C. *Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study*. Carcinogenesis,22 (8), 1139-48. 2001
- Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR y Aaronson SA. *erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells*. Science,237 (4811), 178-82. 1987
- Dickinson CD, Veerapandian B, Dai XP, Hamlin RC, Xuong NH, Ruoslahti E y Ely KR. *Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin*. J Mol Biol,236 (4), 1079-92. 1994
- Dimitroulakos J, Thai S, Wasfy GH, Hedley DW, Minden MD y Penn LZ. *Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias*. Leuk Lymphoma,40 (1-2), 167-78. 2000
- Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, Yeger H y Penn LZ. *Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications*. Clin Cancer Res,7 (1), 158-67. 2001
- Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W y Gotto AM, Jr. *Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study*. Jama,279 (20), 1615-22. 1998
- Dransart E, Olofsson B y Cherfils J. *RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation*. Traffic,6 (11), 957-66. 2005
- Druker BJ. *STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy*. Trends Mol Med,8 (4 Suppl), S14-8. 2002
- Duflos A, Kruczynski A y Barret JM. *Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids*. Curr Med Chem Anticancer Agents,2 (1), 55-70. 2002
- Dvorak HF. *Leaky tumor vessels: consequences for tumor stroma generation and for solid tumor therapy*. Prog Clin Biol Res,354A 317-30. 1990
- Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C y Krieg T. *Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis*. Matrix Biol,19 (4), 325-32. 2000
- Engelke KJ y Hacker MP. *A non-characteristic response of L1210 cells to lovastatin*. Biochem Biophys Res Commun,203 (1), 400-7. 1994

- Engvall E, Jonsson K y Perlmann P. *Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes.* Biochim Biophys Acta,251 (3), 427-34. 1971
- Etienne-Manneville S y Hall A. *Rho GTPases in cell biology.* Nature,420 (6916), 629-35. 2002
- Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H y Luscher TF. *Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways.* Circulation,105 (15), 1756-9. 2002
- Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G y Hartwell L. *The case for early detection.* Nat Rev Cancer,3 (4), 243-52. 2003
- Evan G y Littlewood T. *A matter of life and cell death.* Science,281 (5381), 1317-22. 1998
- Ezer S, Bayes M, Elomaa O, Schlessinger D y Kere J. *Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells.* Hum Mol Genet,8 (11), 2079-86. 1999
- Fan R, Kumaravel TS, Jalali F, Marrano P, Squire JA y Bristow RG. *Defective DNA strand break repair after DNA damage in prostate cancer cells: implications for genetic instability and prostate cancer progression.* Cancer Res,64 (23), 8526-33. 2004
- Farmer JA y Torre-Amione G. *Comparative tolerability of the HMG-CoA reductase inhibitors.* Drug Saf,23 (3), 197-213. 2000
- Farnier M y Davignon J. *Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins.* Am J Cardiol,82 (4B), 3J-10J. 1998
- Feleszko W, Zagozdzon R, Golab J y Jakobisiak M. *Potentiated antitumour effects of cisplatin and lovastatin against MmB16 melanoma in mice.* Eur J Cancer,34 (3), 406-11. 1998
- Felton KE, Gilchrist DM y Andrew SE. *Constitutive deficiency in DNA mismatch repair.* Clin Genet,71 (6), 483-98. 2007
- Ferrell JE, Jr. y Martin GS. *Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets.* Proc Natl Acad Sci U S A,86 (7), 2234-8. 1989
- Fink SL y Cookson BT. *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells.* Infect Immun,73 (4), 1907-16. 2005
- Flórez J, Armijo JA y Mediavilla A. *Farmacología humana.* Editorial Mason; SA, 4ª Ed, 2003
- Folkman J. *Endogenous angiogenesis inhibitors.* Apmis,112 (7-8), 496-507. 2004
- Folkman J y D'Amore PA. *Blood vessel formation: what is its molecular basis?* Cell,87 (7), 1153-5. 1996
- Frankel AE. *Immunotoxin therapy of cancer.* Oncology (Williston Park),7 (5), 69-78; discussion 79-80, 83-6. 1993

- Fritz G, Gnad R y Kaina B. *Cell and tissue-type specific expression of Ras-related GTPase RhoB*. Anticancer Res,19 (3A), 1681-8. 1999
