



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Investigació de Minerval per al tractament del càncer

Catalina Cardona Ribas

Grau de Biologia

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 47407774J

Treball tutelat per Xavier Busquets Xaubet
Departament de Biologia Cel·lular



S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

càncer, teràpia lipídica de membrana, minerval, elisa kit, western blot, Akt, S6rp, DHFR.

Índex

Resum.....	4
1. INTRODUCCIÓ.....	
1.1. Càncer.....	5
1.1.1. Glioma i glioblastoma.....	6
1.1.2. Càncer de pulmó i adenocarcinoma.....	7
1.2. Teràpia lipídica de membrana.....	7
1.3. Fàrmac (Minerval, 2OHOA).....	9
1.4. Proteïnes i vies d'estudi.....	10
1.4.1. Proteïna Akt.....	10
1.4.1.1. Estructura de la proteïna.....	10
1.4.1.2. Mecanisme d'activació.....	11
1.4.1.3. Vies de senyalització implicades	11
1.4.2. Proteïna ribosomal S6.....	12
1.4.2.1. Estructura de la proteïna.....	12
1.4.2.2. Mecanisme d'activació.....	12
1.4.2.3. Efectes implicats en l'activació.....	12
1.4.3. Dihidrofolat reducatasa.....	13
2. MATERIAL I MÈTODES.....	14
2.1. Cultius cel·lulars.....	14
2.2. Tractament cel·lular i recollida de mostres.....	15
2.3. Lisis cel·lular.....	15
2.4. Quantificació de proteïnes.....	16
2.5. Detecció de proteïnes.....	16
2.5.1. Detecció a partir de la tècnica <i>Western blot</i>	16
2.5.1.1. Electroforèsis.....	16
2.5.1.2. Immunobloting.....	18
2.5.2. Detecció a partir de <i>ELISA kits</i>	19
2.6. Anàlisi de dades.....	20
3. OBJECTIUS.....	21
4. RESULTATS.....	22
4.1. Efecte de Minerval sobre els nivells de Akt, P-Akt i l'expressió de DHFR a partir de <i>Western Blot</i>	22
4.2. Posta a punt de la tècnica <i>CST's PathScan® Sandwich ELISA Kit</i> i comprovació a partir dels nivells de fosforilació en Akt i S6rp.....	24
5. DISCUSSIÓ.....	26
5.1. Efecte de Minerval sobre els nivells de Akt, P-Akt i l'expressió de DHFR a partir de <i>Western blot</i>	26
5.2. Posta a punt de la tècnica <i>CST's PathScan® Sandwich ELISA Kit</i> i comprovació a partir dels nivells de fosforilació en Akt i S6rp.....	28
6. CONCLUSIONS.....	30
7. BIBLIOGRAFIA.....	31

Resum

Els gliomes són càncers amb uns pronòstics desfavorables i unes opcions de tractament limitades. La taxa de supervivència de les persones afectades no ha presentat grans canvis en els darrers temps. D'altra banda, el càncer de pulmó es troba en condicions semblants, presentant-se com un dels càncers més comuns arreu del món i amb les taxes de mortalitat més elevades. Per tant, la incidència d'aquests càncers reflecteix la necessitat de recerca terapèutica per al seu tractament. Una de les tècniques més recents per al tractament del càncer és la Teràpia lipídica de membrana. S'ha descobert que les membranes plasmàtiques juguen un paper crític alhora de propagar certes respostes oncogèniques, de manera que aquesta teràpia reforça el seu estudi sobre la modificació de les membranes i conseqüentment totes les vies pertinents que s'hi troben relacionades.

L'objectiu d'aquest estudi és posar a punt una tècnica de *Sandwich ELISA Kit* per determinar els nivells de fosforilació de les proteïnes Akt i S6rp com a opció de determinació alternativa al *western blot*. L'estudi es realitzà sobre dues línies cel·lulars SF-295 (línia cel·lular de glioma) i A549 (línia cel·lular de pulmó). S'avaluà l'activitat proliferativa de les cèl·lules tractades tant en els nivells de la proteïna Akt com amb la proteïna ribosomal S6, ambdues involucrades dins les vies de senyalització de proliferació descontrolada i detenció del cicle cel·lular, com en la via PI3K/Akt. Alhora també s'avaluà l'efecte sobre la traducció de proteïnes implicades en la divisió cel·lular, com DHFR, un dels enzims crítics en la síntesi d'ADN. A partir dels western blot corroborarem els estudis realitzats prèviament referents al mecanisme d'acció de Minerval. D'altra banda, es posà a punt la tècnica de *Sandwich ELISA Kit*, però l'estudi obtingut no presentà resultats coherents, indicant que en principi aquesta tècnica no serveix per a la determinació estimada.

Per tant, s'ha demostrat que caldria realitzar altres tècniques *ELISA Kit* per a poder demostrar la seva aplicació en mostres tractades amb el fàrmac Minerval. A més, m'agradaria potenciar l'ús de la teràpia lipídica de membrana sobre diverses patologies, ja que és un enfocament terapèutic nou i amb pronòstics favorables per al futur tractament del càncer.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Càncer

El càncer és una malaltia neoplàsica caracteritzada per un creixement anormal de les cèl·lules resultant de canvis genètics que controlen la proliferació, maduració, el comportament metastàtic i la senescència de les cèl·lules (Oving et al, 2002). Aquests múltiples canvis en l'expressió genètica condueixen a un desequilibri de la proliferació i mort cel·lular, fins a provocar en els pitjors dels casos la mort de l'individu. (Cetin et al., 2012).

El creixement cel·lular es troba sotmès a un rigorós control, el qual respon a les necessitats específiques de l'organisme. Si aquests controls que regulen la multiplicació cel·lular no funcionen de manera adequada, la cèl·lula comença a créixer i dividir-se sense necessitat. Quan la descendència hereta la tendència a proliferar sense control, el resultat és un clon que s'expandeix indefinidament i es produeix un tumor.; el qual pot arribar a envair i disseminar-se fins a arribar a metàstasi. (Menéndez et al., 1999).

El càncer és una malaltia heterogènia, amb diferències entre els tumors, així com entre les cèl·lules canceroses d'un mateix tumor. Aquestes cèl·lules es poden distingir les unes de les altres per varies característiques bioquímiques, morfològiques i immunològiques (Cetin et al., 2012). La seva causa pot ser tant per factors interns (mutacions heretades, canvis en la seqüenciació de l'ADN, alteracions cromosòmiques, hormones y condicions immunes) com per factors ambientals/adquirits (radiacions i carcinògens presents en la vida quotidiana) (McLendon et al., 2008).

Hi ha dos tipus de gens principals mutats al càncer. Els protooncogens, els quals promouen el creixement normal de les cèl·lules, convertits per mutacions a oncogens; inductores de la proliferació. I d'altra banda, el gens supressors de tumors, que restringeixen el creixement cel·lular activant un procés de suïcidi cel·lular o apoptosi. Quan els productors d'aquests gens supressors de tumors no són funcionals o estan absents, la cèl·lula perd el control i es desenvolupa un tumor (Menéndez et al., 1999; Oving et al., 2002).

Les funcions cel·lulars normals o patològiques generalment es troben associades amb l'activitat de proteïnes específiques. Com a conseqüència moltes de les molècules terapèutiques estan dirigides a unir-se a aquestes proteïnes específiques per a revertir la seva mal-funció i/o alterar la seva expressió. Algunes d'aquestes proteïnes (canals, receptors i enzims) interactuen

amb els lípids de la membrana cel·lular i les interaccions proteïna - lípid són susceptibles a ser modificades, el que condueix a canvis en l'activitat de la proteïna (Spector et al., 1985).

Si tenim en compte que la majoria de les vies relacionades amb el càncer són, inicialment, activades a la membrana i les modificacions dels lípids que tenen lloc a les cèl·lules canceroses es troben associades amb l'activació de la proliferació i la carcinogènesi, és raonable que les modificacions en els lípids poden regular aquestes vies de senyalització cel·lular patològiques (Lladó et al., 2014).

1.1.1. Glioma i glioblastoma

Els gliomes són tumors del Sistema Nerviós Central (SNC) resistents a l'apoptosi i associats amb elevats nivells de mortalitat (Terés et al., 2012). El glioblastoma (glioblastoma multiforme o GBM) és el tipus de tumor primari en humans més comú i agressiu, que implica a les cèl·lules glials i comptabilitza el 52% de tots els casos de tumors del parènquima cerebral i el 20% de tots els tumors intracraneals (Dong et al., 2010).

Globalment, el càncer de cervell/ sistema nerviós representa una taxa d'incidència del 1,8 %, corresponent a uns ~250.000 casos a l'any. D'altra banda, la taxa de mortalitat correspon a un 2,3 % dels casos (~200.000 morts/any) A Espanya, el càncer de cervell presenta una incidència de 1,7 %, (~3.000 casos/any); i una taxa de mortalitat de 2,6 % (~2.600 morts/any)(Globocan, 2012).

El glioblastoma es pot desenvolupar a partir d'un astrocitoma preexistent de grau inferior, anomenant-se glioblastoma secundari i representant un petit percentatge dels GBM; o formar un GBM primari, més freqüents i els quals es considera que es desenvolupen de *novo* (Liberski et al., 1997; Leu et al., 2013). El GBM és un tumor que apareix predominantment a l'edat adulta, però també es poden donar casos en nins (Itoh et al., 1987; Friede et al., 1982). En adults, el GBM es troba en els hemisferis cerebrals, mentre que en els ocasionals casos en nins, es produeix en el tronc cerebral (Liberski et al., 1997).

Les cèl·lules cancerígenes amb un fenotip indiferenciat (p. ej. glioma) tenen un pronòstic desfavorable i unes opcions de tractament limitades (Terés et al., 2012). Els tumors cerebrals primaris, es troben generalment associat amb elevats nivells de mortalitat i una elevada resistència a la quimioteràpia i la inducció de l'apoptosi. La quimioteràpia ofereix modestos beneficis front a la radioteràpia i la cirurgia, sent el fàrmac de referència en el tractament del

glioma la temozolomida, un agent alquilant. Tot i així, el que es produeix generalment és una recaiguda en el tumor, ja que la temozolomida només augmenta l'esperança de vida dels pacients durant 2,5 mesos (Lladó et al., 2014; Terés et al., 2012).

1.1.2. Càncer de pulmó i adenocarcinoma

Entre la gran varietat de càncers coneguts, el càncer de pulmó és dels més comuns a tot el món i presenta una elevada taxa de mortalitat (Gatzemeier et al., 2007). La majoria dels càncers de pulmó són carcinomes (tumors que provenen de cèl·lules epitelials). El càncer de pulmó es classifica en: càncer de pulmó microcític (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC) que representa el 16,8 % i el càncer de pulmó de cèl·lules no petites o no microcític (*Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) que representa el 80,4 %. El càncer de pulmó NSCLC alhora es subdivideix en: carcinoma escamós, adenocarcinoma i carcinoma de les cèl·lules grans (MacKinnon et al., 2010).

