



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Inhibidores de la vía Wnt como posible terapia antitumoral en sarcomas

Andrea Ochoa Alcalá

Grado de Bioquímica

Año Académico 2013-14

DNI del alumno: 43199579J

Trabajo tutelado por Regina Alemany Alonso

NO Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación.

Palabras clave del trabajo:

Sarcomas, Vía Wnt, inhibición de la proliferación, XAV939, IWR-1, IWP-2

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 SARCOMAS	5
1.1.1 TRATAMIENTO ESTÁNDAR DE LOS SARCOMAS	6
1.2. VÍA WNT/APC/B-CATENINA: IMPLICACIÓN EN LA SARCOMATOGÉNESIS	8
1.2.1 VÍA WNT/APC/B-CATENINA:	8
1.2.2 VÍA WNT Y CÁNCER	10
1.2.3 VÍA WNT Y SARCOMAS	11
1.2.4 NUEVAS MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE LA VÍA WNT.....	12
2. OBJETIVO	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. CULTIVO CELULAR	15
3.2. TRATAMIENTOS	16
3.3. VIABILIDAD CELULAR	17
3.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	18
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSIÓN	24
6. CONCLUSIÓN	27
7. ABREVIATURAS	27
8. BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

Introducción: Los sarcomas de parte blandas (SPB) son neoplasias malignas de origen mesenquimal entre los que encontramos más de 50 subtipos diferentes clasificados desde el punto de vista molecular. Los sarcomas se caracterizan por alteraciones moleculares en procesos celulares como la regulación del ciclo celular y la apoptosis con participación en alguno de ellos de la vía Wnt/APC/ β -catenina, entre otras vías de señalización. La activación de la vía canónica moviliza a la proteína β -catenina que controla el programa transcripcional de dicha vía. El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la inhibición de la vía de Wnt para evaluar su potencial diana terapéutica en diferentes subtipos de sarcomas. **Materiales y métodos:** Se utilizaron diferentes líneas de sarcomas de los subtipos, sarcoma sinovial, leiomioma y fibrosarcoma. Las células fueron tratadas con diferentes inhibidores de la vía de señalización Wnt que inhiben la acumulación de β -catenina (XAV939, IWR-1) y la producción del factor de crecimiento Wnt (IWP2) para evaluar su efecto sobre la viabilidad. La viabilidad celular se determinó con el kit CellTiter 96[®]AQueous One Solution. **Resultados y discusión:** La viabilidad de las líneas celulares de sarcoma con mutaciones en el gen *APC* u otras alteraciones de la vía no se vio afectada por los inhibidores de la vía Wnt estudiados. Por el contrario, la viabilidad de las líneas celulares de sarcoma como los genes *APC* y *β -CATENINA* no mutados fue significativamente disminuida por dichos compuestos, lo que sugiere que la sobreexpresión de β -catenina podría tener un papel importante en la viabilidad y proliferación de ciertos sarcomas. **Conclusión:** La inhibición de la vía Wnt podría presentar una terapia alternativa para el tratamiento de ciertos tipos de sarcomas de partes blandas.

ABSTRACT

Introduction: Soft Tissue Sarcomas (STS) are a heterogeneous group of mesenchymal malignancies with more than 50 different subtypes, classified from the molecular perspective. Sarcomas are characterized by molecular alterations in cellular processes, such as cell cycle regulation and apoptosis, wherein Wnt/APC/ β -catenina pathway, among other signaling pathways, is involved. Activation of the canonical pathway mobilizes the β -catenin protein, which controls the transcriptional program activated by this pathway. The aim of this work was to study the inhibition of Wnt potential as a therapeutic target in different sarcomas. **Material and method:** Different cell lines representing different subtypes of sarcomas, synovial sarcoma, leiomyosarcoma and fibrosarcoma, were used. Cells were treated with different inhibitors of the Wnt signalling pathway to inhibit the accumulation of β -catenin (XAV939, IWR-1) or the production of Wnt growth factor (IWP2) to evaluate their effect on cell viability. Cell proliferation was determined with the kit *CellTiter 96 AQueous One Solution*. **Results and discussion:** The viability of sarcoma cell lines with *APC* mutations in the *APC* gene or other alterations in the pathway was resistant to inhibition of the Wnt/APC/ β -catenin pathway. On Contrary, the viability of cells with wild-type *APC* and *B-CATENIN* was significant reduced by these compounds, suggesting that β -catenin overexpression may play an important role in the viability and proliferation of certain sarcomas. **Conclusions:** The inhibition of β -catenin and its transcriptional program in soft tissue sarcomas may represent a potential therapy for certain STS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sarcomas

Los sarcomas de partes blandas (SPB) son tumores malignos de origen mesenquimal (tejidos no epiteliales derivados de la capa mesodérmica embrionaria), entre los que se encuentran los liposarcomas que se desarrollan en el tejido adiposo; los fibrosarcomas que derivan de tejidos fibrosos y los leiomiomas que surgen en el tejido muscular liso como los subtipos más comunes en los adultos^{1,2}.

Estas neoplasias malignas afectan a alrededor de 200.000 pacientes nuevos al año en todo el mundo, aunque son mucho más prevalentes que incidentes³. Los sarcomas representan el 10% de todos los cánceres y sus tasas de mortalidad se aproximan al 50%.^{1,4} Los SPB son ligeramente más frecuentes en hombres que en mujeres, y pueden estar presentes en todas las edades, incluyendo en niños y adolescentes. La edad de máxima aparición en adultos se encuentra entre los 40 y 60 años³.

La mayoría de sarcomas son esporádicos con etiología desconocida, pero hay varios síndromes genéticos de predisposición bien descritos como por ejemplo síndromes con cierto tipo de translocaciones cromosómicas (Ver más abajo). Aunque se sospecha de la presencia de diversos factores ambientales que participan en la sarcomatogénesis, sólo dos de ellos han demostrado que promueven su desarrollo. Por una parte, el cloruro de vinilo, muy utilizado en la industria de plásticos participa sobre todo en el desarrollo del angiosarcoma hepático y por otra parte está la radiación ionizante, factor ambiental más común que aumenta el riesgo al desarrollo de los sarcomas².

Los sarcomas comprenden más de 50 subtipos histológicos diferentes. A diferencia de la mayoría de los tumores epiteliales, que se definen por el órgano de origen, los sarcomas pueden clasificarse en dos grandes categorías desde el punto de vista molecular^{2,4}. El primer grupo, que se presenta con mayor frecuencia en niños y adolescentes, está formado por sarcomas con alteraciones genéticas específicas y cariotipos casi-diploides, entre ellos destacan el sarcoma sinovial y el liposarcoma. Estos sarcomas se caracterizan por presentar translocaciones cromosómicas responsables de la formación de genes de fusión. El producto de la transcripción de estos genes alterados son proteínas quiméricas, importantes en el desarrollo de los tumores puesto que actúan como factores de transcripción anormales que desregulan la transcripción de múltiples genes implicados en vías de señalización celular claves^{2,5,6}. La proteína transcripcional aberrante parece importante para el mantenimiento del fenotipo maligno y determina el comportamiento del sarcoma

después de su iniciación. En la mayoría de casos, se trata de un evento aparentemente aleatorio, pero en casos raros podría estar relacionado con daños en el DNA inducidos por radioterapia ⁶.

El segundo grupo, presente con mayor frecuencia en adultos, lo constituyen sarcomas con alteraciones genéticas no específicas. Estos sarcomas carecen de translocaciones específicas y a menudo presentan inestabilidad genómica ⁵. Dentro de este grupo se encuentran los osteosarcomas, de origen en el tejido óseo, los angiosarcomas que se originan en la capa más interna de los vasos sanguíneos; los leiomiomas y los fibrosarcomas como los subtipos más comunes. La inactivación de la proteína supresora de tumores p53 parece ser un factor de diferenciación clave entre sarcomas con alteraciones genéticas no específicas y complejidad en el cariotipo. ⁶ Por este motivo, no es de extrañar que los pacientes con retinoblastoma hereditario tengan un mayor riesgo a desarrollar sarcomas, especialmente en los de tipo osteogénico ².

A pesar de las diferencias entre los distintos tipos de sarcomas y los avances en la terapia del cáncer, únicamente algunos subtipos muy concretos de sarcomas poseen características específicas que determinan su tratamiento. Sin embargo, actualmente la base del tratamiento para sarcomas sigue siendo la resección quirúrgica. La respuesta completa a la quimioterapia convencional es poco frecuente. La radioterapia mejora el control local de los tumores de alto grado, sin embargo, el control local no siempre se traduce con una mejor supervivencia en esta enfermedad ¹.

En la actualidad no hay pruebas convincentes de que la quimioterapia convencional altere la historia natural de los SPB. Por lo tanto, se necesitan estrategias más eficaces para mejorar el control sistémico y local ¹.

1.1.1 Tratamiento estándar de los sarcomas

A día de hoy la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia son los tratamientos estándar para la mayoría de los pacientes con sarcomas. Aunque el tratamiento más común es la resección completa del tumor mediante la intervención quirúrgica, la quimioterapia es actualmente el tratamiento más utilizado en pacientes con enfermedad avanzada inoperable o con metástasis. La quimioterapia convencional como tratamiento tiene una gran variabilidad entre los diferentes sarcomas ⁷.