- Fuchs D, Berges C, Opelz G, Daniel V y Naujokat C. *HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes bortezomib-induced apoptosis resistance by disrupting a geranylgeranyl pyrophosphate-dependent survival pathway*. Biochem Biophys Res Commun,374 (2), 309-14. 2008
- Gandhi NS y Mancera RL. *The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins*. Chem Biol Drug Des,72 (6), 455-82. 2008
- Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA y Henson PM. *Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective*. J Leukoc Biol,79 (5), 896-903. 2006
- Giancotti FG y Tarone G. *Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling*. Annu Rev Cell Dev Biol,19 173-206. 2003
- Gilmore AP. *Anoikis*. Cell Death Differ,12 Suppl 2 1473-7. 2005
- Golden A y Brugge JS. *Thrombin treatment induces rapid changes in tyrosine phosphorylation in platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A,86 (3), 901-5. 1989
- Goldstein JL y Brown MS. *Regulation of the mevalonate pathway*. Nature,343 (6257), 425-30. 1990
- Golstein P y Kroemer G. *Cell death by necrosis: towards a molecular definition*. Trends Biochem Sci,32 (1), 37-43. 2007
- Gomez DE, Alonso DE, Yoshiji H y Thorgeirsson UP. *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. Eur J Cell Biol,74 (2), 111-22. 1997
- Goode BL y Eck MJ. *Mechanism and function of formins in the control of actin assembly*. Annu Rev Biochem,76 593-627. 2007
- Grimm CF, Blum HE y Geissler M. *[Tyrosine kinase inhibitors in tumor therapy--part 2. Current position and perspectives]*. Dtsch Med Wochenschr,130 (23), 1438-42. 2005
- Gudi T, Chen JC, Casteel DE, Seasholtz TM, Boss GR y Pilz RB. *cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions*. J Biol Chem,277 (40), 37382-93. 2002
- Hanahan D. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol,166 (4), 557-80. 1983.
- Hanahan D y Folkman J. *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell,86 (3), 353-64. 1996
- Hanahan D y Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. Cell,100 (1), 57-70. 2000
- Hancock JF, Paterson H y Marshall CJ. *A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane*. Cell,63 (1), 133-9. 1990
- Hardingham TE y Fosang AJ. *Proteoglycans: many forms and many functions*. Faseb J,6 (3), 861-70. 1992

- Haria M y McTavish D. *Pravastatin. A reappraisal of its pharmacological properties and clinical effectiveness in the management of coronary heart disease.* *Drugs*,53 (2), 299-336. 1997
- Harris CC. *p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective.* *Carcinogenesis*,17 (6), 1187-98. 1996
- Harvey JJ. *An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice.* *Nature*,204 1104-5. 1964
- Hayflick L y Moorhead PS. *The serial cultivation of human diploid cell strains.* *Exp Cell Res*,25 585-621. 1961
- Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O y Nathan I. *Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia.* *Leuk Lymphoma*,44 (11), 1957-62. 2003
- Hindler K, Cleeland CS, Rivera E y Collard CD. *The role of statins in cancer therapy.* *Oncologist*,11 (3), 306-15. 2006
- Hodge JC, Bub J, Kaul S, Kajdacsy-Balla A y Lindholm PF. *Requirement of RhoA activity for increased nuclear factor kappaB activity and PC-3 human prostate cancer cell invasion.* *Cancer Res*,63 (6), 1359-64. 2003
- Holstein SA, Wohlford-Lenane CL y Hohl RJ. *Consequences of mevalonate depletion. Differential transcriptional, translational, and post-translational up-regulation of Ras, Rap1a, RhoA, AND RhoB.* *J Biol Chem*,277 (12), 10678-82. 2002
- Hussein D y Taylor SS. *Farnesylation of Cenp-F is required for G2/M progression and degradation after mitosis.* *J Cell Sci*,115 (Pt 17), 3403-14. 2002
- Hynes RO. *Fibronectins.* *Sci Am*,254 (6), 42-51. 1986
- Hynes RO. *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.* *Cell*,69 (1), 11-25. 1992
- Illingworth DR y Tobert JA. *HMG-CoA reductase inhibitors.* *Adv Protein Chem*,56 77-114. 2001
- Imai K, Ohuchi E, Aoki T, Nomura H, Fujii Y, Sato H, Seiki M y Okada Y. *Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2.* *Cancer Res*,56 (12), 2707-10. 1996
- Inoue H, Nojima H y Okayama H. *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids.* *Gene*,96 (1), 23-8. 1990.