El càncer de pulmó sorgeix majoritàriament per l'exposició a carcinògens. La font més important de carcinògens i promotora tumoral és el tabac. Aquest augmenta 13 cops el risc relatiu en persones fumadores i fins a 1,5 cops el de fumadors passius. Altres carcinògens que provoquen càncer de pulmó són per exemple el Radó (Rd) present als sòls, l'exposició a l'asbest, certs productes químics i les dietes deficientes en substàncies com els betacarotens (Minna, 1993).

Globalment, el càncer de pulmó presenta una taxa d'incidència del 13 % (~ 2 milions de casos/any) sent la més elevada respecte a la resta de càncers. D'altra banda, la taxa de mortalitat és del 19,4 % (~1,5 milions de morts/any). A l'estat espanyol, el càncer de pulmó ocupa la quarta posició per darrere del de mama, pròstata i còlon, amb una incidència del 12,4 % (~26.000 morts/any) i una taxa de mortalitat del 20,6 % (~21.000 mort/any) (Globocan, 2012).

1.2. **Teràpia lipídica de membrana**

La utilització de lípids o la modulació dels seus nivells en sèrum pel tractament de certs trastorns metabòlics es coneix com a teràpia de lípids. Malgrat que aquesta estratègia terapèutica pugui regular la composició i estructura de les membranes, és conceptualment diferent de la teràpia lipídica de membrana. La teràpia lipídica de membrana és un nou enfocament terapèutic dirigit a desenvolupar medicaments per regular la composició i/o estructura de la membrana lipídica. Aquests fàrmacs són molècules lipòfiles o amfipàtiques amb capacitat per a poder canviar l'organització i estructura general dels lípids de la membrana.

Existeix una certa idea dels efectes dels lípids de la dieta o certs fàrmacs (p.ex. anestèsics i alcohols) sobre l'estructura i funció de la membrana, però els lípids prèviament no s'havien considerat com a objectius pel desenvolupament de fàrmacs (Escribà, 2006; Lladó et al., 2014).

A causa que el tipus i/o la composició dels lípids de membrana s'altera en diverses patologies i un nombre important de funcions cel·lulars es produeixen dins o al voltant de les membranes, la teràpia lipídica de membrana podria tenir un potencial ús per al tractament de diverses malalties (Escribà, 2006).

El càncer es caracteritza per l'àmpla varietat de diverses alteracions en la senyalització, la naturalesa de la qual depèn del tipus de càncer. En aquest context, una àmplia varietat d'entitats moleculars implicades en el control de la proliferació cel·lular i la supervivència són proteïnes associades a la membrana. De fet, els nivells dels lípids de membrana s'alteren en les membranes cel·lulars de pacients amb càncer i a partir de cèl·lules cancerígenes que són resistents a la quimioteràpia (Escribà, 2006).

Els fàrmacs que fins ara es considera que actuen a través de la teràpia lipídica de membrana normalment s'uneixen als lípids de membrana (Martínez et al., 2005). Això contrasta amb la quimioteràpia convencional, la qual es basa en la interacció del fàrmac amb proteïnes, malgrat que ambdues estratègies terapèutiques comparteixen l'objectiu de regular l'activitat de la proteïna (Figura 1) (Escribà, 2006).

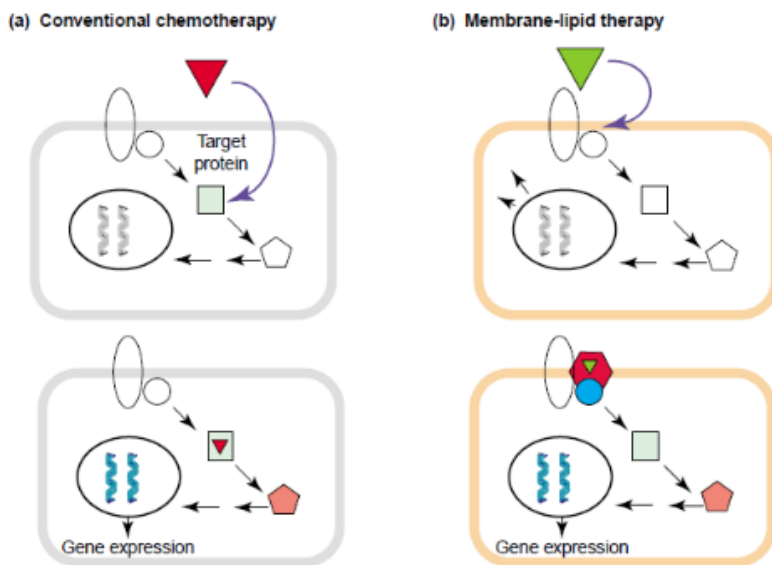


Figura 1. Per a cada tractament les imatges superiors mostren les cèl·lules patològiques i el lloc d'acció terapèutica. Les entitats moleculars regulades per al tractament apareixen acolorides, mentre que les entitats que no es troben afectades es mostren com a símbols buits. (a) La quimioteràpia convencional es caracteritza per la interacció d'un fàrmac amb una proteïna diana. Després de la unió del fàrmac, l'activitat de la proteïna diana regula la resposta *downstream* i els elements i l'expressió gènica es modula (imatge inferior). (b) En la teràpia lipídica de

membrana, el fàrmac clínic s'uneix als lípids de la membrana, es regula l'estructura de la membrana, i consegüentment es modula l'activitat d'una proteïna de membrana i de la resposta *downstream* d'aquesta. (Escribà, 2006).

Per tant, no és sorprenent que l'activitat de diversos medicaments contra el càncer es trobi associada amb la seva capacitat per a alterar l'estructura dels lípids de membrana. Fàrmacs com la daunirrubicina, basacetamida i minerval tots ells alteren la propensió de les fases no lamel·lars de les membranes. La teràpia de membrana lipídica dóna lloc a noves possibilitats per al tractament de malalties que en l'actualitat encara requereixen teràpies o alternatives o solucions terapèutiques millorades (Escribà PV., 2006).

1.3. Fàrmac (Minerval, 2OHOA)

L'àcid 2-hidroxioléic (2OHOA, Minerval®) és un àcid gras sintètic amb una activitat antitumoral, creat com un derivat α - hidroxil de l'àcid oleic (Marcilla-Etxenike, 2012). En la recerca de molècules capaces d'induir efectes reguladors en l'estructura lipídica i les proteïnes perifèriques, es va trobar que l'àcid oleic era més potent que les antraciclins (Lladó et al., 2009). L'àcid 2OHOA es va dissenyar racionalment per reproduir l'efecte antitumoral de les antraciclins a través d'interaccions amb la membrana plasmàtica i les modificacions posteriors en la senyalització cel·lular, sense interaccions inespecífiques amb altres dianes cel·lulars (Barceló et al., 2011).

El mecanisme d'acció de 2OHOA, implica la inducció específica i seqüencial de la detenció del cicle cel·lular, la diferenciació cel·lular, i la mort cel·lular en les cèl·lules canceroses humanes.



D'acord amb la seva elevada eficiència i baixa toxicitat en comparació amb altres agents quimioterapèutics existents, l'Agència Europea de Medicaments (EMA) ha reconegut els possibles beneficis de 2OHOA i ha designat aquesta molècula com a medicament orfe per al tractament del glioma (Martin et al., 2013).

Ácido oleico Minerval

Figura 2. Estructura del àcid oleic i de l'àcid 2-hidroxioléic (Minerval).

L'àcid 2-hidroxioléic s'uneix a la membrana plasmàtica i altera l'organització dels lípids, augmentant la propensió de fases de lípids no lamel·lars (hexagonal H_{II}) (Barceló et al., 2004; Martínez et al., 2005; Cordomi et al., 2010). En els darrers anys s'han acumulat evidències que mostren una relació entre els nivells d'esfingomièlina (SM) de la membrana plasmàtica i la carcinogènesi. La SM és sintetitzada per l'esfingomièlina sintasa (SGMS) la qual catalitza la

transferència d'un grup de fosfocolina d'una fosfatidilcolina (PC) a una ceramida obtenint així un diacilglicerol (DAG) (Bartke et al., 2009). Els nivells de SM es redueixen en una gran varietat de cèl·lules canceroses en comparació amb les cèl·lules no tumorals, i la restauració dels nivells normals de SM a causa de l'activació de SGMS inhibeix la proliferació del cicle cel·lular de les cèl·lules canceroses i/o induïx la mort cel·lular (Tafesse et al., 2006).

L'elevada proliferació dels tumors s'ha associat amb uns nivells de SM molt baixos i un contingut de fosfatidiletanolamina (PE) elevat a la membrana plasmàtica. 2OHOA és un compost que activa específicament les SGMS, restaurant els nivells de SM i PE en les membranes cel·lulars cancerígenes als trobats en les cèl·lules normals. Aquest efecte sobre l'estructura dels lípids de membrana canvia el tipus de proteïnes que interactuen amb aquesta, induint la detenció del cicle cel·lular, la diferenciació de les cèl·lules tumorals i l'autofàgia. Quan l'estructura de la membrana es transforma per l'acció de les SGMS, 2OHOA inhibeix la via Ras-MAPK, que alhora no activa el complex CCND (Ciclina D)-CDK4/CDK6 i la via de PI3K/Akt. A més, la inactivació del complex CCND (Ciclina D)-CDK4/CDK6 causa una hipofosforilació de la proteïna retinoblastoma (RB1/pRb), la inhibició de E2F1 i la reducció de Dihidrofolat reductasa (DHFR) (Terés et al., 2012).

1.4. Proteïnes i vies d'estudi

La via PI3K/Akt es troba involucrada en la progressió tumoral, invasió i angiogènesis. En el desenvolupament del càncer s'han demostrat elevades alteracions en les cascades de senyalització, com per exemple la sobre-expressió i/o activació de proteïnes intracel·lulars (Jiang et al., 2009), com en el cas de Akt i la proteïna ribosomal S6 (S6rp), associada amb l'expressió de PI3K i P-Akt (Ettl et al., 2012). Alhora, DHFR desenvolupa un paper important en la síntesi de ADN (LLadó et al., 2009).

