

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA**

*Departamento de Ciencias
Médicas y Quirúrgicas*

Facultad de Ciencias de la Salud



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Tesis Doctoral

Efecto de la inhibición de la isoprenilación de la proteína RhoA por las estatinas lipofílicas sobre la supervivencia celular de líneas celulares de condrosarcoma.

Tesis Doctoral presentada por **D. Ulises Torres López**,
Licenciado en Medicina y Cirugía para optar al grado de Doctor.

DIRECTOR: Dr. José Manuel García Castellano



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA
Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Anexo I

**D. JUAN RAMÓN HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, SECRETARIO DEL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS DE LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

CERTIFICA,

Que el Consejo Ordinario de Departamento de Doctores en su sesión de fecha 29 de julio de 2014, tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "Efecto de la inhibición de la isoprenilación de las proteínas Rho sobre la supervivencia celular de líneas celulares de condrosarcoma", presentada por el/la doctorando/a, Don/Dña: Ulises Torres López y dirigida por el doctor Don José Manuel García Castellano.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a ocho de abril de dos mil quince.





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS
DE GRAN CANARIA

Anexo II

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento/Instituto/Facultad Ciencias Médicas y Quirúrgicas

Programa de doctorado Avances en Traumatología. Medicina del Deporte.
Cuidados de heridas

Título de la Tesis

Efecto de la inhibición de la isoprenilación de la proteína RhoA por las estatinas

lipofílicas sobre la supervivencia celular de líneas celulares de condrosarcoma

Tesis Doctoral presentada por D/D^a Ulises Torres López

Dirigida por el Dr/a. D/D^a. José Manuel García Castellano

El/la Director/a,

(firma)

El/la Doctorando/a,

(firma)

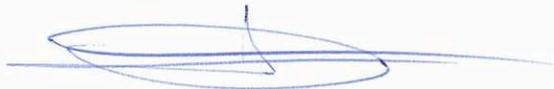
Las Palmas de Gran Canaria, a 25 de Marzo de 2015

D. JOSÉ MANUEL GARCÍA CASTELLANO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DE LA UNIDAD DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DEL COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO INSULAR-MATerno INFANTIL DE LAS PALMAS

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "**Efecto de la inhibición de la isoprenilación de la proteína RhoA por las estatinas lipofílicas sobre la supervivencia celular de líneas celulares de condrosarcoma**", ha sido realizada por D. Ulises Torres López, bajo mi dirección y asesoramiento técnico, y que una vez revisada la presente Memoria la encuentra apta para su defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extienden el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 08 de abril de 2015.



Fdo: Dr. José Manuel García Castellano

AGRADECIMIENTOS



AGRADECIMIENTOS

En este apartado quisiera empezar por mi familia, en especial, a mi madre. Sin tu apoyo incondicional, todo esto hubiera seguido otro curso. Para ti también este premio.

En segundo lugar a mi director de Tesis al Dr. José M. García Castellano, desde que comenzamos este proyecto juntos hasta hoy, nunca hemos perdido la ilusión y la esperanza pese a las adversidades. Por su asesoramiento y tutela durante el desarrollo de este trabajo y por su inestimable ayuda a la hora de analizar los datos obtenidos. Gracias por confiar en mí y despertar el investigador que llevaba dentro.

Quiero hacer mención especial a los que iniciaron la andadura de esta línea de trabajo y gracias a los que hemos podido llegar a buen puerto, especialmente a la Dra. Ainara Arín Martínez, al Dr. Rubén Pérez Machín, al Dr. Octavio Hernández Perera y a la Dra. Pilar Fernández Valerón.

Quisiera expresar y agradecer la buena disposición de los distintos centros donde he desarrollado parte de mi doctorado: al Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la U.L.P.G.C.; al Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la U.L.P.G. C.; y a la Unidad de Apoyo a la Investigación del C.H.U.I.M.I

Un agradecimiento muy especial merecen aquellas personas que han demostrado ser pacientes y comprensivas así como el ánimo recibido.

A todos ellos, muchas gracias

RESUMEN

RESUMEN

Los condrosarcomas son tumores de origen mesenquimal con un elevado grado de agresividad debido a la resistencia inherente a la quimioterapia y a la radioterapia. La única opción en la actualidad es la cirugía radical, habitualmente responsable de una elevada morbilidad debido a que suele ser muy mutilante. Estos hechos obligan a la búsqueda de alternativas terapéuticas que proporcionen soluciones a esta patología.