- Iozzo RV y Murdoch AD. *Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function.* *Faseb J*,10 (5), 598-614. 1996.
- Istvan ES y Deisenhofer J. *Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase.* *Science*,292 (5519), 1160-4. 2001.
- Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T y Narumiya S. *An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells.* *Nat Med*,5 (2), 221-5. 1999.

- Ivetic A y Ridley AJ. *Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes*. Immunology,112 (2), 165-76. 2004
- Kabakoff BD, Doyle JW y Kandutsch AA. *Relationships among dolichyl phosphate, glycoprotein synthesis, and cell culture growth*. Arch Biochem Biophys,276 (2), 382-9. 1990
- Kadler KE, Baldock C, Bella J y Boot-Handford RP. *Collagens at a glance*. J Cell Sci,120 (Pt 12), 1955-8. 2007
- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA y Chapman JA. *Collagen fibril formation*. Biochem J,316 (Pt 1) 1-11. 1996
- Kajinami K, Mabuchi H y Saito Y. *NK-104: a novel synthetic HMG-CoA reductase inhibitor*. Expert Opin Investig Drugs,9 (11), 2653-61. 2000
- Katsura M. [Effect of human recombinant interleukin-1 alpha on glycosaminoglycan and collagen metabolism in cultured human chorionic cells]. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi,41 (12), 1943-50. 1989
- Keilholz U. *Antigen-specific cancer vaccines*. Recent Results Cancer Res,176 213-8. 2007
- Kemshead JT y Hopkins K. *Uses and limitations of monoclonal antibodies (MoAbs) in the treatment of malignant disease: a review*. J R Soc Med,86 (4), 219-24. 1993
- Keyomarsi K, Sandoval L, Band V y Pardee AB. *Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin*. Cancer Res,51 (13), 3602-9. 1991
- Khandare JJ y Minko T. *Antibodies and peptides in cancer therapy*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst,23 (5), 401-35. 2006
- Khosravi-Far R, Solski PA, Clark GJ, Kinch MS y Der CJ. *Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation*. Mol Cell Biol,15 (11), 6443-53. 1995
- Kielty CM. *Elastic fibres in health and disease*. Expert Rev Mol Med,8 (19), 1-23. 2006
- King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tschlis PN y Brugge JS. *Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation*. Mol Cell Biol,17 (8), 4406-18. 1997
- Kirsten WH y Mayer LA. *Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus*. J Natl Cancer Inst,39 (2), 311-35. 1967
- Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV y Papavassiliou AG. *Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets*. Nat Rev Drug Discov,6 (7), 541-55. 2007
- Kotamraju S, Williams CL y Kalyanaraman B. *Statin-induced breast cancer cell death: role of inducible nitric oxide and arginase-dependent pathways*. Cancer Res,67 (15), 7386-94. 2007
- Kreitman RJ. *Immunotoxins for targeted cancer therapy*. Aaps J,8 (3), E532-51. 2006
- Kresse H y Schonherr E. *Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control*. J Cell Physiol,189 (3), 266-74. 2001

- Kusama T, Mukai M, Ayaki M, Imamura F, Tatsuta M, Matsumoto Y, Nakamura H y Inoue M. *Inhibition of lysophosphatidic acid-induced RhoA activation and tumor cell invasion by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors*. *Int J Oncol*,23 (4), 1173-8. 2003
- Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*,227 (5259), 680-5. 1970
- Lane MA, Sainten A y Cooper GM. *Activation of related transforming genes in mouse and human mammary carcinomas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*,78 (8), 5185-9. 1981
- Leaf C. *Why we're losing the war on cancer (and how to win it)*. *Fortune*,149 (6), 76-82, 84-6, 88 passim. 2004
- Lebowitz PF, Du W y Prendergast GC. *Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription*. *J Biol Chem*,272 (26), 16093-5. 1997
- Lennernas H y Fager G. *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences*. *Clin Pharmacokinet*,32 (5), 403-25. 1997
- Levine AJ. *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. *Cell*,88 (3), 323-31. 1997