1.4.1. Proteïna Akt

1.4.1.1. Estructura de la proteïna

La proteïna Akt, també coneguda com proteïna quinasa B o PKB, forma part de la família quinassa AGC. Té una estructura amb un domini altament conservat; un domini PH (*pleckstrin homology*) a la regió N-terminal, un domini quinasa i una coa reguladora a la regió C-terminal que conté caràcter hidrofòbic. Akt presenta tres isoformes estructuralment semblants; Akt1/PKB α , Akt 2/PKB β i Akt3/PKB γ , que s'expressen en la majoria de teixits. (Manning et al., 2007; Hers et al., 2011; LoPiccolo et al., 2008; Pinzón et al., 2009).

1.4.1.2. Mecanisme d'activació

Akt és una de les molècules clau activades en la via de senyalització *downstream* de PI3K. L'activació de PI3K es pot donar a través de receptors tirosina quinasa per factors de creixement tals com les integrines, receptors acoblats a proteïnes G (GPCRs) i oncogens com Ras entre altres (LoPiccolo et al., 2008). PI3K catalitza la fosforilació de fosfatidilinositol-3,4-bisfosfat (PIP2) i la subseqüent fosforilació de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Aquests 3 fosfoinosítids formen un lloc d'unió per a proteïnes que contenen dominis PH, tals com Akt i PDK1 (proteïna quinasa 1 fosfoinosítida dependent), reclutant-les així a la membrana. Akt normalment es manté en un estat inactiu, no obstant això, la interacció entre el domini PH de Akt i els 3-fosfoinosítids indueix un canvi conformacional en Akt, la qual cosa permet el reclutament de PDK1 per accedir al bucle d'activació (Hers et al., 2011).

L'activació de Akt es produeix a través de dos fosforilacions crucials, la primera es produeix a Thr308 en el domini catalític per PDK1. Però l'activació completa es produeix en fosforilar-se Ser473 en la regió hidrofòbica, la qual es pot donar per varies quinases (PDK1, quinases lligades a integrines (ILK), mTOR) (LoPiccolo et al., 2008). Després de la fosforilació de Akt i la seva activació, Akt es separa de la membrana i es transloca al citosol i nucli, on activa varies vies de senyalització *downstream*. Unida a la membrana PTEN, freqüentment mutada als càncers, pot regular negativament la via PI3K desfosforilant PIP3 i PIP2, i per tant, impedit l'activació de Akt i PDK1 (Hers et al., 2011).

1.4.1.3. Vies de senyalització implicades

Com a conseqüència de l'àmplia gamma de processos cel·lulars on Akt es troba implicada, incloent-hi el metabolisme, la proliferació i supervivència cel·lular; la desregulació d'aquesta quinasa es troba associada amb diverses malalties humanes, incloent-hi el càncer, la diabetis, les malalties neurodegeneratives i les cardiovasculars (Hers et al., 2011). La sobreactivació de Akt pot influir en molts efectors *downstream* i interferir en diverses vies afavorint la gènesi tumoral (per exemple, la supervivència cel·lular, el creixement cel·lular i la proliferació) i com a tal, és una de les proteïnes més freqüentment hiperactivades en el càncer humà (Hers et al., 2011; Altomare et al., 2005).

1.4.2. Proteïna ribosomal S6

1.4.2.1. Estructura de la proteïna

Els ribosomes eucariotes consten de dues subunitats; la subunitat 40S (petita) i la subunitat 60S (gran). La subunitat 40S compren només una sola molècula de ARN, denominada rRNA 18S, i 33 proteïnes; per altra banda, la subunitat 60S té tres molècules de ARN, denominades 5S, 5.8S i 28S rRNA, i 46-47 proteïnes. De totes les proteïnes ribosomals, la proteïna ribosomal S6 (S6rp) és la que presenta major atracció ja que és la primera com a substrat que s'ha demostrat sotmetre's a fosforilació induïble ([Ruvinsky et al., 2006](#)).

La proteïna ribosomal S6 (S6rp) va ser la primera a identificar-se com a substrat de la família S6K. Els llocs de fosforilació més importants de S6rp s'assignen a 5 residus agrupats: Ser235, Ser236, Ser240, Ser244 i Ser247 ([Krieg et al., 1988](#); [Ruvinsky et al., 2006](#)), ubicats dins una petita regió carboxil terminal de la proteïna S6 ([Ferrari et al., 1991](#); [Flotow et al., 1992](#)).

1.4.2.2. Mecanisme d'activació

La proteïna S6rp és activada per la proteïna S6K, la qual presenta dos formes quinasa, S6K1 i S6K2, que es troben codificades per dos gens diferents i comparteixen un elevat grau d'homologia de seqüències. S6K1 presenta dues isoformes, una citosòlica (p70S6K1) i una nuclear (p85S6K1); mentre que les dues isoformes de S6K2 són principalment nuclears (p54S6K2 i p56S6K2) ([Martin et al., 2001](#); [Ruvinsky et al., 2006](#)).

S6K1 i S6K2 són membres de la família AGC serina/treonina quinases. Una via d'activació d'aquestes quinases és la provocada per PDK1 en fosforilar un residu crític del bucle d'activació (*T-loop*) ([Fenton et al., 2011](#)). A més, la proteïna mTOR (junt a PDK1) fosforila la quinasa S6, que alhora aquesta fosforilarà nombrosos substrats implicats en la traducció; com per exemple S6rp, eIF4B, PDCD4 i SKAR.

1.4.2.3. Efectes implicats en l'activació

Una forma en què els factors de creixement i mitògens promouen eficaçment el creixement cel·lular y la proliferació sostinguda és *upregulating* la traducció del ARNm ([Dufner et al., 1999](#); [Peterson et al., 1998](#)). Els factors de creixement i mitògens indueixen l'activació de p70S6 quinasa i la subseqüent fosforilació de S6rp. La fosforilació de S6rp es correlaciona amb

un augment en la traducció de transcrits de ARNm que contenen un tracte oligopyrimidine en les seves regions no traduïdes 5' ([Peterson et al., 1998](#)). Aquests transcrits particulars de ARNm (5'TOP) codifiquen proteïnes implicades en la progressió del cicle cel·lular, així com proteïnes ribosomals i factors d'elongació necessaris per a la traducció ([Peterson et al., 1998](#); [Jefferies et al., 1997](#)).

1.4.3. Dihidrofolat reductasa

La dihidrofolat reductasa (DHFR) és un enzim involucrat en el metabolisme cel·lular, el qual catalitza la reducció de NADH-dependent de dihidrofolat (DHF) per produir tetrahidrofolat (THF). El THF i els seus derivats serveixen com a donadors d'un carboni en la síntesi de purines, pirimidines i varis aminoàcids; i per tant es troben involucrats en la replicació del ADN. La inhibició de DHFR condueix com a conseqüència a una deficiència cel·lular de THF, pertorbant així la biosíntesi de pirimidines i purines, i per tant provocant la mort cel·lular, ja que la inhibició de la síntesi d'ADN condueix a la detenció del cicle cel·lular i l'apoptosi ([Lladó et la., 2009](#); [Gokhale et al., 2000](#)).

L'enzim DHFR s'ha identificat com a diana per l'acció de diferents fàrmacs importants en el tractament de la malària, d'infeccions bacterianes i paràsites, i el càncer. Els antifolats són agents antitumorals clàssics que inhibeixen enzims claus de la síntesi d'ADN, com en el cas de DHFR. Alguns exemples d'aquests fàrmacs són trimetoprima, pirimetamina i finalment el metotrexat, utilitzat freqüentment pel tractament de leucèmia aguda i un elevat nombre de tumors sòlids ([Bertino, 1993](#); [Lladó et al., 2009](#); [Gokhale et al., 2000](#)).

2. MATERIAL I MÈTODES

2.1. Cultiu cel·lular

La línia cel·lular SF-295 correspon a cèl·lules de glioma humà, en concret de glioblastoma multiforme (GBM), procedents de teixit del Sistema Nerviós Central (SNC). Aquesta línia cel·lular es va caracteritzar al Centre d'Investigació tumoral de cervell de San Francisco a partir d'una pacient amb un diagnòstic de tumor de GBM al lòbul temporal ([Rutka et al., 1987](#)). La línia cel·lular SF-295 es va obtenir de AddexBio (San Diego, California). Les línies cel·lulars de glioma humà es poden classificar segons la seva morfologia, la qual es descriu quant a la semblança que presenten a astròcits, cèl·lules epitelials o fibroblasts ([Bullard et al., 1981](#); [Nistér et al., 1988](#)). La línia cel·lular SF-295 presenta una morfologia bipolar/fibroblast ([Rutka et al., 1987](#); [LaRocca et al., 1989](#)).

D'altra banda la línia cel·lular A549 correspon a cèl·lules d'epiteli pulmonar, mostrant característiques de cèl·lules d'epiteli alveolar de tipus II. Es varen obtenir del ATCC (*American Type Culture Collection*). Les cèl·lules A549 formen monocapes confluents i s'engloben dins els càncers de pulmó no microcítics (NSCLC). Les cèl·lules A549 es caracteritzaren a partir d'un pacient de 58 anys amb un diagnòstic de carcinoma pulmonar. La línia cel·lular presenta un cariotip hipotriploid, i un temps de duplicació de les cèl·lules de 22 h aproximadament ([Bhattacharya et al., 2012](#)).

Ambdues línies cel·lulars (SF-295 i A549) es cultivaren en medi RPMI (Sigma Aldrich, ST Louis, MO) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (Hyclone, Thermo scientific, USA), penicil·lina (100 U/ml) i estreptomycin (0,1 µg/ml). Les línies cel·lulars es varen mantenir en una incubadora de cèl·lules (Mettler GmbH Co, Reino Unido) a 37°C, amb una atmosfera al 5% CO₂ i una humitat relativa del 95%.

Per al seu manteniment i per tant, per a poder passar-les, calia desferrar-les del flascó de cultiu mitjançant tripsina-EDTA (2,5 mg/ml tripsina i 4mg/ml EDTA en PBS) durant 2 minuts aproximadament. Posteriorment, la tripsina quedava inactivada un cop introduïem el medi de cultiu, ja que el sèrum present en aquest bloqueja els efectes de la tripsina ([Meron, 1995](#)). Finalment, esmentar que tot el cultiu es va realitzar en condicions d'esterilitat en una cabina de flux vertical (Telstar S. A., Terrasa, España).

2.2. Tractament i recollida de mostres

Prèviament al tractament de les cèl·lules, es va determinar quantitativament el seu nombre mitjançant la cambra de Bürker (Blaubrand, Alemanya) i amb l'ajuda d'un microscopi de llum invertida (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanya).