Las estatinas, inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril-Coenzima A reductasa, son fármacos utilizados habitualmente para el tratamiento de los elevados niveles de colesterol plasmático. Sin embargo, cada vez existen más evidencias de su utilidad como fármacos útiles en el tratamiento de numerosas neoplasias.

En el presente trabajo que se presenta como Tesis Doctoral se ha estudiado el efecto *in vitro* de las estatinas sobre la viabilidad celular, la inducción de apoptosis celular y las modificaciones en la prenilación de la proteína RhoA en líneas celulares de condrosarcoma. Hemos observado que las estatinas lipofílicas inducen un descenso de la viabilidad celular, una inducción de muerte celular por apoptosis, con alteración concomitante en la prenilación de la proteína RhoA, que se encuentran *downstream* en la vía del mevalonato.

Aunque se trata de un estudio *in vitro*, este trabajo abre una vía prometedora para el tratamiento de estos tumores tan agresivos. Sin embargo, aun deben ser confirmados estos resultados en el animal de experimentación para, posteriormente, plantear un ensayo en humanos.

SUMMARY

Chondrosarcomas are tumours of mesenchymal origin with a high degree of aggressiveness due to the inherent resistance to chemotherapy and radiotherapy. The only option today is radical surgery, usually responsible for high morbidity because it can be very crippling. These facts push the search for therapeutic alternatives that provide solutions to this disease.

Statins, inhibitors of the enzyme hydroxy-methyl-glutaryl-Coenzyme A reductase, are drugs commonly used to treat high levels of plasma cholesterol. However, there is increasing evidence of its usefulness as drugs useful in the treatment of numerous malignancies.

In this work presented as Doctoral Thesis, it has been studied the in vitro effect of statins on cell viability, induction of apoptosis and changes in the prenylation of RhoA protein in chondrosarcoma cell lines. We observed that lipophilic statins induce a decrease of cell viability, induction of apoptotic cell death, with concomitant alterations in protein prenylation of RhoA, located downstream in the mevalonate pathway.

Although this is an in vitro study, this work opens a promising avenue for the treatment of these tumours so aggressive. However, these results must be first confirmed in animal models, and then, to propose a human trial.

INDICE

Índice

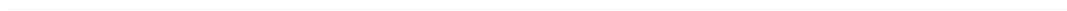
| | Página |
|---|---------------|
| <u>INDICE DE TABLAS</u> | 1 |
| <u>INDICE DE FIGURAS</u> | 2 |
| <u>INTRODUCCIÓN</u> | 6 |
| 1.CONDROSARCOMAS | 6 |
| 1.1. Introducción | 6 |
| 1.2. Clasificación | 6 |
| 1.3. Diagnóstico | 8 |
| 1.3.1. Radiología | 8 |
| 1.3.2. Histopatología | 10 |
| 1.4. Tratamiento | 11 |
| 1.4.1. Cirugía | 11 |
| 1.4.2. Radioterapia | 13 |
| 1.4.3. Quimioterapia | 13 |
| 1.5. Pronóstico | 14 |
| 1.6. Biología Molecular | 15 |
| 2 ESTATINAS | 18 |
| 2.1 Introducción | 18 |
| 2.2 Características principales de las estatinas | 19 |
| 2.2.1. Método de obtención | 19 |
| 2.2.2. Solubilidad | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.3. Metabolismo de las estatinas | 20 |
| a) Metabolismo hepático | 20 |
| b) Excreción | 20 |
| 2.2.4. Mecanismo de acción | 20 |
| 2.2.5. Permeabilidad de las estatinas | 23 |
| 2.3 Biosíntesis del colesterol | 23 |
| 2.4 Isoprenilación proteica | 24 |
| 2.5 Proteínas RhoGTPasas | 26 |
| 3. APOPTOSIS | 28 |
| 3.1. Introducción | 28 |
| 3.2. Cambios Morfológicos | 30 |
| 3.3. Vías de señalización de la apoptosis | 31 |
| 3.3.1. Vías implicadas en la transducción de señal | 31 |
| 3.3. 2. Factores de transcripción implicados | 32 |
| <u>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</u> | 34 |
| 1. PLANTEAMIENTO | 34 |
| 2. OBJETIVOS | 35 |
| 2.1.- Objetivo general | 35 |
| 2.2.- Objetivos específicos | 35 |