- Li C, Yang CW, Park JH, Lim SW, Sun BK, Jung JY, Kim SB, Kim YS, Kim J y Bang BK. *Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy*. *Am J Physiol Renal Physiol*,286 (1), F46-57. 2004
- Li Z, Yu T, Zhao P y Ma J. *Immunotoxins and cancer therapy*. *Cell Mol Immunol*,2 (2), 106-12. 2005
- Limper AH y Roman J. *Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection*. *Chest*,101 (6), 1663-73. 1992
- Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT y Brugge JS. *Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets*. *J Cell Biol*,119 (4), 905-12. 1992
- Liu Y. *Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention*. *J Am Soc Nephrol*,15 (1), 1-12. 2004
- Lobo NA, Shimono Y, Qian D y Clarke MF. *The biology of cancer stem cells*. *Annu Rev Cell Dev Biol*,23 675-99. 2007
- Longenecker K, Read P, Lin SK, Somlyo AP, Nakamoto RK y Derewenda ZS. *Structure of a constitutively activated RhoA mutant (Q63L) at 1.55 Å resolution*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*,59 (Pt 5), 876-80. 2003
- Lopez-Hernandez FJ, Ortiz MA, Bayon Y y Piedrafita FJ. *Retinoid-related molecules require caspase 9 for the effective release of Smac and the rapid induction of apoptosis*. *Cell Death Differ*,11 (2), 154-64. 2004
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*,193 (1), 265-75. 1951
- Madaule P y Axel R. *A novel ras-related gene family*. *Cell*,41 (1), 31-40. 1985

- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K y Narumiya S. *Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase*. Science,285 (5429), 895-8. 1999
- Maertens B, Hopkins D, Franzke CW, Keene DR, Bruckner-Tuderman L, Greenspan DS y Koch M. *Cleavage and oligomerization of gliomedin, a transmembrane collagen required for node of ranvier formation*. J Biol Chem,282 (14), 10647-59. 2007
- Main AL, Harvey TS, Baron M, Boyd J y Campbell ID. *The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions*. Cell,71 (4), 671-8. 1992
- Maione TE y Sharpe RJ. *Development of angiogenesis inhibitors for clinical applications*. Trends Pharmacol Sci,11 (11), 457-61. 1990
- Malinowski JM. *Atorvastatin: a hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor*. Am J Health Syst Pharm,55 (21), 2253-67; quiz 2302-3. 1998
- Manual de Merck: http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_15/seccion_15_166.htm
Entrada: abril, 2007
- Marcelli M, Cunningham GR, Haidacher SJ, Padayatty SJ, Sturgis L, Kagan C y Denner L. *Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP*. Cancer Res,58 (1), 76-83. 1998
- Martinez J, Chalupowicz DG, Roush RK, Sheth A y Barsigian C. *Transglutaminase-mediated processing of fibronectin by endothelial cell monolayers*. Biochemistry,33 (9), 2538-45. 1994
- Mascotti K, McCullough J y Burger SR. *HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide*. Transfusion,40 (6), 693-6. 2000
- Mastrangelo MJ, Berd D, Nathan FE y Lattime EC. *Gene therapy for human cancer: an essay for clinicians*. Semin Oncol,23 (1), 4-21. 1996
- Matrisian LM. *Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling*. Trends Genet,6 (4), 121-5. 1990
- McCormick F. *Signalling networks that cause cancer*. Trends Cell Biol,9 (12), M53-6. 1999
- McGuire TF y Sebt SM. *Geranylgeraniol potentiates lovastatin inhibition of oncogenic H-Ras processing and signaling while preventing cytotoxicity*. Oncogene,14 (3), 305-12. 1997
- McLennan SV, Death AK, Fisher EJ, Williams PF, Yue DK y Turtle JR. *The role of the mesangial cell and its matrix in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),45 (1), 123-35. 1999
- McTaggart F, Buckett L, Davidson R, Holdgate G, McCormick A, Schneck D, Smith G y Warwick M. *Preclinical and clinical pharmacology of Rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor*. Am J Cardiol,87 (5A), 28B-32B. 2001
- Medema RH y Bos JL. *The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling*. Crit Rev Oncog,4 (6), 615-61. 1993

- Michaelson D, Ali W, Chiu VK, Bergo M, Silletti J, Wright L, Young SG y Philips M. *Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases*. Mol Biol Cell,16 (4), 1606-16. 2005
- Miner JH. *Laminins and their roles in mammals*. Microsc Res Tech,71 (5), 349-56. 2008