Cada línia cel·lular (SF-295 i A549) es va sembrar en plaques de 6 pouets (SPL Life Sciences Co., Ltd;Korea) amb una densitat de 2×10^5 cèl·lules/pouet. Es va posar un volum de 2,5 ml de medi RPMI complet; corresponent per tant a 8×10^4 cèl/ml. Després d'incubar tota la nit (12 hores), les cèl·lules es tractaren amb 200 μ M de 2OHOA (Minerval®, Lipopharma) per a realitzar l'estudi d'inhibició de creixement cel·lular. Alhora, també es va realitzar un control negatiu i un control positiu. Per a la línia cel·lular SF-295 tractarem les cèl·lules del control positiu amb 25 ng/ml de EGF (*Endotelial growth factor*), mentre que per a la línia A549 es va utilitzar 0,6 μ M d'insulina; estimulant així les cèl·lules i les seves vies de senyalització de creixement. Es varen mantenir amb el mateix medi fins al final del tractament.

Es recolliren mostres cada 24 h, de manera que en cada tractament teníem mostres de 24 h, 48 h i 72 h. Transcorreguts els temps indicats, descartàvem els medis de les plaques, rentàvem els pouets amb TBS (solució salina tamponada amb Tris) i emmagatzemàvem les plaques a -80°C fins a ser processades.

2.3. Lisis cel·lular

Per obtenir les lisis de les cèl·lules, retirarem les plaques del congelador i passarem a treballar-les amb condicions de fred per evitar possibles degradacions de les proteïnes. A continuació prepararem el tampó de lisis cel·lular 1X a partir del Buffer de lisis cel·lular 10X (*Cell Signally Technology #9803*). Prepararem alíquotes de 1300 μ l de Buffer 1 X (1170 μ l de H_2O i 130 μ l de Buffer de lisis cel·lular 10X) per a cada placa. A més, just abans de la utilització del Buffer s'afegiren 6,5 μ l de fluorur de fenilmetilsulfoni (PMSF) per alíquota; detallat com a recomanació en el protocol del kit.

Posarem 200 μ l/pouet de Buffer de lisis cel·lular preparat, deixant-lo actuar durant 5 minuts i es recol·lectaren les mostres. La suspensió cel·lular recollida es va sonicar (Branson Digital Model 250, Branson Ultrasonics, USA) amb 2 cicles de 5 segons, deixant reposar les

mostres entre cicles i treballant en condicions fredes per a evitar possibles degradacions. Finalment, les centrifugarem durant 10 minuts a 4°C i 14.000 rpm. Els sobrenedants resultants varen ser les lisis cel·lulars, les quals transferirem a tubs nous.

2.4. Quantificació de proteïnes

Per a la quantificació de proteïnes, utilitzarem el kit de quantificació RC DTCM (BioRad, Barcelona, Espanya). Aquest kit és un assaig colorimètric per a la determinació de proteïnes en presència d'agents reductors i detergents. Aquest mètode es presenta com una modificació del mètode de Lowry, el qual es basa en una reducció del reactiu de folín fenol (Lowry et al., 1951), produint un viratge de color el qual serà quantificat posteriorment a partir d'un espectrofotòmetre.

Per a la quantificació de proteïna, realitzarem una recta patró a partir d'una concentració coneguda d'albumina sèrica bovina (BSA; Pierce, Thermofisher Scientific, Rockford, USA). Prepararem diverses concentracions a partir de la concentració coneguda de BSA (1mg/ml), amb un interval de 0,2 mg/ml i un volum total de 20 µl. D'aquesta manera, la nostra recta patró estava formada pels valors de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2 i 4 mg/ml de BSA.

En una placa de 96 pouets carregarem 5 µl de cada concentració de la recta i de cada mostra a quantificar, realitzant-se tan la recta com les mostres per triplicat. S'afegiren 25 µl de reactiu A' (compost pels reactius S i A en una relació 1:50 del kit de quantificació RC DTCM BioRad); i finalment 200 µl/pouet de reactiu B (RC DTCM BioRad). Després de l'aplicació dels reactius es va produir un viratge de color a les mostres el qual passarem a quantificar 15 minuts després d'haver-los introduït. Finalment, es llegiren els resultats a 750 nm amb l'espectrofotòmetre (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Alemanya). La concentració proteica de cada mostra es va obtenir per interpolació dels valors d'absorbància sobre la recta patró realitzada amb concentracions conegudes.

2.5. Detecció de proteïnes

2.5.1. Detecció a partir de Western blot

2.5.1.1. Electroforesis

Per a la separació de les proteïnes es va utilitzar la tècnica d'electroforesis en gels de poliàcrilamida en condicions desnaturalitzades SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Laemmli, 1970).

Els gels de poliacrilamida participen directament en la separació de les mostres. Es preparen de manera que els seus porus presentin una mida comparable al de les proteïnes fent així una selecció molecular. Els gels de poliacrilamida es preparen a partir d'un compost monomèric de baix pes molecular anomenat acrilamida. El SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2 = \text{SO}_3\text{Na}^+$) és un compost que té la capacitat d'interaccionar amb la gran majoria de proteïnes, donant lloc a complexos amb característiques comunes independentment de la proteïna que es tracti. Es coneix que cada gram de proteïna uneix 1,4 g de SDS, el que equival a la unió d'una molècula de SDS per cada dos residus d'aminoàcids.

La massa molecular de cada proteïna és el que condiona la mobilitat electroforètica, ja que la càrrega és uniforme per a tots els complexos proteïna/SDS. La separació es dona principalment com a resultat de la selecció molecular ("tamizado") a través del gel, de manera que aquelles proteïnes amb una massa molecular menor presenten un recorregut major, mentre que com major sigui el seu pes molecular, més restringit serà el seu recorregut en el gel. Les proteïnes durant l'electroforesi se sotmeten a un camp elèctric el qual subministra la força impulsora a través de la selecció molecular. La concentració d'acrilamida en gel determinarà el rang de separació de les proteïnes. Per a poder comparar el pes molecular de les proteïnes d'estudi, s'utilitzen una sèrie de marcadors estàndards de pes molecular coneguts i així poder-les determinar comparant la seva mobilitat electroforètica en referència als marcadors.

Els gels estan compostos per dues zones diferenciades: un gel de concentració de mostres (*Stacking*) compost per 4% d'acrilamida-bis-acrilamida, 166 mM de Tris-HCl pH 6,8, 0,1% de SDS, 0,3% de persulfat amònic i 0,03% de N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina (TEMED); i un gel de resolució o separació (*Running*) compost per 9,5% acrilamida- bis-acrilamida, 1 M de Trisbase pH 8,8, 0,1% de SDS, 0,1% de persulfat amònic i 0,01% de tetrametiletilendiamina (TEMED). Es varen utilitzar pintes de 15 pous i d'1,5 mm de gruix.

A partir de les concentracions proteiques de les mostres, aquestes s'igualaren per posteriorment poder carregar 30 µg de proteïna total; de manera que carregarem 28 µl de A549 i 20 µl de SF-295. Prèviament a la càrrega de les mostres en el gel, es va afegir a les mostres el tampó de càrrega d'electroforesi (12 mM de Tris-HCl pH 6,8, 1% de β- mercaptoetanol, 0,2% de SDS, 0,01% de blau de bromofenol i 50% de glicerol de concentració final), i s'escalfaren durant 5 minuts a 95°C.

A més, a cada gel es varen carregar 5 µl d'un marcador estàndard de pesos moleculars adequat per a la determinació dels pesos moleculars i identificació de la banda electroforètica corresponent a la proteïna d'estudi; en el nostre cas utilitzarem el marcador *All Blue*.

Un cop les mostres es carregaren als gels de concentració, es varen sotmetre a un corrent continu de 90 V, i un cop dins el gel de resolució es va augmentar fins a 110 V. El temps aproximat d'electroforesi va ser de 90 min, encara que depèn del pes molecular de la proteïna d'estudi. El tampó d'electroforesi està format per Tris-base 19,2 mM i glicina 0,19 M a pH 8,6.

2.5.1.2. Immunobloting

Transcorregut el temps, es transfereixen les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa (GE Healthcare, Kent, Reino Unido). Per a realitzar l'electrotransferència, el gel i la membrana de nitrocel·lulosa es col·locaren xopades entre un conjunt de fulls de paper de filtre (Whatman) i esponges, subjectes a una estructura de plàstic i submergides en un tampó de transferència compost per Tris-base 19,4 mM y glicina 0,19 M y 20% d'etanol. A continuació, es va aplicar un amperatge de 350-400 mA durant 2 hores; tot el procés de transferència es va realitzar en fred.

Les proteïnes un cop transferides a la membrana, es troben disponibles per a poder interaccionar amb altres molècules que ens permetin la seva identificació. En aquest cas, s'utilitzaren anticossos per a la seva identificació, tècnica que rep el nom de *immunoblotting*. Aquesta tècnica es basa amb la capacitat de determinar proteïnes que actuen com antígens gràcies al reconeixement específic d'aquestes per anticossos.

Un cop acabada la transferència, les membranes es bloquejaren, amb la finalitat d'evitar la unió inespecífica de l'anticòs, amb un 5% de llet desnatada en PBS durant 30 min. Un cop finalitzat el bloqueig, la membrana es va incubar en una dilució amb l'anticòs primari, el qual es va preparar en una solució amb un 5% de BSA i un 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO); es deixà en agitació tota la nit a 4°C.

L'endemà es va retirar la dissolució amb l'anticòs primari i es realitzaren 3 rentats de 5 min amb PBS i 0.1% Tween 20 per a poder passar a la següent incubació. A continuació, es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari conjugat amb un fluorocrom (IRDye 800CW Donkey anti-Mouse IgG (H + L) o IRDye 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L), LI-COR Biosciences, USA) durant 1 h, cadascun corresponent a les proteïnes analitzades. L'anticòs

secundari es trobava en una dissolució que contenia un 50% de solució bloquejadora i un 50% de PBS amb 0.1 Tween 20. A continuació, es realitzaren 2 rentats de 5 min amb PBS i 0.1% Tween 20 i un darrer rentat de 5 min amb PBS. Un cop es va començar a treballar en presència de l'anticòs secundari, tot el procediment es va realitzar en condicions d'obscuritat.

Finalment les membranes es varen escanejar amb un espectroscopi d'infraroig proper (Odyssey Infrared Imaging System, LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA) i es passaren a analitzar amb el programa *Image Studio v.3* per a obtenir els valors de densitat òptica integrada (DOI) de cadascuna de les bandes.

Per a la detecció de les proteïnes totals i de α -tubulina s'utilitzaren les mateixes membranes de nitrocel·lulosa. Per a fer-ho, s'utilitzà la tècnica de *stripping immunoblot*, que ens permet eliminar el sistema de detecció immunològic utilitzat prèviament i reutilitzar les membranes per a la detecció d'altres proteïnes. Ho realitzarem per determinar Akt Total i la α -tubulina.