| | |
|---|-----------|
| <u>MATERIAL Y METODOS</u> | 36 |
| 1. MATERIALES | 36 |
| 2. CELULAS Y CULTIVOS CELULARES | 36 |
| 2.1. Cultivo primario de condroblastos | 37 |
| 2.2 Tratamientos | 37 |
| 3. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR | 38 |
| 4. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS | 39 |
| 4.1. Técnica de DAPI | 39 |
| 4.2. Estudio de la fragmentación del ADN | 40 |
| 4.3. Citometría de flujo con el doble marcaje de anexina V y ioduro de propidio | 41 |
| 5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA | 43 |
| 5.1. Obtención de lisados totales: preparación para medir la proteína RhoA | 43 |
| 5.2. Obtención de fracciones celulares: fraccionamiento subcelular para la proteína RhoA | 43 |
| 5.3. Cuantificación de proteínas | 44 |
| 5.4. Ensayos de Western Blot | 44 |
| 6. ANALISIS ESTADISTICO | 45 |

| | |
|--|-----------|
| <u>RESULTADOS</u> | 46 |
| 1.- ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR | 46 |
| 1.1.- La simvastatina tiene un efecto antiproliferativo en las líneas de condrosarcoma de rata LTC y C422 | 46 |
| 1.2.- Las estatinas lipofílicas ejercen un efecto antiproliferativo que es dependiente del tiempo y la dosis en las líneas SW1353 | 52 |
| 1.3.- El mevalonato y el GGPP revierten la toxicidad inducida por las estatinas en las líneas SW1353 | 55 |
| 2.- ENSAYO DE APOPTOSIS | 58 |
| 2.1.- Modificaciones morfológicas en las líneas LTC y C422 | 58 |
| 2.2.- Estudio mediante marcaje con DAPI | 59 |
| 2.3.- Estudio de apoptosis mediante <i>DNA laddering</i> | 61 |
| 2.4.- Estudio de apoptosis mediante citometría de flujo | 63 |
| 3.- ESTUDIO DE LA EXPRESION PROTEICA | 69 |
| <u>DISCUSIÓN</u> | 72 |
| <u>CONCLUSIONES</u> | 86 |
| <u>BIBLIOGRAFÍA</u> | 89 |

INDICE DE TABLAS



INDICE DE TABLAS

| | PÁGINA |
|--|--------|
| Tabla 1. Posibles vías moleculares que representan nuevas opciones terapéuticas en el condrosarcoma convencional. | 17 |
| Tabla 2: Propiedades farmacocinéticas clínicas de los inhibidores de la HMG- CoA reductasa. | 22 |
| Tabla 3. Diferencias generales entre apoptosis y necrosis. | 30 |
| Tabla 4. Relación de estatinas usadas, casas comerciales y dosis usadas en estos experimentos. | 38 |
| Tabla 5. Valores de las IC ₅₀ de las líneas tumorales LTC y C422 frente al control NIH3T3. | 48 |
| Tabla 6. Representación de la sensibilidad a las estatinas (IC ₅₀) en la línea de condrosarcoma humano SW1353. | 54 |
| Tabla 7. Porcentaje de células positivas para DAPI en tratamiento con simvastatina en condrosarcoma de rata. | 59 |
| Tabla 8. Porcentaje de células anexina V ⁺ /IP ⁺ respecto a la situación control tras tratamiento con simvastatina, con GGTI y con FTI en células de condrosarcoma humano. | 67 |
| Tabla 9. Porcentaje de células anexina V ⁺ /IP ⁺ respecto a la situación control tras tratamiento con simvastatina y a lo largo de diferentes tiempos en el condrosarcoma humano. | 68 |