La mayoría de los sarcomas que se desarrollan en niños y adolescentes como los rabdomiosarcomas, derivados del músculo estriado; los osteosarcomas y los sarcomas de Ewing, clasificados como tumores óseos a pesar de tener origen tanto mesodérmico como ectodérmico, son

muy sensibles a la quimioterapia, con tasas de supervivencia libre de enfermedad de aproximadamente el 75% a los 5 años. Por el contrario, la quimioterapia basada en doxorubicina e ifosfamida en sarcomas de alto grado en adultos, tales como liposarcomas, que derivan del tejido adiposo; fibrosarcoma y sarcoma sinovial, con origen en el líquido sinovial, en general no conllevan grandes resultados ⁷. La doxorubicina pertenece a la familia de las antracinas y sus principales mecanismos antitumorales son la interacción con el ADN por intercalación y bloqueo de la síntesis de ADN, ARN, o ambos. La ifosfamida es un agente alquilante. Ambos compuestos muestran tasas de respuesta que oscilan entre el 10% y el 25 % en sarcomas avanzados. Sin embargo, la combinación de ambos no mejora la tasa de supervivencia. Además de estos fármacos, existen otros compuestos en el tratamiento de sarcomas avanzados, entre los que podemos destacar la dacarbazina, gemcitabina y taxanos, entre muchos otros ⁷⁻⁹.

A pesar de que en los últimos años, el número y la variedad de opciones de tratamiento para los pacientes de cáncer se han incrementado significativamente, efectos secundarios tales como la cardiotoxicidad pueden restringir el uso de algunas terapias oncogénicas. Estos efectos secundarios se están convirtiendo en factores importantes que afectan a la morbilidad y la mortalidad de los pacientes que sobreviven al cáncer ¹⁰. Estos eventos cardiotóxicos se clasifican generalmente por su momento de aparición, aguda (ocurre durante o inmediatamente después del tratamiento), precoz (que ocurre dentro de 1 año de exposición) o tardía (que se producen 1 o más años después de la exposición inicial). La disfunción cardíaca a corto y largo plazo durante el tratamiento oncológico se puede manifestar de varias maneras diferentes. Las arritmias cardíacas, alteraciones del electrocardiograma, el síndrome de pericarditis-miocarditis y otras manifestaciones son las más comunes, y se manifiestan clínicamente como disminución del rendimiento, dificultad para respirar, aumento de peso y edema han sido descritas como formas tempranas. Dentro de los quimioterápicos que producen cardiotoxicidad elevada, se pueden destacar a las antraciclinas, donde encontramos la doxorubicina y la epirubicina, y a los taxanos entre otros. Las terapias de combinación pueden aumentar aún más la cardiotoxicidad a corto y largo plazo. Complicaciones cardiotóxicas tardías se han observado en el 8,3% de los pacientes hasta 30 después de someterse al tratamiento. Los factores genéticos parecen aumentar la probabilidad de efectos secundarios ¹¹.

Los mecanismos de la lesión cardíaca después de la quimioterapia son muy diferentes de los que participan en la miocardiopatía isquémica o genética. Aunque los mecanismos moleculares y genéticos de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas no se conocen del todo, se cree que la topoisomerasa-II β (Top2b) tiene un papel central. La doxorubicina además de ser un agente de intercalación potente de ADN, se une e inhibe a la enzima topoisomerasa-II β . Al actuar sobre Top2b

se promueve la ruptura de la cadena de ADN, lo que conlleva la producción de radicales libres de oxígeno y una biogénesis mitocondrial defectuosa. Estudios recientes muestran que la delección de Top2b en ratón protege a los cardiomiocitos de estas rupturas causadas por la doxorubicina. Además, esta delección de Top2b protege a los ratones de la cardiotoxicidad provocada por este compuesto antitumoral ¹².

Por todo ello existe la necesidad de mejorar las terapias actuales y decantarse por terapias más dirigidas. Este hecho es especialmente relevante, ya que se ha demostrado que las terapias moleculares dirigidas son eficaces en determinados tipos de sarcomas como es el caso del imatinib en los tumores de estroma gastrointestinal (GIST) que alcanza una respuesta parcial o enfermedad estable en aproximadamente el 80% de los pacientes con GIST avanzado o metastásico, a menudo en cuestión de días, con algunos pacientes en tratamiento durante diez años ¹³.

1.2. Vía Wnt /APC/ β -catenina: implicación en la sarcomatogénesis

1.2.1 Vía Wnt/APC/ β -catenina:

La señalización Wnt es una de las vías de transducción de señal más conservadas en la evolución y desempeña un papel esencial en varios procesos biológicos, entre ellos la homeostasia del tejido adulto y el desarrollo embrionario, donde es uno de los mecanismos fundamentales de proliferación y polaridad celular y determinación de destino celular ^{14,15}.

Wnt es una familia de 19 factores de crecimiento glicoprotéicos que tienen un papel crucial en diversos procesos biológicos, en particular: en la biología de las células madre; desarrollo y diferenciación cardíaca; angiogénesis y envejecimiento, entre otros. Una perturbación de los niveles de ligandos Wnt o una alteración de las proteínas necesarias para la transducción de su señal pueden provocar un defecto en el desarrollo embrionario o contribuir a la etiología del cáncer en adultos. ¹⁶ Su señalización celular se diversifica en al menos tres ramas: la vía canónica Wnt/ β -catenina, la vía no canónica de la polaridad planar, y la vía Wnt/ Ca^{2+} ¹⁷.

La activación de la vía canónica, en la que se centra este trabajo, moviliza a la proteína β -catenina, que controla el programa transcripcional activado por dicha vía. La mayoría de β -catenina endógena se encuentra en las uniones adherentes de las células epiteliales, donde interacciona con

E-cadherina y α -cadherina para contribuir a la adhesión celular. En todas las células, la β -catenina que no está asociada a cadherinas se degrada rápidamente por el proteosoma en el citoplasma¹⁸.

En ausencia de Wnt, la proteína citoplasmática β -catenina se degrada completamente por la acción de un complejo de destrucción, constituido por los supresores tumorales Axina y adenomatous poliposis coli (APC) y por las proteínas caseína quinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa quinasa 3-beta (GSK3 β) (Fig. 1)¹⁵. Las quinasas CK1 y GSK3 β fosforilan secuencialmente residuos conservados de Ser-33 y 37 y Thr-41 en el extremo amino terminal de β -catenina, lo provoca que ésta sea reconocida por la subunidad E3 de la ubiquitina ligasa β -Trcp, quien la poliubiquitina y favorece posteriormente su degradación proteolítica por el proteosoma^{15,17}. Esta eliminación continua de β -catenina le impide su translocación al núcleo¹⁴.

La vía de transducción Wnt se activa cuando un ligando Wnt se une a un receptor Frizzled (Fz) de siete pasos transmembrana y su correceptor LRP5/6, proteína receptora relacionada con el receptor LDL, con un único paso transmembranal¹⁵. La formación del complejo Wnt-Fz-LRP6 induce la fosforilación del dominio intracelular de LRP5/6 a través de acciones combinadas de CK1 y GSK3. El dominio LRP5/6 hiperfosforilado se une a la proteína Axina con alta afinidad y ésta es inactivada y/o degradada, alejándola del complejo de destrucción¹⁸. Puesto que la concentración de Axina es limitante en la célula, su unión a Fz-LRP5/6 provoca que el complejo de degradación se inactive bloqueando la degradación de β -catenina. La señalización también requiere la proteína citoplasmática Dishevelled (DSH), que como Axina, es reclutada rápidamente por el receptor Frizzled y resulta fosforilada. DSH bloquea la degradación de β -catenina, posiblemente desplazando GSK3 β de Axina^{15,17,18}. Todos estos eventos conducen a la inhibición del complejo de destrucción y provoca la acumulación de β -catenina en el citoplasma y su translocación al núcleo. En el núcleo β -catenina se une a los factores de transcripción TCF/LEF y al DNA y activa la expresión de genes diana Wnt que promueven la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, entre los que podemos destacar la *CICLINA D1*, *C-MYC*, *TCF-1* y *CDC25A*¹⁵. En ausencia de la señal de Wnt, las proteínas TCF/LEF reprimen la expresión de sus genes diana a través de la unión a co-represores transcripcionales como Groucho.¹⁴