2.5.2. Detecció a partir de ELISA Kits

S'ha utilitzat el *CST's PathScan® Phospho-Akt1 (Ser473) Sandwich ELISA Kit* per a la determinació del P-Akt; i el *PathScan® Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) Sandwich ELISA Kit* per a la determinació de P-S6rp. Per a la realització de tots dos ELISA kits hem desenvolupat el mateix procediment subministrat amb el kit.

Cada kit inclou una corba de sensibilitat que serveix com a referència per a escollir la concentració inicial de lisi apropiada. La corba de sensibilitat ens mostra els resultats d'un assaig típic del kit en una sèrie de punts de concentració de lisi. A partir d'aquestes corbes nosaltres férem un assaig amb diferents concentracions segons la proteïna a estudiar a partir de la placa de 72 h de SF-295; on amb resultats obtingut escollirem per a SF-295 la concentració de 0.3 mg/ml per a la determinació de P-Akt i la concentració de 0.05 mg/ml per a les de P-S6rp. En realitzar l'*ELISA kit* amb les mostres de 24 h i 48 de SF-295, es va produir una saturació de certes mostres i uns resultats il·lògics; de manera que passarem a analitzar la línia A549 a 72 h únicament, i amb unes concentracions escollides menors; 0.1 mg/ml per a les mostres de determinació de P-Akt i la concentració de 0.015 mg/ml per a les de P-S6rp.

En primer lloc, temperarem les tires de pouets que necessitàvem, deixant la resta de nou emmagatzemada a 4°C. A continuació diluïrem les mostres a partir del diluent de mostres (*Elisa Sample Diluent* proporcionat en cada *PathScan® ELISA Kit*).

Afegirem 100 µl de cada mostra diluïda de lisi cel·lular al pouet corresponent, el segellàrem amb el film adhesiu i incubàrem la placa durant tota la nit a 4°C. Transcorregut aquest temps, rentàrem els pouets a partir del tampó de Rentat 20X subministrat en cada *PathScan® ELISA Kit* segons el procediment descrit al protocol. Per a cada rentat, un cop descartat el tampó, colpejàvem suaument la placa contra un paper net a fi d'eliminar les restes que poguessin quedar; però evitant la dessecació completa dels pouets.

Prèviament, preparàrem els anticossos reconstruïts a partir del diluent d'anticossos (*Detection Antibody Diluent* i *HRP Diluent*, *PathScan® ELISA Kit*) i dels anticossos (*Detection Antibody* i *HRP-Linked Antibody*, *PathScan® ELISA Kit*). Introduïrem 100 µl de Detecció d'anticòs reconstruït corresponent a cada pouet, segellàrem i incubarem les plaques a 37 °C durant 1 h. Transcorregut el temps, repetirem el procés de rentat i afegirem 100 µl d'anticòs secundari reconstruït HRP-Linked corresponent a cada pouet. Segellarem les plaques de nou i s'incubaren a 37°C durant 30 minuts. Realitzarem el darrer rentat i afegirem 100 µl de Substrat TMB (*PathScan® ELISA Kit TMB Substrate #7004*) a cada pouet. Segellarem i incubàrem les plaques durant 10 minuts a 37 °C. Finalment, afegirem 100 µl de Solució de Parada (*PathScan® ELISA Kit STOP Solution #7002*) a cada pouet.

La reacció inicial era de color blau, i un cop s'afegia la Solució de parada es realitzava un viratge a color groc. Per acabar, mitjançant la determinació espectrofotomètrica, es llegiren els resultats amb una absorbància de 450 nm dins els 30 minuts després d'haver afegit la solució de parada.

La informació detallada en aquest apartat ha estat extreta dels protocols de *PathScan® Sandwich ELISA Protocol (for kits with Lyophilized Antibodies)*.

2.6. Anàlisi de les dades

Les dades es tractaren amb el programa GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) per a dissenyar els gràfics de barres corresponents. Els grups es compraren amb anàlisi de la variància (ANOVA); considerant estadísticament significatius els valors amb $p < 0.01$.

3. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball de fi de grau és la investigació dels efectes antitumorals del compost Minerval, fàrmac dissenyat de forma racional pel grup de Biomedicina Molecular Cel·lular dirigits pel Dr. Escribà i Dr. Busquets. Els estudis es realitzaren en càncer de glioma *in vitro* amb cèl·lules SF-295; i alhora amb cèl·lules d'adenocarcinoma humà A549, *in vitro* també.

Els objectius concrets d'aquest treball varen ser:

1. Aprendre les tècniques i mètodes de la investigació proposada.
2. Investigar el mecanisme d'acció de Minerval sobre l'expressió de la proteïna Akt, i DHFR, en cèl·lules SF-295 i A549 a partir de Western blot.
3. Posar a punt la tècnica de *CST's PathScan® Sandwich ELISA Kit* i es comprovar la seva aplicació a partir d'un estudi en els nivells de fosforilació de les proteïnes Akt i S6rp, amb les línies cel·lulars SF-295 i A549 .

4. RESULTATS

4.1. Efecte de Minerval sobre els nivells de la proteïna Akt i la seva forma activa (P-Akt), i l'expressió DHFR a partir de Western Blot

Es va avaluar el mecanisme d'acció antitumoral de 2OHOA sobre l'expressió de Akt i la seva forma fosforilada. Es realitzà en ambdues línies cel·lulars (SF-295 i A549) amb el mateix temps de tractament, 72 h. Alhora també es va tenir en compte l'expressió de DHFR, enzim involucrat en la síntesi de DNA i replicació.

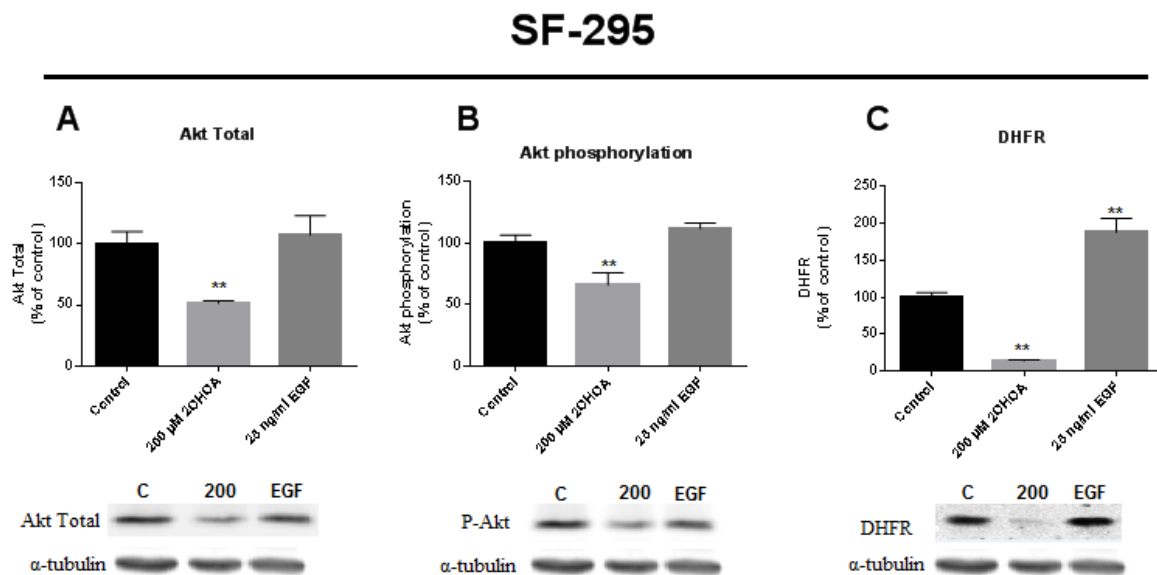


Figura 3. Efecte del tractament amb 2OHOA sobre l'expressió de Akt Total i fosforilada, i alhora sobre DHFR. Les proteïnes es separaren per Western Blot. (A) Diferències en els nivells de Akt Total. (B) Diferències en els nivells de Akt fosforilada. (C) Diferències en l'expressió de DHFR. S'indica un Western Blot representatiu baix cada figura corresponent. C= Control. 200= Tractat amb 2OHOA 200 µM. EGF= Tractat amb 25ng/ml de EGF. Les dades es troben representades en % referent als controls. La α -tubulina es va utilitzar com a control de càrrega. **= $p < 0.01$; (n=3).

A partir del Western Blot es va poder observar com Minerval induïa un efecte sobre els nivells de la proteïna Akt; tant en el cas de Akt Total (Figura 3A) com amb la forma activa de la proteïna (Figura 3B), reduint-los. D'altra banda, els resultats sobre el tractament amb l'estímul EGF es varen mantenir constants en ambdós casos, demostrant com EGF no mostra efectes d'inducció considerables en la via PI3K/Akt de SF-295.

D'altra banda, l'expressió de DHFR va mostrar una elevada i representativa disminució en les cèl·lules tractades amb 2OHOA respecte als controls. En aquest cas, la sobre estimulació a partir de EGF sí que es va veure reflectida per a l'expressió de DHFR (Figura 3C).

A549

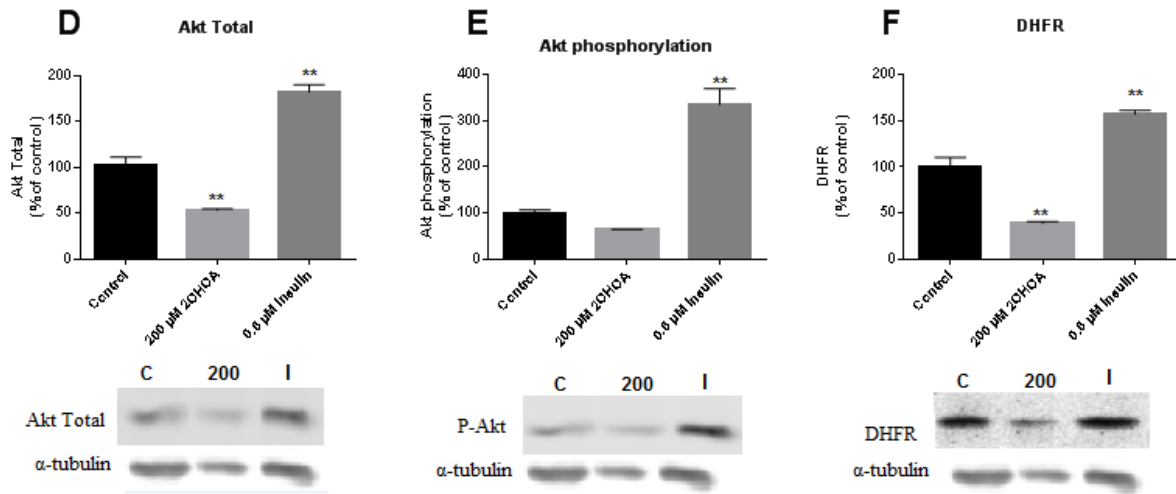


Figura 4. Efecte del tractament amb 20HOA sobre l'expressió de Akt Total i fosforilada, i alhora sobre DHFR. Les proteïnes es separaren per Western Blot. (C) Diferències en els nivells de Akt Total. (D) Diferències en els nivells de Akt fosforilada. (F) Diferències en l'expressió de DHFR. S'indica el Western Blot representatiu baix cada figura corresponent. C= Control. 200= Tractat amb 20HOA 200 μM. I= Tractat amb 0,6 μM d'insulina. Les dades es troben representades en % referent als controls. La α-tubulina es va utilitzar com a control de càrrega. **= $p > 0.01$; (n=3).