INDICE DE FIGURAS



INDICE DE FIGURAS

PÁGINA

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Imagen radiológica radio-opaca de aspecto moteado. | 8 |
| Figura 2. Imagen macroscópica. Tumor lobulado de aspecto opalescente y consistencia elástica que puede presentar calcificaciones. | 10 |
| Figura 3. Imagen microscópica. Tejido sarcomatoso constituido por cartílago hialino. | 11 |
| Figura 4. Estructura química de las estatinas. | 18 |
| Figura 5. Biosíntesis del colesterol. | 25 |
| Figura 6. Transducción de la señal a través de las proteínas Rho-GTP. | 27 |
| Figura 7. Disminución de la viabilidad celular en líneas celulares de condrosarcoma de rata. | 46 |
| Figura 8. Representación de la viabilidad celular en líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422. | 47 |
| Figura 9. Representación de la viabilidad celular en líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC en comparación con la de condroblastos primarios y fibroblastos. | 48 |
| Figura 10. Representación de la viabilidad celular en líneas celulares de condrosarcoma de rata C422 en comparación con la de condroblastos primarios y fibroblastos. | 49 |
| Figura 11. Disminución de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma de rata LTC dependiente de la dosis administrada de simvastatina. | 50 |
| Figura 12. Disminución de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma de rata LTC dependiente de la dosis de simvastatina y del tiempo. | 51 |
| Figura 13. Disminución de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma humano SW1353 dependiente de la dosis de simvastatina y del tiempo. | 52 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 14. Disminución de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma humano SW1353 dependiente de la dosis de lovastatina (A), de atorvastatina (B) y de fluvastatina (C), y del tiempo. | 53 |
| Figura 15. No afectación de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma humano SW1353 con la pravastatina. | 54 |
| Figura 16. Representación de la sensibilidad a las estatinas (IC_{50}) en la línea de condrosarcoma humano SW1353. | 55 |
| Figura 17. Representación de la sensibilidad a la simvastatina en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El proceso es dependiente de la vía del mevalonato. | 56 |
| Figura 18. Representación de la sensibilidad a la lovastatina en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El proceso es dependiente de la vía del mevalonato. | 56 |
| Figura 19. Representación de la sensibilidad a la atorvastatina en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El proceso es dependiente de la vía del mevalonato. | 57 |
| Figura 20. Representación de la sensibilidad a la fluvastatina en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El proceso es dependiente de la vía del mevalonato. | 57 |
| Figura 21. Cambios morfológicos característicos de apoptosis inducidos por el tratamiento con simvastatina en las líneas LTC y C422. | 58 |
| Figura 22. Fotografía y representación gráfica de la inducción de apoptosis evaluada mediante la tinción de DAPI tras tratamiento de las células de condrosarcoma de rata con simvastatina. | 60 |
| Figura 23. Representación gráfica de la inducción de apoptosis evaluada mediante la degradación del ADN tras tratamiento de las células de condrosarcoma de rata con simvastatina. | 61 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 24. Representación gráfica de la inducción de apoptosis evaluada mediante la degradación del ADN tras tratamiento de las células de condrosarcoma humano con simvastatina. | 62 |
| Figura 25. Representación gráfica de la inducción de apoptosis evaluada mediante la degradación del ADN tras tratamiento de las células de condrosarcoma humano con diferentes estatinas y con GGTI. | 63 |
| Figura 26. Representación gráfica del perfil del ciclo celular en la situación control y tras tratamiento con 10 μ M de simvastatina de las células de condrosarcoma de rata. | 64 |
| Figura 27. Incremento del pico SubG0 tras el tratamiento con las estatinas lipofílicas, pero no con la hidrofílica (pravastatina). | 64 |
| Figura 28. Incremento del pico SubG0 tras el tratamiento con la simvastatina, que se revierte con el GGPP, pero no tras la adición de FPP. | 65 |
| Figura 29. Incremento del pico SubG0 tras el tratamiento con la simvastatina, que se mimetiza con el GGTI, pero no con el tratamiento con FTI. | 66 |
| Figura 30. Incremento de la fracción de células anexina V ⁺ /IP ⁺ tras el tratamiento con la simvastatina, que se mimetiza con el GGTI, pero no con el tratamiento con FTI, y se revierte por el GGPP y el mevalonato, pero no por el FPP. | 67 |
| Figura 31. Incremento dependiente del tiempo de la fracción de células anexina V ⁺ /IP ⁺ tras el tratamiento con la simvastatina. | 68 |
| Figura 32. Acúmulo de la forma no isoprenilada de la proteína RhoA tras tratamiento con simvastatina. | 69 |
| Figura 33. De-localización de la forma no isoprenilada de la proteína RhoA desde la membrana al citosol tras tratamiento con simvastatina. Este efecto fue revertido por el mevalonato y mimetizado por GGTI. | 70 |

Figura 34. De-localización de la forma no isoprenilada de la proteína RhoA desde la membrana al citosol tras tratamiento con simvastatina. Este efecto fue revertido por el mevalonato y se produce igualmente con las estatinas lipofílicas, pero no con la hidrofílica (pravastatina)