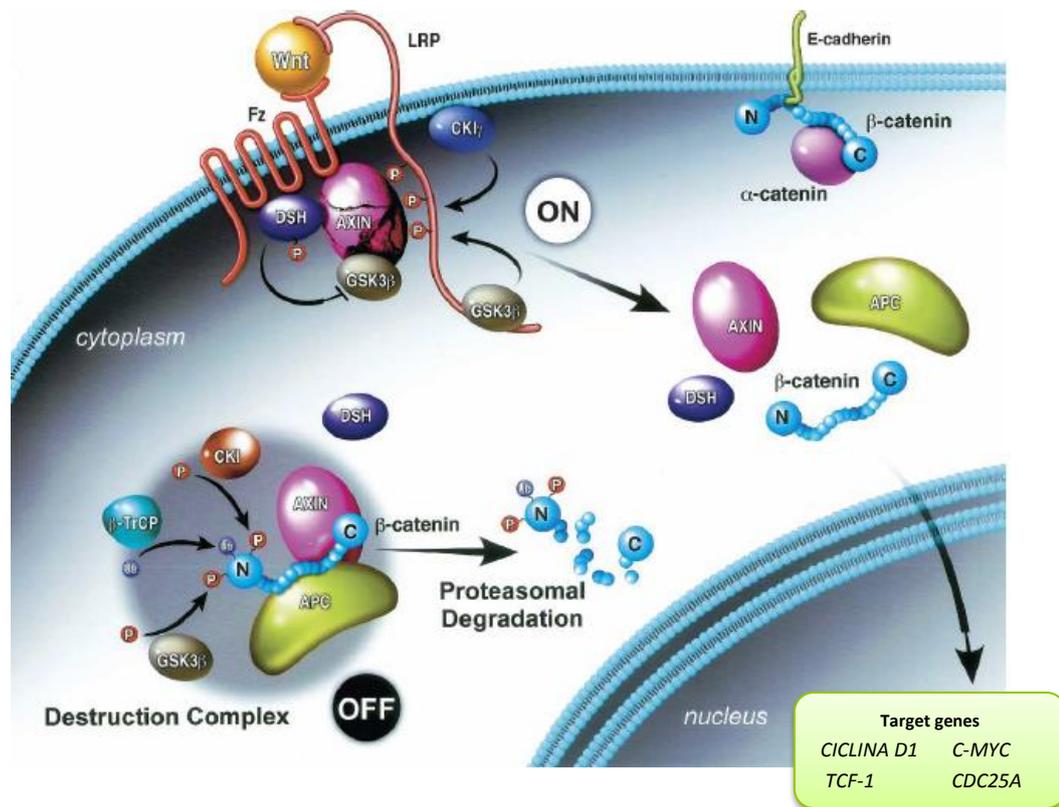


Figura 1. Regulación de la vía de señalización Wnt.

Los reguladores clave de la vía de señalización a través de Wnt se encuentran en la membrana plasmática y formando un complejo en el citoplasma. En ausencia de ligandos Wnt, β-Catenina se une a un complejo de destrucción formado por APC, axina, CK1 y GSK3β, que marca a β-catenina para ser degradada en los proteosomas ("OFF"). La señalización de Wnt promueve la fosforilación de CK1 y GSK3β y la hiperfosforilación de LRP5 / 6 y DSH que reclutan conjuntamente Axina al complejo receptor en la membrana plasmática ("ON"), donde se somete a la degradación proteolítica. β-Catenina al no ser fosforilada no se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo donde se une a las proteínas de unión al DNA, TCF/LEF y activa la expresión de los genes diana Wnt ¹⁸. Imagen modificada de: Willert K, Jones KA. *Wnt signaling: is the party in the nucleus?* *Genes Dev.* 2006;20(11):1394-1404

1.2.2 Vía Wnt y cáncer

El control y la coordinación de la vía Wnt son necesarios para mantener el equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular, mecanismos fundamentales tanto durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta, como parte de la regeneración celular y homeostasis de los tejidos ¹⁹. La vía Wnt/β-catenina está implicada en el mantenimiento de tejidos y células progenitoras de los tejidos epiteliales incluyendo el tracto gastrointestinal, la piel, la glándula mamaria y el pulmón ²⁰. Ciertos carcinomas que surgen de estos mismos tejidos a menudo muestran una activación aberrante de dicha vía de transducción de señal por mecanismos como mutaciones en las proteínas APC, β-catenina o Axina, entre otros, y/o a través de la activación autocrina de Wnt ^{1,20}.

La alta frecuencia de mutaciones en la vía Wnt en muchos tipos de cáncer resalta la importancia de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la carcinogénesis ¹⁶. En este contexto, la primera conexión entre la señalización aberrante Wnt/ β -catenina y el cáncer colorrectal se encuentra en la poliposis adenomatosa familiar (FAP), enfermedad de herencia autosómica dominante en la que se presenta una mutación en el gen *APC*. Los pacientes que heredan un alelo *APC* mutado desarrollan cientos de pólipos en el colon que a edad temprana se transforman en cáncer, debido a la acumulación de β -catenina nuclear ¹⁹. En otros carcinomas colorectales se pueden encontrar otras mutaciones en esta vía de señalización, como por ejemplo mutaciones estabilizantes de β -catenina o mutaciones en el complejo de destrucción de β -catenina formado por *APC/Axina/GSK3 β* ¹⁹.

Sorprendentemente, algunos tumores pueden surgir como consecuencia de la pérdida selectiva de la señalización de Wnt/ β -catenina. Un tercio de los tumores en glándulas sebáceas contienen una doble mutación en el factor de transcripción LEF-1 que deteriora su capacidad de unión a β -catenina, lo que provoca que funcione como un inhibidor de la señalización. La pérdida de señalización Wnt se correlaciona con la expresión de proteínas marcadoras sebáceas que expresan una forma truncada del extremo N-terminal de LEF-1 ¹⁸.

Aunque las mutaciones en los genes tales como *LRP5* y *LRP6* se cree que inhiben la señalización de Wnt y no se han caracterizado en cáncer, pero sí se han identificado en otros trastornos, incluyendo enfermedades de la arteria coronaria y desórdenes neurodegenerativos ¹⁶.

La señalización Wnt está también implicada en las vías de desarrollo que regulan la autorrenovación y diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC). Las MSC aisladas de la médula ósea pueden diferenciarse dando lugar a los tejidos óseo, adiposo, conectivo, condrogénico y miogénico ²⁰. Al ser la vía Wnt un elemento común en la regulación de la renovación celular de células madre, y a su vez estar implicada en mantenimiento de células cancerosas, la capacidad de modular la vía Wnt, ya sea positiva o negativamente puede ser de gran relevancia terapéutica.

1.2.3 Vía Wnt y sarcomas

El conocimiento acerca de la implicación de la vía de transducción de señal Wnt en la sarcomatogénesis es, a día de hoy, limitado. Por ahora se sabe que los sarcomas se inician comúnmente a partir de la regulación positiva de la señalización de Wnt autocrina, y con menos frecuencia de mutaciones en los componentes intracelulares, de una célula madre mesenquimal asociado con su expansión clonal y de la acumulación de alteraciones adicionales que contribuyen a la transformación maligna ²⁰.

Su implicación en el osteosarcoma ha sido hasta el momento lo que más se ha estudiado, ya que esta vía juega un papel importante en la diferenciación ósea, proliferación y apoptosis de osteocitos. El osteosarcoma es el tipo más común de cáncer de hueso primario, con un pico de incidencia en la adolescencia. Este tumor tiene una alta propensión a la invasión local y metástasis a distancia, siendo la más común, la metástasis pulmonar, presenten en aproximadamente el 80% de los pacientes. Aunque la cirugía y el tratamiento con quimioterapia alcanzan curar entre el 60 y 70% de los casos, la supervivencia a largo plazo para los pacientes con recaída es únicamente del 20% ²¹.

La señalización canónica de Wnt juega un papel crucial en el desarrollo del hueso. Se requiere de esta vía para la iniciación, establecimiento del patrón de crecimiento óseo y para la morfogénesis. Además tiene relevancia en el proceso de regeneración ósea (reparación de fracturas) ^{22,23}. Estudios recientes demuestran que la vía Wnt está implicada críticamente en tumores malignos de hueso. La sobreexpresión de numerosos componentes de esta vía, ligandos Wnt y receptores Fz y LRP5/6, conlleva a la desregulación de la señalización de β -catenina y está presente en los osteosarcomas ²³.

Aparte de los osteosarcomas, estudios recientes resaltan el importante papel potencial de la señalización Wnt en el desarrollo de otros sarcomas ¹. En este contexto, se ha demostrado la desregulación de la vía Wnt canónica en sarcomas sinoviales, liposarcomas y fibrosarcomas ²⁴. En ellos se ha descrito la activación de la vía de señalización Wnt por vía autocrina y por la presencia de β -catenina nuclear. Además y en contraposición a lo que ocurre en el cáncer de colon, en el cual las principales dianas transcripcionales son *C-MYC*, *TFC-1* y *CICLINA D1*, se ha descrito que en sarcomas la diana transcripcional clave para su progresión es *CDC25A*., cuya expresión es regulada por β -catenina. En conjunto, estos datos apoyan la implicación de la vía Wnt en la sarcomatogénesis y el potencial de la inhibición de esta vía como estrategia terapéutica ²⁰. En todos ellos se ha descrito la participación de mutaciones y / o niveles de expresión alterados de los reguladores y genes diana de la vía. Como mecanismo diferenciador de otros tipos de tumores en los que la activación de la vía se da por mutación en determinados componentes, en sarcomas el mecanismo de activación principal se da también por vía autocrina por la sobreexpresión de los factores secretados Wnt ²⁵.

1.2.4 Nuevas moléculas inhibidoras de la vía Wnt

Ya que la desregulación de la vía de señalización Wnt a través de mutaciones y expresión diferencial de proteínas de la vía puede conducir a respuestas únicas en diferentes tipos de

sarcomas, la identificación de pequeñas moléculas dirigidas a componentes específicos de la vía puede ser terapéuticamente útil¹⁶.