Pel que fa a la línia cel·lular A549 es varen donar cassos semblants. Minerval va induir de nou una disminució en els nivells de Akt, tant total com fosforilada, de les cèl·lules tractades. En aquest cas, l'estímul utilitzat va ser la insulina, la qual va mostrar efectes molt positius sobre la inducció de la via PI3K/Akt, ja que els nivells d'aquesta proteïna es troben sobre expressats quant al control (Figures 4D i 4E).

L'enzim DHFR també va mostrar una menor expressió, corroborant l'eficiència de Minerval en el tractament. A més, la insulina també va donar resultats positius sobre l'expressió de DHFR, elevant el seus nivells respecte el control (Figura 4F).

Les dades representades a totes les figures es troben expressades com a percentatge respecte a les cèl·lules tumorals no tractades. L'anàlisi d'ambdues línies es troba interpretat a de *GraphPad Prism v.6*.

4.2. Posta a punt de la tècnica CST's PathScan® Sandwich ELISA Kit i comprovació a partir dels nivells de fosforilació en Akt i S6rp

Es va estudiar l'efecte de Minerval (20HOA) sobre la fosforilació de les proteïnes Akt i S6rp, ambdues proteïnes relacionades en la via PI3K/Akt, via amb un paper important en la supervivència cel·lular i inhibició de l'apoptosi. Part de l'estudi es va fer a partir dels *Sandwich ELISA Kits*, realitzant una posta a punt de la tècnica. Es va elaborar una prova amb diferents concentracions proteïques a partir de la placa de SF-295 amb 72 h de tractament, tant per a Akt com per S6rp (Figura 5). A partir de les corbes, es varen escollir les concentracions per a les posteriors determinacions; quant a Akt es va escollir 0.3 mg/ml, i per a S6rp 0.05 mg/ml.

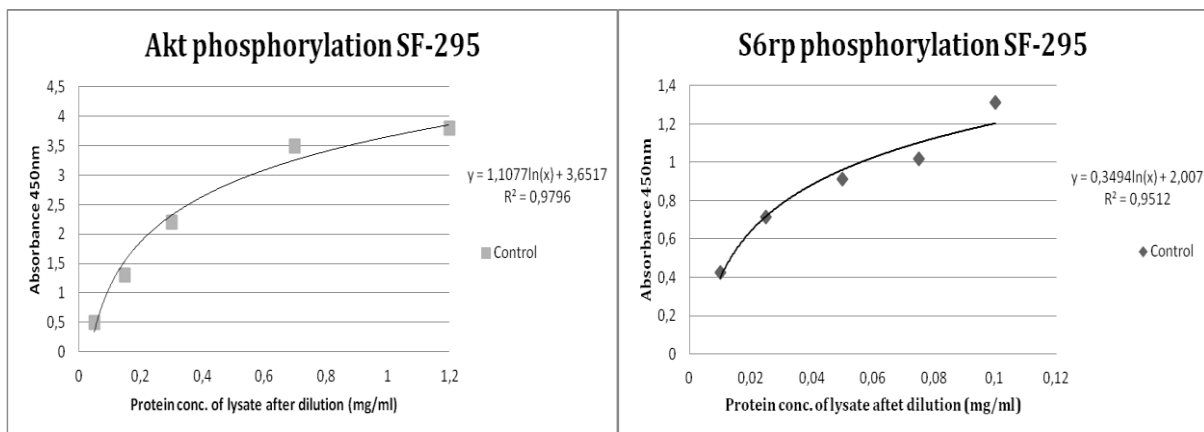


Figura 5. Corbes patró de P-Akt i S6rp a partir de diferents concentracions proteïques de la mostra SF-295 a 72h.

Tot i així, els resultats obtinguts a partir de *ELISA Kits* no varen ser els esperats. Les cèl·lules SF-295 si que presentaren uns valors estimats, on els nivells de P-Akt de les cèl·lules tractades amb 20HOA a 72 h, presenten un valor molt més baix en referència als control (Figura 8A). D'altra banda, quant a S6rp es va poder observar una lleugera baixada en les cèl·lules tractades amb 20HOA, sense mostrar una clara acció d'aquest sobre la seva expressió (Figura 8B). Alhora l'estímul utilitzar per a tractar SF-295, *Endotelial Growth Factor* (EGF) no va mostrar canvis considerables sobre l'estimulació de la via PI3K/Akt. En tractar les cèl·lules de la mateixa línia cel·lular (SF-295) amb les mateixes concentracions establides, però diferent temps de tractament (24 h i 48 h) els resultats obtinguts mostraren saturacions o incoherències en quant al tractament.

D'altra banda, en realitzar la prova amb la línia cel·lular A549 amb 72 h de tractament es presentaren també uns valors no estimats: en el cas de P-Akt, els nivells es troben constants en les

mostres estudiades, indicant que 2OHOA no indueix efecte sobre les cèl·lules A549 (Figura 6C). I en el cas de S6rp, els valors representats són il·lògics (Figura 6D).

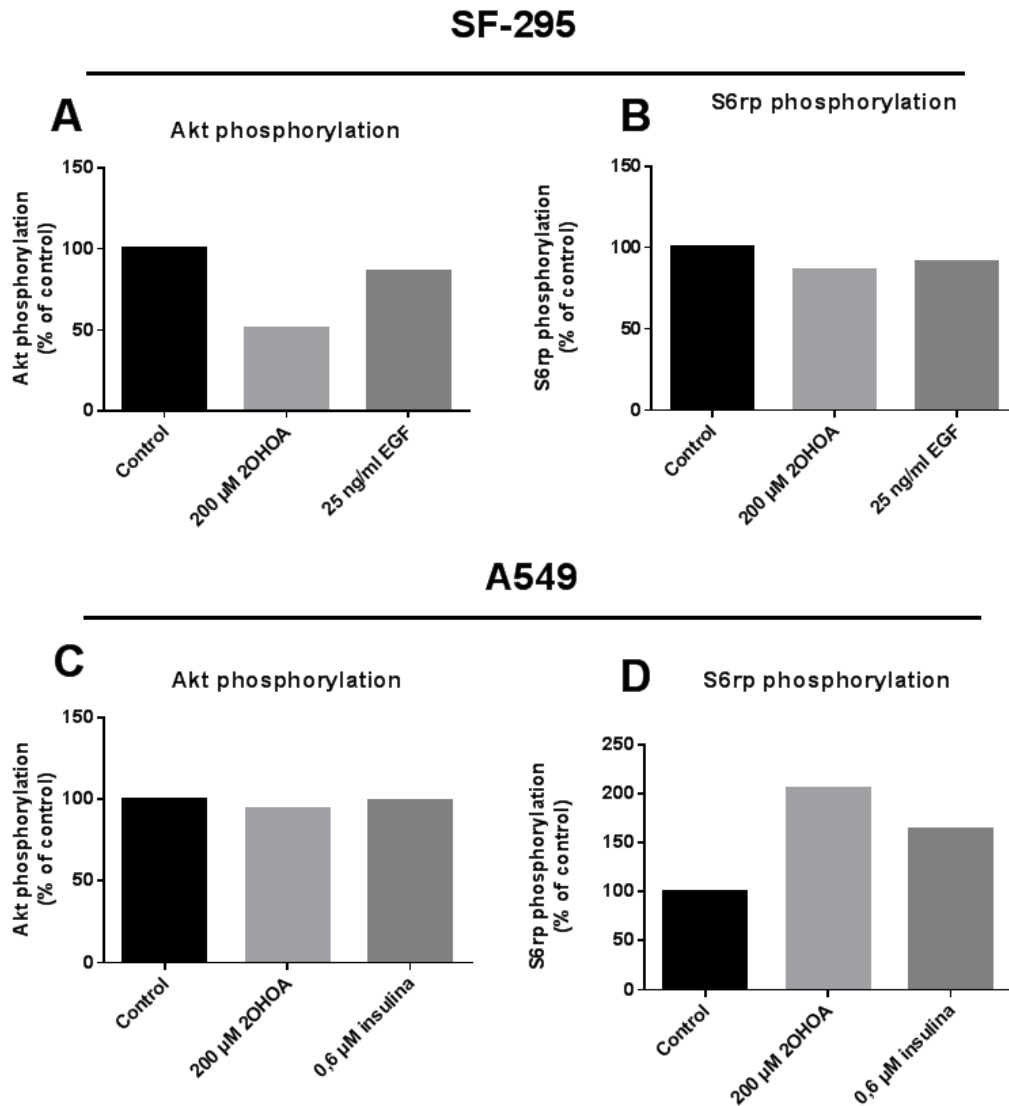


Figura 6. Efecte del tractament amb 2OHOA sobre les proteïnes Akt i S6rp. Determinació a partir de *ELISA Kits*. Les dades d'absorbància es troben representades en % referent als controls. (A) Diferència en els nivells de fosforilació de Akt en cèl·lules SF-295. (B) Diferència en els nivells de fosforilació de S6rp en cèl·lules SF-295. (C) Diferència en els nivells de fosforilació de Akt en cèl·lules A549. (D) Diferència en els nivells de fosforilació de S6rp en cèl·lules A549.

5. DISCUSSIÓ

Els tumors com el glioma presenten un pronòstic desfavorable i actualment unes limitacions terapèutiques. Els tumors primaris cerebrals, entre el quals el glioma és el més comú, presenten una elevada taxa de mortalitat (90%) (Brenner et al., 2009). Entre els gliomes existents, el glioblastoma n'és el més agressiu, a causa de la seva ràpida proliferació (Louis, 2006). D'altra banda, el càncer de pulmó és la primera causa de mort al món, provocant més d'un milió de morts a l'any (MacKinnon et al., 2010). Desafortunadament, les teràpies aplicades per ambdós càncers no presenten resultats a llarga durada (Isaacson, 2000; Jemal et al., 2006). Com a conseqüència d'aquesta manca de alternatives terapèutiques, un objectiu important en aquesta estudi va ser estudiar l'eficiència de Minerval (20HOA) sobre dues línies cel·lulars corresponents als càncers esmentats; SF-295 (glioblastoma) i A549 (adenocarcinoma de pulmó).