- Murphy G y Willenbrock F. *Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases*. Methods Enzymol,248 496-510. 1995
- Nagase H y Woessner JF, Jr. *Matrix metalloproteinases*. J Biol Chem,274 (31), 21491-4. 1999
- Narumiya S, Ishizaki T y Uehata M. *Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632*. Methods Enzymol,325 273-84. 2000
- Narumiya S, Tanji M y Ishizaki T. *Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion*. Cancer Metastasis Rev,28 (1-2), 65-76. 2009
- Nevozhay D, Kanska U, Budzynska R y Boratynski J. [*Current status of research on conjugates and related drug delivery systems in the treatment of cancer and other diseases*]. Postepy Hig Med Dosw (Online),61 350-60. 2007
- Nguyen DX y Massague J. *Genetic determinants of cancer metastasis*. Nat Rev Genet,8 (5), 341-52. 2007
- Nishimura M, Tanaka T, Yasuda T, Kurakata S, Kitagawa M, Yamada K, Saito Y y Hirai A. *Effect of pravastatin on type IV collagen secretion and mesangial cell proliferation*. Kidney Int Suppl,71 S97-100. 1999
- Nobes CD y Hall A. *Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement*. J Cell Biol,144 (6), 1235-44. 1999
- Nunez R. *DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry*. Curr Issues Mol Biol,3 (3), 67-70. 2001
- Nunez R, Sancho-Martinez SM, Novoa JM y Lopez-Hernandez FJ. *Apoptotic volume decrease as a geometric determinant for cell dismantling into apoptotic bodies*. Cell Death Differ,17 (11), 1665-71.
- Olson MF, Ashworth A y Hall A. *An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1*. Science,269 (5228), 1270-2. 1995
- Olson MF, Paterson HF y Marshall CJ. *Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1*. Nature,394 (6690), 295-9. 1998
- Organización Mundial de la Salud (OMS): <http://www.who.int/es/>. Entrada: julio, 2010
- Park JK, Muller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Schmidt F, Bieringer M, Schafer O, Lindschau C, Schneider W, Ganten D, Luft FC y Haller H. *Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure- and cholesterol-lowering effects*. Kidney Int,58 (4), 1420-30. 2000
- Pedersen TR. *Pro and con: low-density lipoprotein cholesterol lowering is and will be the key to the future of lipid management*. Am J Cardiol,87 (5A), 8B-12B. 2001
- Perucho M, Goldfarb M, Shimizu K, Lama C, Fogh J y Wigler M. *Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes*. Cell,27 (3 Pt 2), 467-76. 1981

- Philips MR y Cox AD. *Geranylgeranyltransferase I as a target for anti-cancer drugs*. J Clin Invest,117 (5), 1223-5. 2007
- Pirker R. *Immunotoxins against solid tumors*. J Cancer Res Clin Oncol,114 (4), 385-93. 1988
- Pittler SJ, Fliesler SJ, Fisher PL, Keller PK y Rapp LM. *In vivo requirement of protein prenylation for maintenance of retinal cytoarchitecture and photoreceptor structure*. J Cell Biol,130 (2), 431-9. 1995
- Plosker GL y McTavish D. *Simvastatin. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy in hypercholesterolaemia*. Drugs,50 (2), 334-63. 1995
- Plosker GL y Wagstaff AJ. *Fluvastatin: a review of its pharmacology and use in the management of hypercholesterolaemia*. Drugs,51 (3), 433-59. 1996
- Plowman SJ y Hancock JF. *Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains*. Biochim Biophys Acta,1746 (3), 274-83. 2005
- Plowman SJ, Muncke C, Parton RG y Hancock JF. *H-ras, K-ras, and inner plasma membrane raft proteins operate in nanoclusters with differential dependence on the actin cytoskeleton*. Proc Natl Acad Sci U S A,102 (43), 15500-5. 2005
- Press OW. *Immunotoxins*. Biotherapy,3 (1), 65-76. 1991
- Price LS, Leng J, Schwartz MA y Bokoch GM. *Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading*. Mol Biol Cell,9 (7), 1863-71. 1998
- Proskuryakov SY, Gabai VL, Konoplyannikov AG, Zamulaeva IA y Kolesnikova AI. *Immunology of apoptosis and necrosis*. Biochemistry (Mosc),70 (12), 1310-20. 2005
- Radisky DC, Kenny PA y Bissell MJ. *Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?* J Cell Biochem,101 (4), 830-9. 2007
- Rang HP y Dale MM. *Farmacología*. Editrial Churchill Livingstone, 1992.