Como se ha comentado anteriormente una característica clave de la vía es la destrucción de β -catenina por el complejo de destrucción para evitar su acumulación en el citoplasma y consecuentemente su translocación al núcleo. El ensamblaje eficiente de este complejo de destrucción depende de la estabilidad de sus componentes principales. Axina ha sido identificada como el factor limitante en la regulación eficaz del complejo de destrucción en líneas celulares que expresan mutaciones en *APC*. Por este motivo se cree que la regulación de los niveles de Axina es fundamental para poder asegurar una correcta señalización Wnt. Sin embargo, estos mecanismos moleculares de regulación homeostática entre la activación e inhibición en el complejo de destrucción son difíciles de alcanzar.²⁶

Recientemente, se ha identificado un compuesto de bajo peso molecular, llamado XAV939, que puede prolongar la vida media de la proteína Axina y promover la degradación de β -catenina a través de la inhibición de Tanquirasas (Tnks) (Fig. 2)²⁶. Tnks 1 y 2 son proteínas de poliribosa-adenosin fosfato, con actividad polimerasa²⁷. Están involucradas en la vía en una variedad de cánceres, incluyendo el mieloma múltiple, leiomioma, leucemia, linfomas, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de vejiga de alto grado no Hodgkin y neuroblastomas^{28,29}. Las Tnks se unen directamente a la proteína Axina. La unión entre Axina y Tnks se realiza a través de su dominio TBD, dominio de unión a Tanquirasa, lo que provoca la disminución de los niveles intracelulares de Axina²⁹. El resultado de la acción de Tnks sobre la proteína Axina conlleva la acumulación de β -catenina en el núcleo, al no haber Axina suficiente para formar el complejo de destrucción²⁸. Diversos artículos demuestran una inhibición de la proliferación celular en células tumorales de neuroblastomas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama y leucemias después del tratamiento con XAV939, que evita la acumulación de β -catenina (Fig. 3)^{28 30-32}.

Otro compuesto llamado IWR1, que forma parte de la familia de inhibidores IWR, inhibidores que también modula el funcionamiento de la vía Wnt (Fig. 2). Este compuesto, al igual que XAV939, también inhibe la acumulación de β -catenina citoplasmática por unión a Tnks, aumentando la estabilidad del complejo de destrucción por unión a Axina (Fig. 3)²⁶.

Por último, el compuesto IWP2 pertenece a la familia de inhibidores IWP, inhibidores que actúan sobre la producción de Wnt (Fig. 2)³³. Esta pequeña molécula tiene como diana molecular la porcupina (Porcn), miembro de la familia de O-aciltransferasa unidas a la membrana plasmática. Esta aciltransferasa cataliza la palmitoilación de Wnt, que es esencial para su poder de señalización (Fig.3)

^{33,34}. Puesto que Porcn no tiene ninguna función conocida más allá de su papel en la biogénesis de los Wnt, actualmente se cree que la inhibición de Porcn podría ser una estrategia efectiva para la supresión de la señalización Wnt en términos generales y por tanto tener aplicaciones anticancerígenas ^{34, 35}.

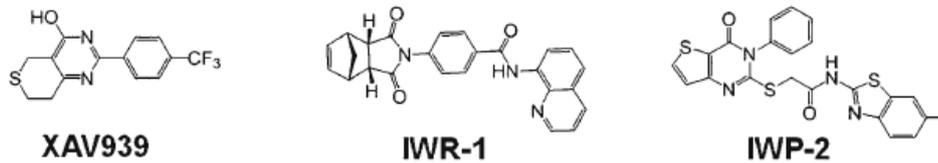


Figura 2. Pequeñas moléculas inhibidoras de la señalización Wnt. ³⁶

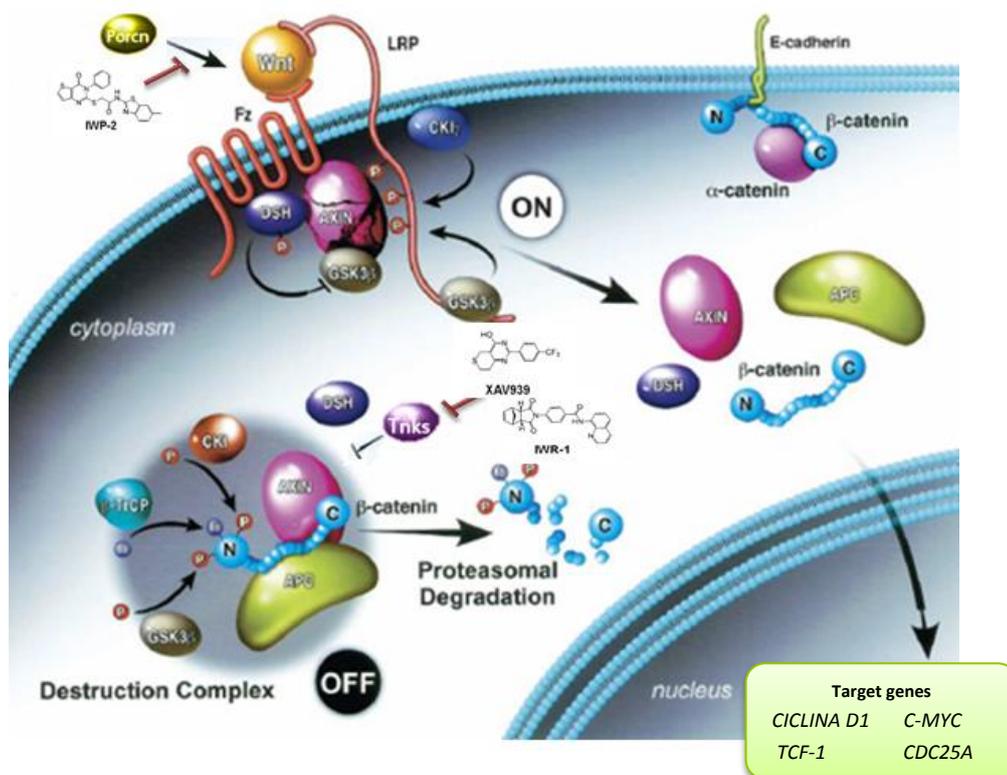


Figura 3. Descripción general de la regulación de la señalización Wnt por moléculas inhibidoras pequeñas.

XAV939 e IWR1 son inhibidores de respuesta a Wnt. Éstos actúan sobre la proteína Axina, prolongando su vida media a través de la inhibición de Tnks. De esta manera se promueve la formación del complejo de destrucción de β-catenina, evitando así la proliferación celular ^{26,33}. IWP-2, inhibidor que actúa sobre la producción de Wnt, actúa sobre la proteína porcupina (Porcn) encargada de la palmitoilación de Wnt, esencial para la señalización. De esta manera IWP-2 impediría que el ligando se uniera al receptor Frizzled (Fz) ³³. Imagen modificada de: Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? Genes Dev. 2006;20(11):1394-1404

2. OBJETIVO

El principal objetivo de este trabajo ha sido evaluar el potencial de la inhibición de la vía de señalización Wnt como diana terapéutica en sarcomas mediante el estudio de la viabilidad celular.

Para poder alcanzar dicho objetivo se ha estudiado *in vitro* el efecto en la viabilidad celular de nuevos inhibidores de la vía Wnt, como son los compuestos XAV939, IWR-1 y IWP-2, sobre diferentes líneas celulares de sarcomas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

Las líneas celulares humanas utilizadas en el presente estudio fueron SW982 (Sarcoma sinovial), SK-UT-1 (Leiomioma) y HT1080 (Fibrosarcoma) (Tabla 1). Todas las líneas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Las células de sarcoma sinovial se cultivaron en medio L-15 de Leibovitz (Invitrogen SA, Barcelona, España), mientras que las células de leiomioma se cultivaron en medio DMEM (del inglés "Dulbecco's Modified Eagle Medium" LabClinics SA, Barcelona, España), rico en glucosa 4,5 g/l y suplementado con aminoácidos no esenciales (dilución 1:100) y piruvato de sodio a 1 mM. Por otra parte, las células de fibrosarcoma se cultivaron en medio EMEM (del inglés "Eagle's minimal essential medium" LabClinics SA).

Los tres medios de cultivo contenían L-glutamina a 2mM y se complementaron con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (LabClinics SA), 100 unidades / ml de penicilina y 100 µg / ml de estreptomina (Invitrogen SA) y HEPES (del inglés "4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid" a 1mM Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Las células fueron mantenidas en un incubador a 37°C, con un 5% de CO₂ y en una atmósfera húmeda.

Tabla 1. Características de las líneas celulares *

TIPO	LINEA CELULAR	TEJIDO DE ORIGEN	MUTACIONES GENÉTICAS
Sarcoma sinovial	SW982	Líquido sinovial	B-RAF CDKN2A
Leiomioma	SK-UT-1	Músculo liso (útero)	RB1 TP53 PTEN APC P12CA
Fibrosarcoma	HT1080	Tejido conectivo (óseo)	PTEN BRAF CDKN2A TP53

* Información obtenida de:

Sanger Institute, Cancer Cell Line Project: http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines/

3.2. Tratamientos

Las células de sarcoma sinovial, leiomioma y fibrosarcoma se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de entre $8 \cdot 10^3$ - $10 \cdot 10^3$ células por pocillo en 200 μ l de su respectivo medio de cultivo y se cultivaron durante 24h.

Una vez que las células tumorales alcanzaron un 60-70% de confluencia fueron tratadas con concentraciones crecientes (0,5 – 50 μ M) de los nuevos fármacos inhibidores de la vía Wnt: XAV939 (Sigma-Aldrich), IWR-1 (Sigma-Aldrich) y IWP-2 (Sigma-Aldrich). En todos los tratamientos las soluciones madre de los fármacos se prepararon a 20 mM (XAV939), 25 mM (IWR-1) y 10 mM (IWP-2) en dimetilsulfóxido (DMSO).

La concentración final de DMSO utilizada con las células a las diferentes concentraciones de los inhibidores estudiados fue de 0,5%. Para poder comparar las células del grupo vehículo con las células tratadas, las células vehículo se trataron con DMSO al 0,5 %. En experimentos previos se

demonstró que una concentración del 0,5 % de DMSO no tiene ningún efecto sobre la viabilidad de ninguna de las líneas estudiadas.