La via de senyalització del fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) juga un paper central en la regulació del creixement cel·lular, proliferació, supervivència, angiogènesi i metabolisme. La senyalització inadequada de PI3K, a causa de les aberracions genètiques, és un dels fets més freqüents en el càncer humà (Yuan et al., 2011). Akt és una proteïna citosòlica que promou la supervivència cel·lular a través de la inactivació per fosforilacions de dianes en la via de l'apoptosi. S'ha trobat que Akt desenvolupa un paper important en la supervivència de les línies cel·lulars experimentals de càncer de mama, pròstata, ovari, pulmó i teixit cerebral (David, 2001). D'altra banda, la proteïna ribosomal S6 (S6rp) codifica per a proteïnes involucrades en la progressió del cicle cel·lular (Peterson et al., 1998). Acord amb l'esmentat, en aquesta investigació es va fer un estudi sobre les proteïnes Akt i S6rp, ambdues relacionades en la via PI3K/Akt, per a veure els efectes de 20HOA sobre les línies cel·lulars SF-295 i A549.

5.1. Efecte de Minerval sobre els nivells de la proteïna Akt i la seva forma activa (P-Akt), i l'expressió DHFR a partir de Western Blot

En primer lloc, realitzarem un estudi sobre el mecanisme d'acció que Minerval induïa en les línies cel·lulars SF-295 (glioma humà) i A549 (adenocarcinoma de pulmó) baix l'efecte de 72 h de tractament. Per a aquesta determinació es va emprar la tècnica de *Western blot*, ja empleada en estudis previs sobre aquesta determinació.

A partir dels resultats es va mostrar com 20HOA indueix un efecte sobre la proteïna Akt, i per tant sobre la proliferació i supervivència cel·lular. Els nivells de la proteïna Akt varen

decréixer en ambdues línies cel·lulars després del tractament amb 2OHOA. La proteïna Akt (Akt total) esperàvem que mostres una constància entre les diferents condicions estudiades i es produís un canvi en els seus nivells de fosforilació. Però s'ha observat com Akt no ha mostrat constància, sinó valors semblants a la proteïna fosforilada; per tant els que ha induït 2OHOA ha estat un canvi en els nivells d'aquesta proteïna. Una reducció en els nivells de Akt es podria associar amb una reducció en al proliferació i supervivència de les cèl·lules tumorals.

L'estimulació de les vies de creixement cel·lular a través de EGF en la línia SF-295 no va presentar valors destacats en comparació amb el control. S'hauria de realitzar un estudi més detallat sobre aquesta inexpressió, provant d'aplicar diverses concentracions de EGF sobre aquesta línia d'investigació.

Es podria realitzar un estudi més profunditzat sobre l'efecte de 2OHOA a la línia cel·lular SF-295, on caldria realitzar *immunoblots* amb més repeticions, temps de tractaments i dianes. Alhora, també es podien realitzar estudis *in vivo*, en models de xenotransplants de glioma humà SF-295. Per ara no hi ha publicacions sobre l'efecte de 2OHOA en la línia cel·lular SF-295, ja que s'estan portant a terme aquests els estudis actualment. Tot i així, si que s'ha demostrat l'efecte positiu de 2OHOA sobre altres línies cel·lular de glioma, com en el cas de SF-767 (Terés et al., 2012); on entre els diversos estudis realitzats, es demostrà una disminució de la fosforilació d' Akt en el tractament amb 2OHOA.

La via de senyalització de Akt s'ha identificat com una potencial diana terapèutica en el càncer de pulmó no micocític (A549), ja que freqüentment es troba de forma constitutiva en aquest tipus de càncer de pulmó (David, 2001; Tang et al., 2006). Amb la línia A549 es mostraren resultats semblants; 2OHOA va induir un efecte sobre els nivells de Akt, reduint-los. Aquest resultat es traduiria amb una disminució del creixement cel·lular de A549 baix els efectes de 2OHOA en quant a estudis previs. Treballs d'investigació realitzats per LLadó et al., 2009 ja indicaren l'eficiència de 2OHOA *in vitro* en cèl·lules de càncer de pulmó A549; demostrant que el tractament d'aquestes cèl·lules amb 2OHOA inhibia la seva proliferació.

En aquest cas, l'estímul cel·lular escollit va ser la insulina, a partir de la qual sí que es varen poder observar resultats representatius. Tant els nivells de Akt total, com els de Akt fosforilada, mostraren un increment considerable en referència al control. Per tant, la insulina ha resultat ser un bon estímul per a línia cel·lular A549.

L'enzim DHFR es troba involucrat en la síntesi de DNA i per tant en la progressió cel·lular, esdeveniment clau en el cas del càncer. En investigacions anteriors realitzades per LLadó et al., 2009 demostraren com 2OHOA induïa una reducció significativa en els nivells d'expressió de DHFR. En aquest estudi els resultats concorden en referència als estudis previs; 2OHOA ha demostrat una reducció en l'expressió de DHFR tant en la línia cel·lular A549 com en el cas de SF-295. Aquesta disminució indica dificultat alhora de la replicació del DNA, i per tant la detenció de la proliferació en les cèl·lules tumorals. Com a resultat, es dona una disminució en la progressió dels tumors.

5.2. Posta a punt de la tècnica *CST's PathScan® Sandwich ELISA Kit* i comprovació a partir dels nivells de fosforilació en Akt i S6rp

En el nostre estudi realitzarem una posta a punt de la tècnica *CST's PathScan® Sandwich ELISA Kit* a partir del tractament cel·lular de la línia SF-295. S'utilitzaren dos *Sandwich ELISA kits*; un d'ells dirigit a P-Akt i l'altre a P-S6rp. Realitzarem una corba patró a partir de diferents concentracions escollides d'acord amb les demostracions indicades a cada kit. Per realitzar-la, s'utilitzaren cèl·lules SF-295 a 72 h.

A part, es va voler comprovar el mecanisme d'acció de 2OHOA a partir de l'aplicació dels *ELISA kit*. Per a la línia cel·lular SF-295 a 72h, l'aplicació del *ELISA kit* si que va mostrar un efecte de 2OHOA sobre la fosforilació de Akt, reduint els seus nivells. D'altra banda, S6rp va mostrar una reducció dels seus nivells de fosforilació amb el tractament de 2OHOA, però sense mostrar uns resultats prou representatius. Això es podria deure, a que la proteïna S6rp es troba en una posició molt *downstream* a la via de PI3K/Akt. En aquest cas, caldria realitzar investigacions més centrades en proteïnes directament relacionades amb S6rp, com per exemple en la via de mTOR; ja que la fosforilació de S6rp és important per mTOR en la regulació del creixement cel·lular, i l'absència d'aquesta equivaldria a la inhibició de mTOR ([Ruvinsky et al., 2006](#)). D'altra banda, l'estimulació de la via PI3K/Akt a partir de EGF no va mostrar una activació representativa de la via en la línia SF-295.

A partir de la repetició del protocol, amb les concentracions establides a partir de les corbes sobre la línia cel·lular SF-295 amb un temps de tractament de 24 i 48 h, els resultats obtinguts mostraren saturacions i incorreccions. En realitzar la prova de nou en la línia cel·lular A549, aquets tampoc va mostrar resultats concloents. La causa d'aquesta incoherència potser radica en la congelació de certs components del *ELISA kit*, com en el cas dels anticossos, tot i que en principi no es solen donar cassos de degradació per aquest motiu. O bé, aquest resultats són propis

d'error humà alhora de realitzar l'estudi, tot i que es va seguir detalladament el protocol determinar de igual manera que amb la línia anterior.

Per assegurar l'eficiència 2OHOA a partir de *ELISA kits* caldria realitzar l'experiment a partir d'un creixement i tractament de les línies cel·lulars de *novo*. Tot i així, aquest estudi reflecteix una possible inutilització d'aquest *ELISA kit* en la determinació de l'eficiència de 2OHOA. Caldria realitzar uns altres *ELISA kits* per observar realment si a partir d'aquesta tècnica es poden establir resultats concloents sobre l'acció de 2OHOA. Aquest estudi seria de gran interès ja que *ELISA kit* és un mètode alternatiu amb un pronòstic més immediat en referència a la tècnica més estandarditzada de determinació, el *immunoblotting* o Western Blot.

6. CONCLUSIONS

Les conclusions extretes a partir dels estudis realitzats han set:

1. Quant als estudis *in vitro*, a partir de Western blot s'ha comprovat que Minerval indueix un efecte antiproliferatiu sobre les cèl·lules de glioma SF-295 i les cèl·lules de pulmó A549, amb una reducció dels nivells de la proteïna Akt.
2. El tractament amb Minerval redueix l'expressió de DHFR, necessària per a la síntesi de purines i pirimidines, i en general la replicació del DNA. Aquests resultats indiquen en part que l'efecte antitumoral de Minerval es troba lligat a DHFR.
3. Referents a la tècnica *ELISA kit*, no s'ha pogut demostrar realment l'eficiència d'aquesta tècnica de determinació en el nostre estudi. Caldria una investigació més profunditzada sobre l'aplicació de *ELISA kits*.
4. Potenciar la teràpia lipídica de membrana com a tractament per a una de les malalties amb més incidència com és el cas del càncer.

Per concloure, m'agradaria potenciar la idea de la teràpia lipídica de membrana quant al tractament del càncer. Aquesta teràpia és un nou enfocament terapèutic on l'alteració dels lípids de membrana són l'objectiu principal. La varietat de lípids, les diferents estructures que formen, i les alteracions de la membrana lipídica que es donen en un elevat nombre de patologies, indiquen que la teràpia lipídica de membrana es podria desenvolupar per a tractar un gran nombre de malalties humanes. Generalment tots els tractaments es troben relacionats amb l'alteració d'una única proteïna; en canvi la teràpia de membrana lipídica, a través de la qual Minerval actua, modifica gran part de les vies i proteïnes que es troben relacionades directament amb aquesta i que promouen senyals de proliferació i supervivència cel·lular. Per tant, Minerval podria ser un fàrmac de referència per al tractament de glioma i càncer de pulmó, a més de molts altres càncers, gràcies a la seva elevada eficàcia i nul·la toxicitat.