- Rao S, Lowe M, Herliczek TW y Keyomarsi K. *Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53*. Oncogene,17 (18), 2393-402. 1998
- Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, Watanabe G, Watanabe N, Fujisawa K, Morii N, Madaule P y Narumiya S. *Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain*. J Biol Chem,271 (23), 13556-60. 1996
- Reiter Y. *Recombinant immunotoxins in targeted cancer cell therapy*. Adv Cancer Res,81 93-124. 2001
- Ren XD, Kiosses WB y Schwartz MA. *Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton*. Embo J,18 (3), 578-85. 1999
- Rennebeck G, Martelli M y Kyprianou N. *Anoikis and survival connections in the tumor microenvironment: is there a role in prostate cancer metastasis?* Cancer Res,65 (24), 11230-5. 2005

- Reuter CW, Morgan MA y Bergmann L. *Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?* Blood,96 (5), 1655-69. 2000
- Ridley AJ y Hall A. *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.* Cell,70 (3), 389-99. 1992
- Riento K y Ridley AJ. *Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour.* Nat Rev Mol Cell Biol,4 (6), 446-56. 2003
- Rogalinska M. *Alterations in cell nuclei during apoptosis.* Cell Mol Biol Lett,7 (4), 995-1018. 2002
- Rommel C y Hafen E. *Ras--a versatile cellular switch.* Curr Opin Genet Dev,8 (4), 412-8. 1998
- Rossman KL, Der CJ y Sondek J. *GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors.* Nat Rev Mol Cell Biol,6 (2), 167-80. 2005
- Ruoslahti E. *Structure and biology of proteoglycans.* Annu Rev Cell Biol,4 229-55. 1988
- Ruoslahti E. *Integrins.* J Clin Invest,87 (1), 1-5. 1991
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR y Braunwald E. *The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators.* N Engl J Med,335 (14), 1001-9. 1996
- Sahai E y Marshall CJ. *RHO-GTPases and cancer.* Nat Rev Cancer,2 (2), 133-42. 2002
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB y Erlich HA. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science,239 (4839), 487-91. 1988
- Sanford KK, Parshad R, Gantt RR y Tarone RE. *A deficiency in chromatin repair, genetic instability, and predisposition to cancer.* Crit Rev Oncog,1 (3), 323-41. 1989
- Santos E, Tronick SR, Aaronson SA, Pulciani S y Barbacid M. *T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes.* Nature,298 (5872), 343-7. 1982
- Sargent JM. *The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples.* Recent Results Cancer Res,161 13-25. 2003
- Scharf M, Bocksch W, Koschyk DH, Voelker W, Karsch KR, Kreuzer J, Hausmann D, Beckmann S y Gross M. *Use of intravascular ultrasound to compare effects of different strategies of lipid-lowering therapy on plaque volume and composition in patients with coronary artery disease.* Circulation,104 (4), 387-92. 2001
- Schirmacher V. *Tumor vaccine design: concepts, mechanisms, and efficacy testing.* Int Arch Allergy Immunol,108 (4), 340-4. 1995
- Schmidt F, Groscurth P, Kermer M, Dichgans J y Weller M. *Lovastatin and phenylacetate induce apoptosis, but not differentiation, in human malignant glioma cells.* Acta Neuropathol,101 (3), 217-24. 2001

- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D y Lowe SW. *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell,88 (5), 593-602. 1997
- Shannan B, Seifert M, Boothman DA, Tilgen W y Reichrath J. *Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control*. J Mol Histol,37 (5-7), 183-8. 2006
- Shaw LM y Olsen BR. *FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices*. Trends Biochem Sci,16 (5), 191-4. 1991
- Shay JW y Bacchetti S. *A survey of telomerase activity in human cancer*. Eur J Cancer,33 (5), 787-91. 1997
- Shih C, Padhy LC, Murray M y Weinberg RA. *Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts*. Nature,290 (5803), 261-4. 1981