3.3. Viabilidad celular

Para probar el efecto de los inhibidores XAV939, IWR-1 y IWP-2 en la proliferación celular, las células fueron expuestas a concentraciones crecientes de XAV939, IWR-1 y IWP-2 (0,5 a 50 μM) durante 48 y 72h. Asimismo en el grupo vehículo se trataron las células con DMSO (0,5%). Transcurrido este tiempo, la viabilidad celular se determinó con el kit CellTiter 96[®] AQueous One Solution (Promega) según las instrucciones del fabricante. Se midió la absorbancia a 490 nm en las tres líneas celulares en un lector de placas ELISA (Lector PowerWave XS, Bio-tek Instruments, Inc., USA).

El kit CellTiter 96[®] AQueous One Solution es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad. El kit contiene un compuesto de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, con sal interna (MTS) y un reactivo de acoplamiento de electrones, etosulfato de fenazina (PES). El compuesto de tetrazolio MTS es bio-reducido por las células en un producto coloreado que es soluble en medio de cultivo llamado formazán (Fig. 4). Esta conversión se lleva a cabo por NADPH o NADH producido por enzimas deshidrogenasa en las células metabólicamente activas. La cantidad de producto formazán es medida por la absorbancia a 490 nm y es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

La media del porcentaje de supervivencia de las células tratadas en relación con la de las células vehículo se estimó a partir de tres experimentos independientes, realizados por cuadruplicado.

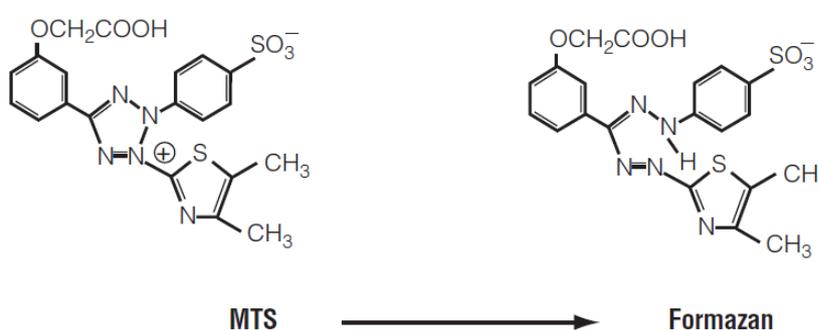


Figura 4. Estructura del tetrazolio MTS y su producto bio-reducido, formazán.

3.4. Análisis de datos

Los resultados están expresados como la media \pm SEM del inglés "Standard Error of Mean". Para llevar a cabo la estadística se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test Bonferroni para comparaciones múltiples.

Las diferencias entre los distintos grupos fueron consideradas significativas con un nivel de probabilidad (P) inferior a 0,05, $P < 0,05$. Todos los resultados se calcularon con los programas Microsoft Excel de Microsoft Corporation, (Redmond, Washington, USA) y GraphPad Prism de GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

El efecto sobre la viabilidad de las células en sarcoma sinovial SW982, de leiomioma SK-UT-1 y fibrosarcoma HT1080 de los compuestos XAV939, IWR-1 y IWP-2 fue determinado durante un período de 48 y 72 h.

En células de sarcoma sinovial SW982 el compuesto XAV939 a las concentraciones entre 1 y 50 μM no inhibió significativamente la viabilidad celular a 48 h (inhibición de un $4,3 \pm 0,90$ % de la proliferación a 30 μM y de un $12,0 \pm 6,71$ % a 50 μM). Sin embargo a 72 h de tratamiento, XAV939 a 30 y a 50 μM disminuyó la viabilidad de manera significativa un $23,4 \pm 11,64$ % y $44,1 \pm 4,68$ %, respectivamente, comparando las células tratadas con el vehículo (control) (Fig. 5 A).

En las células de leiomioma SK-UT-1 no se observó ningún efecto significativo sobre su viabilidad al ser tratadas con XAV939 a ninguna de las concentraciones estudiadas (Fig. 5 B).

Finalmente, en el tratamiento de las células de fibrosarcoma HT1080 con el fármaco XAV939, a partir de una concentración de 0,5 μM ya se pudo observar una disminución significativa de la viabilidad celular de un $20,0 \pm 3,79$ % a las 48 h de tratamiento. A medida que se aumentó la concentración del compuesto se pudo apreciar una disminución progresiva de la viabilidad, hasta alcanzar a 50 μM un porcentaje del $74,6 \pm 2,74$ % de disminución con respecto a las células control. Aunque a las 72 h y a bajas concentraciones no se observó esta inhibición de la viabilidad tan acusada del tratamiento, XAV939 a 5, 10 y 50 μM también inhibió a este tiempo un $53,9 \pm 4,07$ %, $59,4 \pm 5,16$ % y $77,7 \pm 0,45$ %, respectivamente, la viabilidad de estas células (Fig. 5 C).

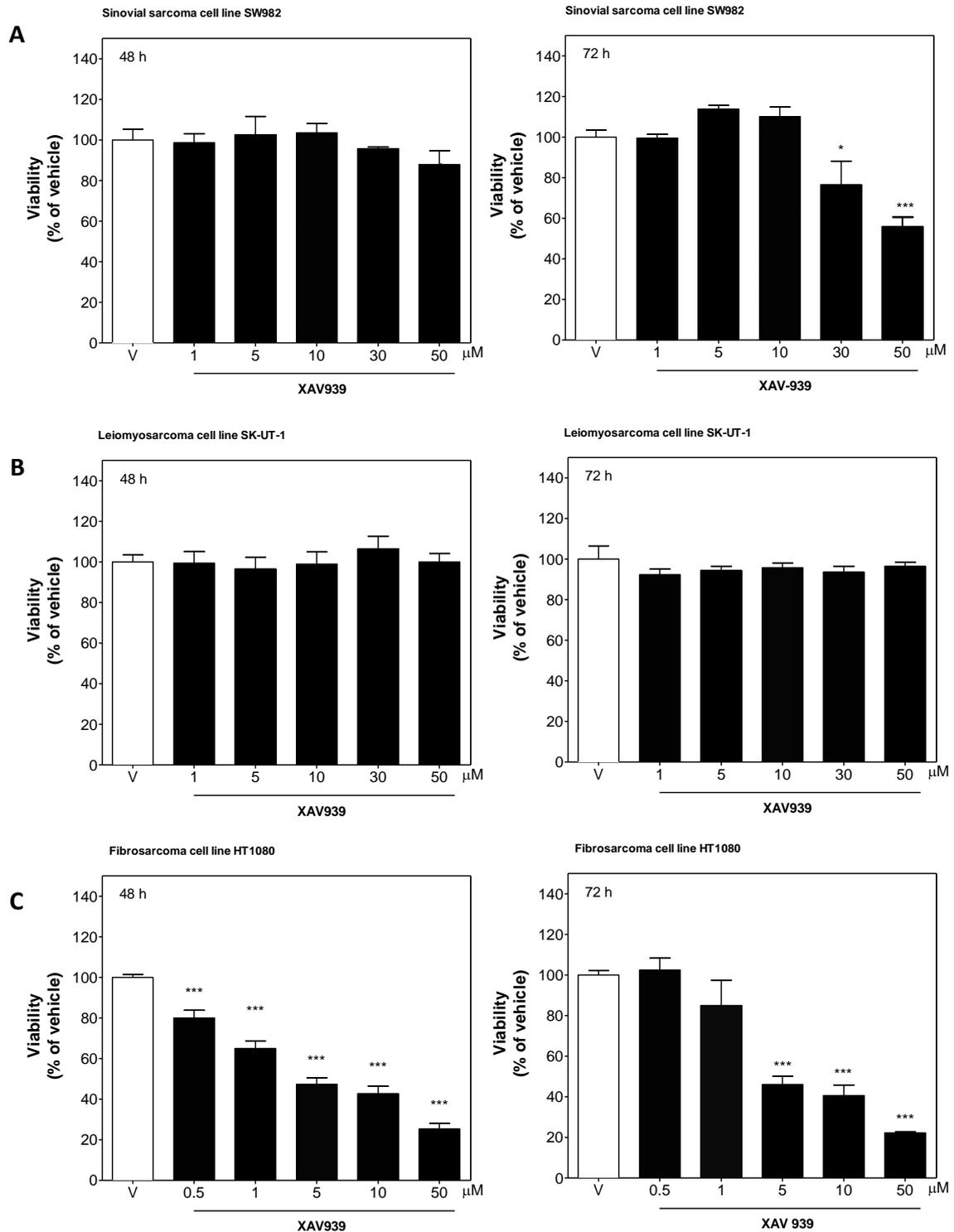


Figura 5. Efecto del tratamiento con el compuesto XAV939 sobre la viabilidad de líneas celulares de sarcomas.

Viabilidad celular estimada a partir del kit CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega) (descrito en Materiales y Métodos) después de 48 h (izquierda) y 72 h (derecha) de tratamiento con vehículo (0,5% DMSO) o XAV939 (0,5 - 50 μM) en **A)** células SW982 de sarcoma sinovial, **B)** células SK-UT1 de leiomyosarcoma y **C)** células HT-1080 de fibrosarcoma. Cada columna representa la media ± SEM de tres experimentos independientes por cuadruplicado. * P < 0,05 y *** P < 0,001 comparando con las células tratadas con el vehículo.