7. BIBLIOGRAFIA

- Altomare DA., Testa JR. (2005) Perturbation of the Akt signaling pathway in human cancer. *Oncogene*.24(50):7455-64.
- Barceló F., Prades J., Funari SS., Frau J., Alemany R., Escribà PV. (2004) The hypotensive drug 2-hydroxyoleic acid modifies the structural properties of model membranes. *Mol Membr Biol*. 21: 261–8.
- Barceló-Coblijna G., Martin ML., de Almeida R., Noguera-Salvà MA, Marcilla-Etxenike A.,Guardiola-Serrano F.,Lüth A., Kleuser B., Halver JE., Escribà PV. (2011)Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy.*Proc Natl Acad Sci USA*. 108 (49) 19569-19574.
- Bartke N., Hannun YA. (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research*. 50:S91–S96 (Suppl.).
- Bertino JR (1993) Karnofsky memorial lecture. Ode to methotrexate. *J Clin Oncol* 11:5–14.
- Bhattacharya, K., Naha, P. C., Naydenova, I., Mintova, S., & Byrne, H. J. (2012). Reactive oxygen species mediated DNA damage in human lung alveolar epithelial (A549) cells from exposure to non-cytotoxic MFI-type zeolite nanoparticles. *Toxicology letters*, 215(3), 151-160.
- Brenner, H., Francisci, S., De Angelis, R., Marcos-Gragera, R., Verdecchia, A., Gatta, G., ... & EURO CARE Working Group. (2009). Long-term survival expectations of cancer patients in Europe in 2000–2002. *European Journal of Cancer*, 45(6), 1028-1041.
- Bullard D., Bigner S., Bigner D. (1981) The morphologic response of cell lines derived from human gliomas to dibutyryl adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*.40(3), 230-246.
- Cetin I., Topcul M. (2012) Cancer stem cells in oncology. *Journal of BUON*. 17:644-648.
- Cordomi A., Prades J., Frau J., Vögler O., Funari SS., Perez JJ., Escibà PV., Barceló F. (2010) Interactions of fatty acids with phosphatidylethanolamine membranes: X-ray diffraction and molecular dynamics studies. *Journal of Lipid Research*. 51:1113–1124.
- David, O. (2001). Akt and PTEN: New diagnostic markers of non-small cell lung cancer?. *Journal of cellular and molecular medicine*, 5(4), 430-433.
- Dufner A., Thomas G. (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Experimental cell research*. 253(1):100-9.
- Dong H., Luo L., Hong S., Siu H., Xiao Y., Jin L., Chen R., Xiong M. (2010) Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst Biol*. 4:163.
- Escribà PV. (2006) Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends in molecular medicine*. Vol.12,No.1
- Ettl, T., Schwarz-Furlan, S., Haubner, F., Müller, S., Zenk, J., Gosau, M., Reichert T., Zeitler, K. (2012). The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localisation. *Oral oncology*, 48(9), 822-830.
- Fenton TR, Gout IT. (2011) Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol*. 43(1):47-59.
- Ferrari S., Bandi HR., Bussian BM., Thomas G. (1991) Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *The Journal of the Biological Chemistry*. 266(33):22770-5.
- Flotow H., Thomas G. (1992) Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver. *The Journal of the Biological Chemistry*. 267(5):3074-8.
- Friede RL., Janzer RC., Roessmann U. (1982) Infantile small cell gliomas. *Acta Neuropathologica*. 57(2-3):103-10.
- Gatzemeier, U., Pluzanska, A., Szczesna, A., Kaukel, E., Roubec, J., De Rosa, F., ... & Von Pawel, J. (2007). Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: The Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 25(12), 1545-1552.
- Globocan (2012). "<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>"
- Gokhale, V. M., & Kulkarni, V. M. (2000). Selectivity analysis of 5-(arylothio)-2, 4-diaminoquinazolines as inhibitors of *Candida albicans* dihydrofolate reductase by molecular dynamics simulations. *Journal of computer-aided molecular design*, 14(5), 495-506.
- Hers I., Vincent EE., Tavaré JM. (2011) Akt signalling in health and diseases. *Cellular signalling*. 23(10):1515-27.
- Isaacson, S. R. (2000). Radiation therapy and the management of intramedullary spinal cord tumors. *Journal of neuro-oncology*, 47(3), 231-238.
- Itoh Y., Kowada M., Mineura K., Kojima H. (1987) Congenital glioblastoma of the cerebellum with cytofluorometric deoxyribonucleic acid analysis. *Surgical neurology*. 27(2):163-7.
- Jefferies HB., Fumagalli S., Dennis PB., Reinhard C., Pearson RB., Thomas G. (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6K. *The EMBO Journal*. 16(12):3693-704.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., & Thun, M. J. (2006). Cancer statistics, 2006. *CA: a cancer journal for clinicians*, 56(2), 106-130.
- Jiang, H., Shang, X., Wu, H., Gautam, S. C., Al-Holou, S., Li, C., ... & Chopp, M. (2009). Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 8(1), 25.
- Krieg J., Hofsteenge J., Thomas G. (1988) Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *The Journal of the Biological Chemistry*. 263(23):11473-7.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-5.
- LaRocca, R. V., Rosenblum, M., Westermark, B., & Israel, M. A. (1989). Patterns of proto-oncogene expression in human glioma cell lines. *Journal of neuroscience research*, 24(1), 97-106.
- Leu S., von Felten S., Frank S., Vassella E., Vajtai I., Taylor E., Schulz M., Hutter G., Hench J., Schucht P., Boulay JL., Mariani L. (2013) IDH/MGMT-driven molecular classification of low-grade glioma is a strong predictor for long-term survival. *Neuro-oncology*.15(4):469-79.

- Liberski PP, Kordek R. (1997) Ultrastructural pathology of glial brain tumors revisited: a review. *Ultrastructural Pathology*. 21(1):1-31.
- Lladó V, López D, Iburguren M, Alonso M, Soriano J, Escribà P, Busquets X. (2014) Regulation of the cancer by NaChOleate. Effects on cell signaling and therapeutical relevance in glioma. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1838:1619-1627.
- Lladó V, Terés S, Higuera M, Alvarez R, Noguera-Salva MA, Halver JE, Escribà PV, Busquets X. (2009) Pivotal role of dihydrofolate reductase knockdown in the anticancer activity of 2-hydroxyoleic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(33):13754-8.
- LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein Wb, Dennis PA. (2008) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combination and clinical considerations. *Drug Resistance Update*. 11(1-2):32-50.
- Louis, D. N. (2006). Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1, 97-117.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- MacKinnon, A. C., Kopatz, J., & Sethi, T. (2009). The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. *British medical bulletin*, 95, 47-61.
- Manning BD, Cantley LC. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 129(7):1261-74.
- Marcilla-Etxenike A, Martin ML, Noguera-Salva MA, García-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Dey I, Escribà PV, Busquets X. (2012) 2-Hydroxyoleic acid induces ER stress and autophagy in various human glioma cell lines. *PLoS ONE*. 7(10): e48235.
- Martin KA, Schalm SS, Romanelli A, Keon KL, Blenis J. (2001) Ribosomal S6 kinase 2 inhibition by a potent C-terminal repressor domain is relieved by mitogen-activated protein-extracellular signal-regulated kinase kinase-regulated phosphorylation. *The Journal of the Biological Chemistry*. 276(11):7892-8.
- Martin ML, Liebisch G, Lehneis S, Schmitz G, Sande MA, Bestard-Escalas J, Lopez DH, García-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Busquets X, Escribà PV, Barceló-Coblijn G. (2013) Sustained activation of sphingomyelin synthase by 2-hydroxyoleic acid induces sphingolipidosis in tumor cells. *Journal of Lipid Research*. 54(5):1457-65.
- Martínez J, Vögler O, Casas J, Barceló F, Alemany R, Prades J, Nagy T, Baamonde C, Kasprzyk PG, Terés S, Saus C, Escribà PV. (2005) Membrane structure modulation, protein kinase C alpha activation, and anticancer activity of Minerval. *Mol Pharmacol* 67: 531-40.
- McLendon, R., Friedman, A., Bigner, D., Van Meir, E. G., Brat, D. J., Mastrogianakis, G. M., ... & Nicol, R. (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 455(7216), 1061-1068.
- Minna, J. D. (1993). The molecular biology of lung cancer pathogenesis. *CHEST Journal*, 103(4_Supplement), 449S-456S.
- Menéndez, M. H., & Hernández, M. D. L. Á. R. (1999). Oncogenes y cáncer. *Rev Cubana Oncol*, 15(2), 131-9.
- Meron, P. M. (1995) Preparation, culture, and analysis of amniotic fluid samples. *Current Protocols in Human Genetics*. 8-4.
- Nister, M., Libermann, T. A., Betsholtz, C., Pettersson, M., Claesson-Welsh, L., Heldin, C. H., Schlessinger J., Westermark, B. (1988). Expression of messenger RNAs for platelet-derived growth factor and transforming growth factor- α and their receptors in human malignant glioma cell lines. *Cancer research*, 48(14), 3910-3918.
- Oving, I. M., & Clevers, H. C. (2002). Molecular causes of colon cancer. *European journal of clinical investigation*, 32(6), 448-457.
- Peterson RT, Schreiber SL. (1998) Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Current Biology*. 8(7):R248-50.
- Pinzón CE, Serrano ML, Sanabria MC. (2009) Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Revista Ciencias de la Salud*. 7(2):47-66.
- Rutka J, Giblin J, Dougherty D, Liu H, McCulloch J, Bell C, Stern R, Wilson C, Rosenblum M. (1987) Establishment and characterization of five cell lines derived from human malignant gliomas. *Acta Neuropathol*. 75:92-103.
- Ruvinsky I, Meyuhas O. (2006) Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to the cell size. *Trends Biochem Sci*. 31(6):342-8.
- Spector AA, Yorek MA. (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of lipid research*. 26(9):1015-35.
- Tang, J. M., He, Q. Y., Guo, R. X., & Chang, X. J. (2006). Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis. *Lung cancer*, 51(2), 181-191.
- Tafesse FG, Ternes P, Holthuis JC. (2006) The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem*. 281:29421-29425.
- Terés S, Lladó V, Higuera M, Barceló-Coblijn G, Martin ML, Noguera-Salva MA, Marcilla-Etxenike A, García-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Sausa C, Gómez-Pinedo U, Busquets X, Escribà PV. (2012) 2-Hydroxyoleate, a nontoxic membrane binding anticancer drug, induces glioma cell differentiation and autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:8489-8494.
- Terés S, Lladó V, Higuera M, Barceló-Coblijn G, Martin ML, Noguera-Salva MA, Marcilla-Etxenike A, García-Verdugo JM, Soriano-Navarro M, Sausa C, Gómez-Pinedo U, Busquets X, Escribà PV. (2012) Normalization of sphingomyelin levels by 2-hydroxyoleic acid induces autophagic cell death of SF767 cancer cells. *Autophagy*. 8(10):1542-1544.
- Yuan, J., Mehta, P. P., Yin, M. J., Sun, S., Zou, A., Chen, J., ... & Bagrodia, S. (2011). PF-04691502, a potent and selective oral inhibitor of PI3K and mTOR kinases with antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics*, 10(11), 2189-2199.