- Sinensky M. *Recent advances in the study of prenylated proteins*. Biochim Biophys Acta,1484 (2-3), 93-106. 2000
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A y McGuire WL. *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science,235 (4785), 177-82. 1987
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM): www.seom.org Entrada: julio, 2010
- Somlyo AV, Phelps C, Dipierro C, Eto M, Read P, Barrett M, Gibson JJ, Burnitz MC, Myers C y Somlyo AP. *Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and growth of human prostate cancer xenotransplants*. Faseb J,17 (2), 223-34. 2003
- Sommer B y Carbajal V. *La inhibición de la cinasa de Rho como posible terapia de la hiperreactividad bronquial*. REV INST NAL ENF RESP MEX.22 (2). 101-08. 2009
- Sporn MB. *The war on cancer*. Lancet,347 (9012), 1377-81. 1996
- Spry M, Scott T, Pierce H y D'Orazio JA. *DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes*. Front Biosci,12 4191-207. 2007
- Sternlicht MD y Werb Z. *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol,17 463-516. 2001
- Stetler-Stevenson WG. *Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix*. Am J Pathol,148 (5), 1345-50. 1996
- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA y Kleiner DE, Jr. *Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis*. Faseb J,7 (15), 1434-41. 1993
- Takemoto M y Liao JK. *Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol,21 (11), 1712-9. 2001
- Tandon V, Bano V, Khajuria V, Pariphar A y Gupta S. *Pleiotropic effects of statins*. Indian J. Pharmacol 2: 77-85. 2005
- Tang Y, Olufemi L, Wang MT y Nie D. *Role of Rho GTPases in breast cancer*. Front Biosci,13 759-76. 2008

- Thoms KM, Kuschal C y Emmert S. *Lessons learned from DNA repair defective syndromes*. *Exp Dermatol*,16 (6), 532-44. 2007
- Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H y Kuhn K. *A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes*. *Eur J Biochem*,120 (2), 203-11. 1981
- Towbin H, Staehelin T y Gordon J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*,76 (9), 4350-4. 1979
- Tsuji T, Ishizaki T, Okamoto M, Higashida C, Kimura K, Furuyashiki T, Arakawa Y, Birge RB, Nakamoto T, Hirai H y Narumiya S. *ROCK and mDial antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts*. *J Cell Biol*,157 (5), 819-30. 2002
- Tumova S, Woods A y Couchman JR. *Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions*. *Int J Biochem Cell Biol*,32 (3), 269-88. 2000
- Turner SJ, Zhuang S, Zhang T, Boss GR y Pilz RB. *Effects of lovastatin on Rho isoform expression, activity, and association with guanine nucleotide dissociation inhibitors*. *Biochem Pharmacol*,75 (2), 405-13. 2008
- Valenti MT, Bertoldo F, Dalle Carbonare L, Azzarello G, Zenari S, Zanatta M, Balducci E, Vinante O y Lo Cascio V. *The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene?* *BMC Cancer*,6 49. 2006
- van der Rest M y Garrone R. *Collagen family of proteins*. *Faseb J*,5 (13), 2814-23. 1991
- Van Horssen PJ, Preijers FW, Van Oosterhout YV, Eling WM y De Witte T. *Relationship of the CD22 immunotoxin dose and the tumour establishment in a SCID mice model*. *Leuk Lymphoma*,39 (5-6), 591-9. 2000
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L y Alitalo K. *Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors*. *Cancer Res*,60 (2), 203-12. 2000
- Vieira JM, Jr., Mantovani E, Rodrigues LT, Delle H, Noronha IL, Fujihara CK y Zatz R. *Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction*. *Nephrol Dial Transplant*,20 (8), 1582-91. 2005
- Vogelstein B y Kinzler KW. *Cancer genes and the pathways they control*. *Nat Med*,10 (8), 789-99. 2004
- Voller A, Bartlett A y Bidwell DE. *Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques*. *J Clin Pathol*,31 (6), 507-20. 1978