La inhibición de la viabilidad por el compuesto IWR-1 a una concentración de 30 μM en células de sarcoma sinovial SW982 alcanzó un $27,9 \pm 4,70$ % significativo de muerte celular respecto al vehículo a las 48 h de tratamiento, mientras que a 50 μM la viabilidad disminuyó de manera significativa un $25,5 \pm 4,69$ %. Por otra parte el efecto inhibitorio de este compuesto se acentuó a las 72 h de tratamiento, observándose un aumento significativo de la inhibición de la viabilidad de un $22,1 \pm 3,02$ % y un $42,9 \pm 3,94$ % a 30 μM y 50 μM respectivamente, comparando las células tratadas con el vehículo (Fig. 6 A).

La inhibición de la viabilidad en células leiomioma SK-UT-1 causada por el tratamiento con el compuesto IWR-1 alcanzó un porcentaje significativo máximo de inhibición de un $38,5 \pm 3,47$ % a las 48 h de tratamiento. De manera parecida a las 72 h de tratamiento con 30 μM y 50 μM del compuesto se obtuvo una disminución significativa de la proliferación celular de un $22,5 \pm 2,81$ % y $29,0 \pm 2,96$ % respectivamente, comparando las células tratadas con el vehículo a las concentraciones de (Fig. 6 B).

En último lugar, en el tratamiento con el compuesto IWR-1 en células de fibrosarcoma HT1080 se observó un descenso significativo máximo en la viabilidad celular de un $30,7 \pm 8,00$ % a 10 μM después de 48 de tratamiento, con respecto al control. No obstante a las 72 h de tratamiento el efecto inhibitorio del compuesto no fue significativo, llegando únicamente a alcanzar un $9,29 \pm 4,98$ % a una concentración de 10 μM y un $21,0 \pm 9,68$ % a una concentración de 50 μM , comparando las células tratadas con el vehículo (Fig. 6 C).

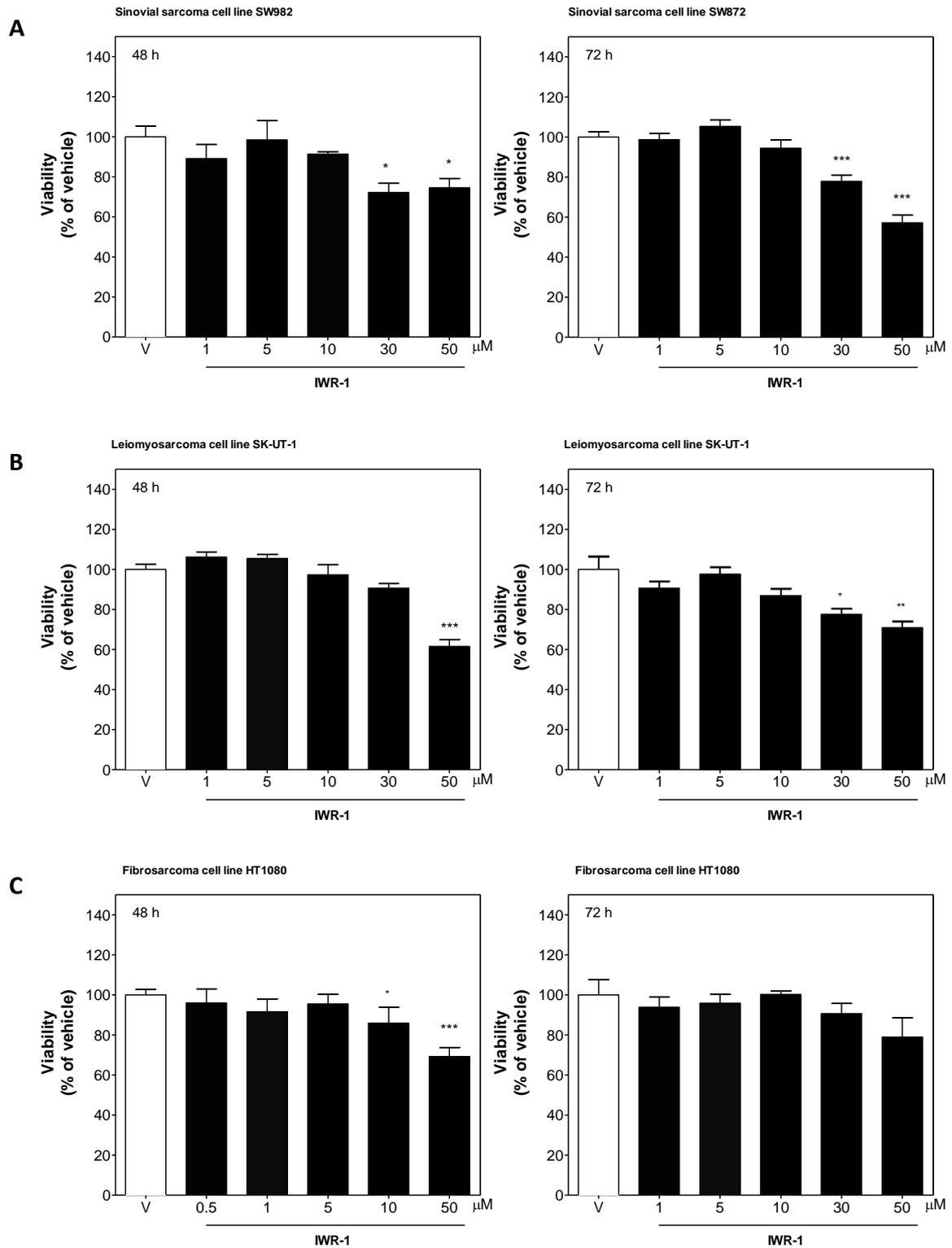


Figura 6. Efecto del tratamiento con el compuesto IWR-1 sobre la viabilidad de líneas celulares de sarcomas.

Viabilidad celular estimada a partir del kit CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) (descrito en Materiales y Métodos) después de 48 h (izquierda) y 72 h (derecha) de tratamiento con vehículo (0,5% DMSO) o IWR-1 (0,5 - 50 μM) en **A)** células SW982 de sarcoma sinovial, **B)** células SK-UT1 de leiomyosarcoma y **C)** células HT-1080 de fibrosarcoma. Cada columna representa la media ± SEM de tres experimentos independientes por cuadruplicado. * P < 0,05, ** P < 0,01 y *** P < 0,001 comparando con las células tratadas con el vehículo.

En el tratamiento con el compuesto IWP-2 en células de sarcoma sinovial SW982 se observó un descenso no significativo en la viabilidad a las 48 h de tratamiento de un $8,58 \pm 7,29$ % y un $13,93 \pm 2,64$ % a concentraciones de 5 y 10 μM , respectivamente, con respecto al vehículo. Por otra parte a concentraciones ≥ 30 μM aunque se alcanzaron descensos significativos en la proliferación de un $33,27 \pm 4,62$ %, comparando las células tratadas con el vehículo, al microscopio óptico se observó la presencia de cristales, posiblemente debido a la precipitación del compuesto en el medio de cultivo, por lo que estos resultados no se tuvieron en cuenta (Fig. 7 A).

En las células de leiomioma SK-UT-1 no se observó ningún efecto significativo sobre su viabilidad al ser tratadas con IWP-2 a ninguna de las concentraciones estudiadas ni a las 48 h ni a las 72 h de tratamiento (inhibición de un $6,2 \pm 3,34$ % de la proliferación a 5 μM y de un $10,0 \pm 4,03$ % a 10 μM a las 72 h, con respecto al vehículo) (Fig. 7 B).

Finalmente, en las células de fibrosarcoma HT1080 tratadas con el compuesto IWP2, tampoco se observaron efectos inhibitorios sobre la viabilidad, obteniéndose un porcentaje de inhibición a las 48 h de tratamiento de un $7,5 \pm 4,54$ % y de un $7,6 \pm 3,48$ % a 5 y 10 μM , respectivamente y un porcentaje de inhibición de un $5,75 \pm 3,02$ % y de un $10,9 \pm 1,94$ % a las 72 h a las concentraciones de 5 y 10 μM , respectivamente, comparando las células tratadas con el vehículo (Fig. 7 C).