71

INTRODUCCIÓN



1. CONDROSARCOMAS

1.1. Introducción

El condrosarcoma es un tumor maligno que forma parte del grupo de tumores de origen mesenquimal denominados sarcomas. Es un tumor de crecimiento lento proveniente del tejido cartilaginoso. Supone en torno al 25% de los tumores óseos primarios. Como se ha dicho anteriormente, se origina a partir del cartílago y se diagnostica en pacientes de 40 a 60 años de edad, siendo raro encontrarlo en pacientes menores de 20 años, en menos del 4% de los casos. El tumor primario se suele localizar habitualmente en la cintura escapular (15%), en la parte proximal del fémur (20%) o en la pelvis (30%). En el esternón y en la escápula se considera que es el tumor maligno más frecuente que se encuentra en estas localizaciones anatómicas (Forscher, 2000).

Es un tumor relativamente poco frecuente. Su incidencia es difícil estimar, calculándose una incidencia anual del 3.6% de todos los tumores óseos primarios en E.E.U.U. (Jemal, 2006). En nuestro entorno, en las Islas Canarias, en el registro publicado en 2007 se observaron 39 casos en varones y 22 casos en mujeres, lo cual representa una incidencia estandarizada por edad de 0,9 y 0,6 casos por 100.000 habitantes respectivamente (Curado, 2007).

1.2. Clasificación

El término condrosarcoma engloba a un grupo heterogéneo de tumores de estirpe cartilaginosa en el que, en más del 90% de los casos son denominados **condrosarcomas convencionales**. El 90% de los

condrosarcomas convencionales, en relación con el grado de malignidad, son de grado bajo o intermedio (grados 1 o 2). En estos casos el comportamiento clínico es de crecimiento muy lento con reducido potencial metastásico. Por el contrario, el 10% de los condrosarcomas convencionales tienen mayor agresividad clínica, se denominan grado 3, y tienden a la metastatización.

Los condrosarcomas pueden ser igualmente clasificados dependiendo de que sean primarios, si se desarrollan *de novo*, o secundarios si se desarrollan a partir de lesiones previas, tales como los encondromas o los osteocondromas. Acorde a su localización, los condrosarcomas se consideran centrales, si se originan dentro de la cavidad medular, y se denominan periféricos si nacen desde la superficie del hueso. En este sentido, los condrosarcomas primarios suelen ser casi siempre centrales y los secundarios pueden ser tanto centrales como periféricos (Dorfman, 1998).

Además de los condrosarcomas convencionales hay otras variantes histológicas mucho menos frecuentes. Así, destacan los **condrosarcomas desdiferenciados**, que son tumores inicialmente de bajo grado, pero con gran capacidad para transformarse en sarcomas de alto grado. Es muy frecuente que puedan tener características histológicas propias de otros tumores como pueden ser del osteosarcoma, del fibrosarcoma o del fibrohistiocitoma maligno. También podemos encontrarnos con el **condrosarcoma mesenquimal**, de alto grado de malignidad, en el que se observan lesiones sólidas con elevada celularidad a base de células mesenquimales primitivas y con características histológicas muy similares al sarcoma de Ewing, de origen neuroectodérmico. En el caso del

condrosarcoma de células claras, las células tumorales contienen abundante glucógeno, que es lo que le da esa apariencia clara al citoplasma, es un tumor de bajo grado de malignidad que suele afectar a las epífisis de los huesos largos. Por último, se distingue el **condrosarcoma mixoide**, el cual es un tumor que, aunque es de crecimiento lento, tiene tendencia a recurrir localmente y a metastatizar. Histológicamente se caracteriza por su degeneración mixoide (Unni, 1998).

1.3. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en los hallazgos radiológicos y en la biopsia, ya que los datos clínicos son inespecíficos. El síntoma más frecuente es el dolor en el 95% de los casos, siendo de carácter insidioso, progresivo y con empeoramiento nocturno. En ocasiones se encuentra una masa palpable y fracturas patológicas en un porcentaje variable de casos (Hudson y col., 1990; Murphey y col., 1998).

1.3.1. Radiología. Desde el punto de vista del diagnóstico por imagen, podemos observar en la imagen radiológica convencional lesiones



con un patrón mixto de carácter lítico y esclerótico (**Figura 1**). Estas imágenes escleróticas, presentes en el 60-78% de las lesiones, se producen por la mineralización de la matriz condral. Estos hallazgos radiológicos suelen reflejar los hallazgos histopatológicos y siguen en ocasiones patrones típicos, como el descrito como lesión en "anillo y arco",

Figura 1. Imagen radio-opaca de aspecto moteado

correspondiente a la mineralización de la matriz condroide (osificación endocondral).