- von der Mark K, von der Mark H y Goodman S. *Cellular responses to extracellular matrix*. *Kidney Int*,41 (3), 632-40. 1992
- Von Zee CL, Richards MP, Bu P, Perlman JI y Stubbs EB, Jr. *Increased RhoA and RhoB protein accumulation in cultured human trabecular meshwork cells by lovastatin*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,50 (6), 2816-23. 2009
- Waller JR y Nicholson ML. *Molecular mechanisms of renal allograft fibrosis*. *Br J Surg*,88 (11), 1429-41. 2001

- Wang IK, Lin-Shiau SY y Lin JK. *Induction of apoptosis by lovastatin through activation of caspase-3 and DNase II in leukaemia HL-60 cells.* Pharmacol Toxicol,86 (2), 83-91. 2000
- Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T y Narumiya S. *Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization.* Nat Cell Biol,1 (3), 136-43. 1999
- Weber JD, Hu W, Jefcoat SC, Jr., Raben DM y Baldassare JJ. *Ras-stimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27.* J Biol Chem,272 (52), 32966-71. 1997
- Wei L, Yang Y, Zhang X y Yu Q. *Altered regulation of Src upon cell detachment protects human lung adenocarcinoma cells from anoikis.* Oncogene,23 (56), 9052-61. 2004
- Weinberg RA. *The retinoblastoma protein and cell cycle control.* Cell,81 (3), 323-30. 1995
- Wejde J, Hjertman M, Carlberg M, Egestad B, Griffiths WJ, Sjovall J y Larsson O. *Dolichol-like lipids with stimulatory effect on DNA synthesis: substrates for protein dolichylation?* J Cell Biochem,71 (4), 502-14. 1998
- Wennerberg K, Rossman KL y Der CJ. *The Ras superfamily at a glance.* J Cell Sci,118 (Pt 5), 843-6. 2005
- Wilson TW, Alonso-Galicia M y Roman RJ. *Effects of lipid-lowering agents in the Dahl salt-sensitive rat.* Hypertension,31 (1 Pt 2), 225-31. 1998
- Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD y Penn LZ. *HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis.* Leukemia,16 (4), 508-19. 2002
- Wright LP y Philips MR. *Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras.* J Lipid Res,47 (5), 883-91. 2006
- Wu JJ, Woods PE y Eyre DR. *Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding.* J Biol Chem,267 (32), 23007-14. 1992
- Wyllie AH, Kerr JF y Currie AR. *Cell death: the significance of apoptosis.* Int Rev Cytol,68 251-306. 1980
- Xia Z, Tan MM, Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD y Penn LZ. *Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells.* Leukemia,15 (9), 1398-407. 2001
- Yamamoto T, Eckes B y Krieg T. *Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1.* Biochem Biophys Res Commun,281 (1), 200-5. 2001
- Ye S, Humphries S y Henney A. *Matrix metalloproteinases: implication in vascular matrix remodelling during atherogenesis.* Clin Sci (Lond),94 (2), 103-10. 1998
- Zhang J y Chen X. *The p53 family: prospect for cancer gene therapy.* Cancer Biol Ther,6 (1), 116-8. 2007
- Zhang JH y Xu M. *DNA fragmentation in apoptosis.* Cell Res,10 (3), 205-11. 2000

- Zhang S, Tang Q, Xu F, Xue Y, Zhen Z, Deng Y, Liu M, Chen J, Liu S, Qiu M, Liao Z, Li Z, Luo D, Shi F, Zheng Y y Bi F. *RhoA regulates G1-S progression of gastric cancer cells by modulation of multiple INK4 family tumor suppressors*. Mol Cancer Res,7 (4), 570-80. 2009
- Zhong WB, Liang YC, Wang CY, Chang TC y Lee WS. *Lovastatin suppresses invasiveness of anaplastic thyroid cancer cells by inhibiting Rho geranylgeranylation and RhoA/ROCK signaling*. Endocr Relat Cancer,12 (3), 615-29. 2005
- Zorbas H y Keppler BK. *Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell?* Chembiochem,6 (7), 1157-66. 2005
- Zwelling LA. *DNA topoisomerase II as a target of antineoplastic drug therapy*. Cancer Metastasis Rev,4 (4), 263-76. 1985
- Zwiebel JA, Su N, MacPherson A, Davis T y Ojeifo JO. *The gene therapy of cancer: transgenic immunotherapy*. Semin Hematol,30 (4 Suppl 4), 119-28; discussion 129. 1993