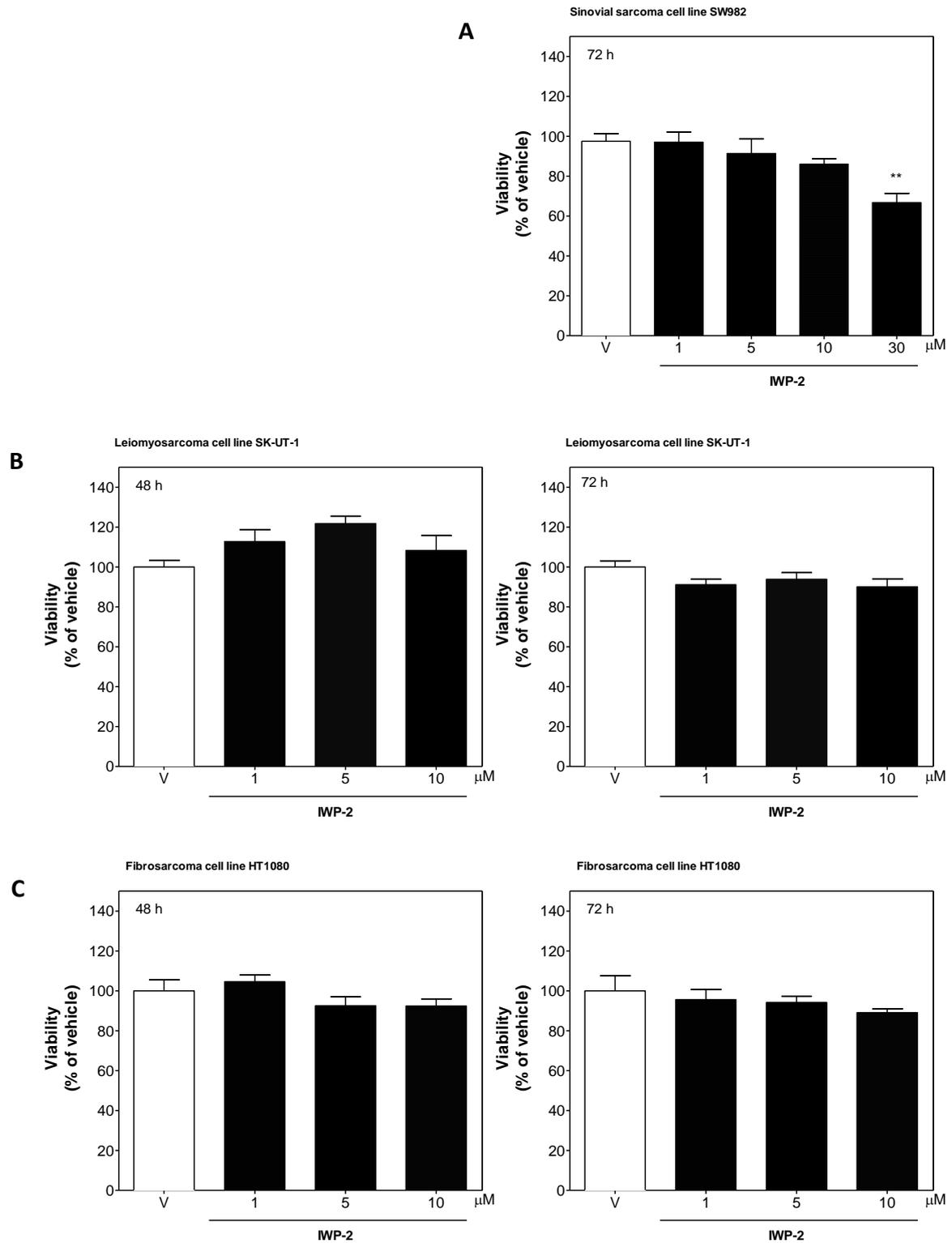


Figura 7. Efecto del tratamiento con el compuesto IWP-2 sobre la viabilidad de líneas celulares de sarcomas.

Viabilidad celular estimada a partir del kit CellTiter 96® Aqueous One Solution (Promega) (descrito en Materiales y Métodos) después de 48 h (izquierda) y 72 h (derecha) de tratamiento con vehículo (0,5% DMSO) o IWR-1 (0,5 - 50 µM) en **A)** células SW982 de sarcoma sinovial, **B)** células SK-UT1 de leiomyosarcoma y **C)** células HT-1080 de fibrosarcoma. Cada columna representa la media ± SEM de tres experimentos independientes por cuadruplicado. **P<0.01 comparando con las células tratadas con el vehículo.

5. DISCUSIÓN

Debido a la actual necesidad de mejorar las terapias actuales contra el cáncer, actualmente se están investigando terapias moleculares dirigidas contra los diferentes tumores⁷. Comprobada la implicación de la vía de proliferación Wnt en ciertos tumores, a través de mutaciones y expresión diferencial de proteínas de la vía se han identificado una serie de pequeñas moléculas dirigidas a componentes específicos de la vía Wnt¹⁶. Se cree que esta serie de compuestos será capaz de provocar una desregulación en esta vía de señalización, por tanto, son prometedoras como agentes terapéuticos contra el cáncer. Sin embargo su capacidad para actuar para inhibir los componentes de la vía Wnt podría verse limitada por el gran tamaño de las proteínas que intervienen en la transducción de señales a nivel del complejo de destrucción β -catenina y las complejas interacciones entre β -catenina/TCF/Lef. Se han logrado algunos avances al diseñar compuestos dirigidos contra estas interacciones, pero esos compuestos no han demostrado aún la eficacia *in vivo*³⁷. Aunque existe una gran variedad de compuestos,^{7,23,26,33} en este trabajo hemos evaluado el efecto de los compuestos XAV939, IWR-1 e IWP2 sobre la viabilidad de distintas líneas celulares de sarcoma que representan a distintos subtipos de dichos tumores.

En primer lugar XAV939 e IWR1 son inhibidores de respuesta Wnt. Éstos actúan sobre la proteína Axina, prolongando su vida media a través de la inhibición de Tanquirasas (Tnks). De esta manera se promueve la formación del complejo de destrucción de β -catenina, constituido por los supresores tumorales Axina y adenomatous poliposis coli (APC) y por las proteínas caseína quinasa 1 (CK1) y glucógeno sintasa quinasa 3-beta (GSK3 β), evitando así la proliferación celular^{26,33}. Por otra parte, IWP-2 es un inhibidor que actúa sobre la producción de Wnt. Éste actúa sobre la proteínas porcupina (Porcn) encargada de la palmitoilación de Wnt, y esencial para la señalización de Wnt. De esta manera IWP-2 impide que el ligando se una al receptor Frizzled (Fz). Ya que se ha demostrado que en sarcomas sinoviales, liposarcomas y fibrosarcomas existe una activación de la vía Wnt por vía autocrina y por la presencia de β -catenina nuclear^{24,25}, la utilización de estos compuestos podría ser una estrategia efectiva para la supresión de la señalización Wnt en sarcomas³³.

En este contexto, el compuesto XAV939 disminuyó significativamente la proliferación en un $44,1 \pm 4,68$ % en células SW982 de sarcoma sinovial (Fig. 5 A). Este efecto de inhibición de la viabilidad fue mucho mayor en las células HT1080 de fibrosarcoma donde se alcanzó una inhibición de la viabilidad del $77,7 \pm 0,45$ % (Fig. 5C) Sin embargo, en la línea SK-UT-1 de leiomioma este compuesto no tuvo ningún efecto sobre la proliferación celular (Fig. 5B). Una posible explicación de estos resultados es que las células SK-UT-1 de leiomioma presentan una mutación en el gen APC que impediría el

correcto ensamblaje del complejo de destrucción aún con las Tnks inhibidas. Sin embargo, tanto las células SW982 de sarcoma sinovial y HT1080 de fibrosarcoma, no presentan mutaciones de ninguno de los componentes de la vía Wnt lo que las hace más sensibles a la inhibición de la acumulación de b-catenina por parte del compuesto XAV939.

Aun teniendo la misma proteína diana (Tnks), el efecto del compuesto IWR1 fue mucho menor en comparación con el compuesto XAV939 en la línea de fibrosarcoma. Su efecto inhibitorio fue similar en las tres líneas de sarcoma estudiadas, alcanzándose un efecto máximo a las concentraciones de 30 y 50 μM de entre un $30,7 \pm 8,0 \%$ y un $42,9 \pm 3,94 \%$ (Fig. 6). El porqué de su menor efecto sobre la viabilidad en la línea de fibrosarcoma con respecto a XAV939 no se puede explicar teniendo en cuenta únicamente los resultados obtenidos en este estudio de viabilidad, para ello harían falta otros planteamientos experimentales, en los que por ejemplo se comparara el efecto inhibitorio de ambos compuestos sobre las Tnks o sobre la acumulación de β -catenina en esta línea celular.

Aunque no hay estudios previos en los que se haya estudiado el efecto de estos compuestos sobre la proliferación en líneas celulares de sarcomas, sí se han llevado a cabo estudios de este tipo en otros tipos de tumores. En concordancia con los resultados de este trabajo, estudios recientes donde se probaron los mismos fármacos en diferentes líneas de cáncer de pulmón muestran disminuciones considerables en la proliferación celular, a concentraciones similares a las estudiadas en este trabajo, tras las 72 h de tratamiento, con respuesta favorable distinta para cada uno de los inhibidores de Tnks en función de la línea celular³⁰. También se ha demostrado que XAV939 disminuye la proliferación en leiomioma, leucemina, cáncer de mama (línea MMP7) y neuroblastoma^{28,29,31,38 32}.

Por el contrario, tras el tratamiento con IWP2 no se observó ningún efecto inhibitorio significativo sobre la viabilidad celular en ninguna de las células de sarcoma estudiadas (Fig. 7). Estos resultados concuerdan con diversos estudios en la línea de fibrosarcoma HT1080, entre otras, donde IWP2 tampoco tuvo efecto como inhibidor de la vía Wnt³⁵. Además estudios con otros inhibidores de Porcupina en cáncer de mama tampoco tienen mucho éxito³⁹. Esto hace pensar que aunque Porcn sea necesario para la activación de la vía de proliferación Wnt³⁴, esta proteína podría disminuir el crecimiento celular de una manera independiente a Wnt^{35,39}.

La diferente respuesta entre los diferentes tipos de tumores hace evidente la necesidad de entender mejor los mecanismos implicados en la sarcomagénesis para poder así elaborar terapias mucho más específicas y dirigidas de las actuales. Hasta ahora, nuestro conocimiento acerca de cómo

la vía Wnt regula la sarcomagénesis no está completamente dilucidado, y aún quedan muchas cuestiones que abordar. Por ejemplo, la especificidad de la interacción entre ligandos Wnt y receptores no se conoce, así como el papel de la vía no canónica, que está pobremente estudiada. También parece importante descubrir cuál de los ligandos Wnt son críticos para mediar las vías canónica y no canónica de Wnt en sarcomas. Mirando hacia el futuro, esta podría ser un área importante en la investigación, que implicará el análisis de cómo la vía Wnt ejerce su efecto y si dianas moleculares compartidas están implicadas en influenciar la auto-renovación en el contexto de las células madre y cáncer ⁴⁰.

La complejidad de la vía Wnt hace que sea susceptible a la intervención terapéutica a través de muchos niveles, que van desde la inhibición de la interacción ligando-receptor en la superficie celular al bloqueo de la β -catenina e inactivación de los genes diana. Por este motivo, Wnt es un atractivo objetivo para la terapia contra el cáncer. Sin embargo, la señalización de Wnt también confluye con otras vías de señalización en la regulación de los niveles de β -catenina. Entre ellas destaca la vía formada por el fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT/mTOR, que con frecuencia se han mostrado activadas en los sarcomas ⁴¹. Por este motivo es vital poder identificar estas interrelaciones entre las distintas vías de señalización que acaban regulando la acumulación de β -catenina para poder entender un poco más lo mecanismo de proliferación y sarcomatogénesis de estos tumores y poder así desarrollar terapias aún más dirigidas.

Actualmente, los estudios realizados sobre moléculas pequeñas inhibitoras de la vía Wnt se están realizando *in vitro* con resultados limitados. Esto hace pensar que no son suficientemente potentes y debido a esto aún no han pasado a fase clínica. Por este motivo, pensamos que probablemente debamos inhibir a otros componentes de la vía de proliferación Wnt y/o usar fármacos más potentes como LGK974, que ya ha pasado a la clínica ⁴². LGK974 es una pequeña molécula que tiene como diana a Porcn, inhibiendo así la vía de señalización ⁴³.

El desarrollo de terapias dirigidas específicamente a la vía Wnt aberrante está aún en sus inicios. Sin embargo, los medicamentos existentes, en especial, las moléculas pequeñas inhibitoras, entre las parecen ser una gran promesa para el tratamiento de sarcomas.

Estos resultados se suman al cuerpo de conocimiento existente sobre el papel fundamental que la vía de señalización Wnt β -catenina juega no sólo en el desarrollo y la homeostasis del tejido adulto, sino también el desarrollo de tumores, entre ellos, los sarcomas.

6. CONCLUSIÓN

Con los resultados de viabilidad obtenidos en este trabajo se puede concluir que la inhibición de la vía Wnt con XAV939 e IWR1 podría representar una terapia alternativa para el tratamiento de ciertos tipos sarcomas de partes blandas, en especial, en aquellos que no presenten mutaciones en APC o en β -catenina. Por el contrario, el compuesto IWP2 no parece ser efectivo como tratamiento antitumoral en este tipo de tumores.

7. ABREVIATURAS

APC:	Poliposis adenomatosa coli
CK1:	Quinasa caseína 1
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DSH:	Dishevelled
FAP:	Poliposis adenomatosa familiar
Fz:	Frizzled
GSK3b:	Quinasa glucógeno sintasa 3 beta
GIST:	Tumores de estroma gastrointestinal
LRP5/6:	Proteína receptora relacionada con el receptor LDL
MSC:	Células madre mesenquimales
Porcn:	Porcupina
SPB:	Sarcomas de partes blandas
TBD:	Dominio de unión a Tanquirasa
Tnks:	Tanquirasa
Top2B:	Topoisomesara-II β

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Guo Y, Xie J, Rubin E, et al. Frzb, a secreted Wnt antagonist, decreases growth and invasiveness of fibrosarcoma cells associated with inhibition of Met signaling. *Cancer Res.* 2008;68(9):3350-3360.
2. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(9):685-694.
3. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9-29.
4. Chen C, Borker R, Ewing J, et al. Epidemiology, treatment patterns, and outcomes of metastatic soft tissue sarcoma in a community-based oncology network. *Sarcoma.* 2014;2014:145764.
5. Ordóñez JL, Osuna D, García-Domínguez DJ, et al. The clinical relevance of molecular genetics in soft tissue sarcomas. *Adv Anat Pathol.* 2010;17(3):162-181.
6. Borden EC, Baker LH, Bell RS, et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin Cancer Res.* 2003;9(6):1941-1956.

7. Ordóñez JL, Martins AS, Osuna D, Madoz-Gúrpide J, de Alava E. Targeting sarcomas: therapeutic targets and their rational. *Semin Diagn Pathol*. 2008;25(4):304-316.
8. Milano A, Apice G, Ferrari E, et al. New emerging drugs in soft tissue sarcoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;59(1):74-84.
9. Radaelli S, Stacchiotti S, Casali PG, Gronchi A. Emerging therapies for adult soft tissue sarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014;14(6):689-704.
10. Raj S, Franco VI, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2014;16(6):315.
11. Schlitt A, Jordan K, Vordermark D, Schwamborn J, Langer T, Thomssen C. Cardiotoxicity and oncological treatments. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(10):161-168.
12. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalife T, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012;18(11):1639-1642.
13. Taylor BS, Barretina J, Maki RG, Antonescu CR, Singer S, Ladanyi M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(8):541-557.
14. Song X, Wang S, Li L. New insights into the regulation of Axin function in canonical Wnt signaling pathway. *Protein Cell*. 2014;5(3):186-193.
15. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9-26.
16. Anastas JN, Moon RT. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(1):11-26.
17. Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 21):3977-3978.
18. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev*. 2006;20(11):1394-1404.
19. Matushansky I, Maki RG, Cordon-Cardo C. A context dependent role for Wnt signaling in tumorigenesis and stem cells. *Cell Cycle*. 2008;7(6):720-724.
20. Vijayakumar S, Liu G, Rus IA, et al. High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/β-catenin target gene, CDC25A. *Cancer Cell*. 2011;19(5):601-612.
21. Hoang BH. Wnt, osteosarcoma, and future therapy. *J Am Acad Orthop Surg*. 2012;20(1):58-59.
22. Piters E, Boudin E, Van Hul W. Wnt signaling: a win for bone. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):112-116.
23. Cai Y, Cai T, Chen Y. Wnt pathway in osteosarcoma, from oncogenic to therapeutic. *J Cell Biochem*. 2014;115(4):625-631.
24. Gibault L, Pérot G, Chibon F, et al. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *J Pathol*. 2011;223(1):64-71.
25. Iwao K, Miyoshi Y, Nawa G, Yoshikawa H, Ochi T, Nakamura Y. Frequent beta-catenin abnormalities in bone and soft-tissue tumors. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90(2):205-209.
26. Huang SM, Mishina YM, Liu S, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009;461(7264):614-620.
27. Karlberg T, Markova N, Johansson I, et al. Structural basis for the interaction between tankyrase-2 and a potent Wnt-signaling inhibitor. *J Med Chem*. 2010;53(14):5352-5355.
28. Tian XH, Hou WJ, Fang Y, et al. XAV939, a tankyrase 1 inhibitor, promotes cell apoptosis in neuroblastoma cell lines by inhibiting Wnt/β-catenin signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2013;32(1):100.
29. Ono M, Yin P, Navarro A, et al. Inhibition of canonical WNT signaling attenuates human leiomyoma cell growth. *Fertil Steril*. 2014;101(5):1441-1449.e1441.
30. Busch AM, Johnson KC, Stan RV, et al. Evidence for tankyrases as antineoplastic targets in lung cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:211.
31. Yang Y, Mallampati S, Sun B, et al. Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett*. 2013;333(1):9-17.
32. Bao R, Christova T, Song S, Angers S, Yan X, Attisano L. Inhibition of tankyrases induces Axin stabilization and blocks Wnt signalling in breast cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e48670.
33. Chen B, Dodge ME, Tang W, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol*. 2009;5(2):100-107.
34. Wang X, Moon J, Dodge ME, et al. The development of highly potent inhibitors for porcupine. *J Med Chem*. 2013;56(6):2700-2704.

35. Covey TM, Kaur S, Tan Ong T, et al. *PORCN moonlights in a Wnt-independent pathway that regulates cancer cell proliferation. PLoS One. 2012;7(4):e34532.*
36. Goss KH, Kahn M. *Targeting the Wnt pathway in cancer. Springer New York Dordrecht Heidelberg London: © Springer Science+Business Media, LLC 2011; 2011.*
37. Barker N, Clevers H. *Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(12):997-1014.*
38. Dey N, Young B, Abramovitz M, et al. *Differential activation of Wnt-β-catenin pathway in triple negative breast cancer increases MMP7 in a PTEN dependent manner. PLoS One. 2013;8(10):e77425.*
39. Proffitt KD, Madan B, Ke Z, et al. *Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. Cancer Res. 2013;73(2):502-507.*
40. Reya T, Clevers H. *Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature. 2005;434(7035):843-850.*
41. De Robertis A, Mennillo F, Rossi M, et al. *Human Sarcoma Growth Is Sensitive to Small-Molecule Mediated AXIN Stabilization. PLoS One. 2014;9(5):e97847.*
42. Health USNIo. *A Study of Oral LGK974 in Patients With Malignancies Dependent on Wnt Ligands. 2014.*
43. Liu J, Pan S, Hsieh MH, et al. *Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(50):20224-20229.*