Los hallazgos de la radiología simple deben evaluarse en mayor profundidad durante el estadiaje con la T.A.C. o la R.M.N. Con la **tomografía** podemos detectar áreas de mineralización de la matriz condroide del tumor (Murphey, 2003). La imagen obtenida mediante la **resonancia** es sin duda el mejor método de diagnóstico por imagen, ya que nos va a permitir evaluar la extensión a médula ósea del condrosarcoma intramedular. En este caso, aparecen dichas áreas como zonas con una intensidad de señal baja a intermedia en T1. Por otro lado, los componentes no mineralizados del tumor presentan una señal de alta intensidad en T2, correspondiente al alto contenido acuoso, mientras que las zonas de mineralización de la matriz tienen una señal de intensidad baja en todas las secuencias (Varma y col., 1992).

Por último, la **tomografía de emisión de positrones** (P.E.T.) nos puede ayudar en la evaluación del grado de malignidad *in vivo* usando la F.D.G. (análogo de glucosa). Ello es debido a que a mayor grado de dediferenciación celular (y por tanto de malignidad), el grado de captación de F.D.G. por parte de las células tumorales también es mayor (Brenner y col., 2004).

1.3.2. Histopatología. Desde el punto de vista macroscópico, en la evaluación histopatológica del condrosarcoma podemos encontrar una estructura lobular que focalmente puede penetrar en la cortical ósea y en los tejidos blandos anexos (**Figura 2**).

Respecto a su aspecto, se observan zonas traslúcidas que corresponden con áreas ricas en contenido acuoso, mientras que las de la matriz mineralizada son de apariencia granular. La osificación endocondral alrededor de los lóbulos de cartílago hialino son los que caracterizan el patrón radiológico característico de anillo y arco. Los tumores de alto grado tienen áreas más grandes no calcificadas. El hallazgo más significativo que diferencia el condrosarcoma intramedular del encondroma es la relación del tejido condroide con el hueso que le rodea; donde el atrapamiento y la destrucción del tejido óseo trabecular es la clave para establecer el diagnóstico de condrosarcoma (Dorfman, 1998).



Figura 2. Tumor lobulado de aspecto opalescente y consistencia elástica que puede presentar calcificaciones

A nivel microscópico, determinados hallazgos permiten evaluar el grado de malignidad del tumor. Así, se puede distinguir:

- **Grado 1 (bajo):** Se observan pocas células multinucleadas, habitualmente binucleadas, con núcleos pequeños y densos, y

algunos un poco alargados. El estroma es de predominio condroide.

- **Grado 2 (intermedio)**: La relación entre el número de células y la cantidad de matriz condral es favorable a la primera. Estas células son frecuentemente bi- y multinucleadas, pudiendo existir focos necróticos (**Figura 3**).

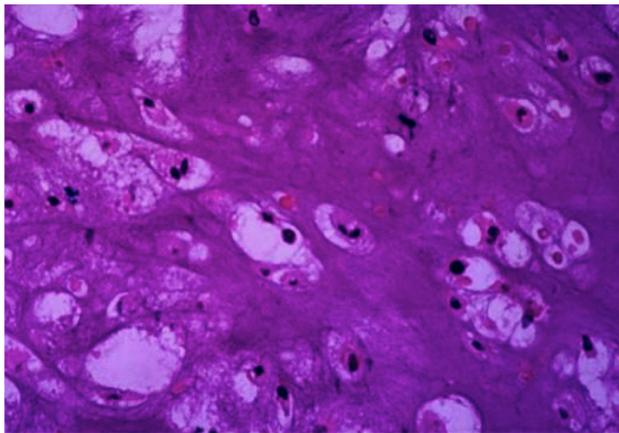


Figura 3. Tejido sarcomatoso constituido por cartílago hialino

- **Grado 3 (alto)**: En este caso hay mayor celularidad que en el grado anterior. Los condrocitos están agregados en grumos, y es frecuente y extenso el grado de necrosis. El polimorfismo nuclear es mayor que en el grado anterior, siendo estos núcleos típicamente vesiculares, y usualmente de 5 a 10 veces más grande de lo normal. La matriz extracelular es escasa o incluso ausente (Murphey, 2003).

1.4. Tratamiento

1.4.1. Cirugía. En la actualidad sólo se acepta el tratamiento quirúrgico como la única posibilidad de cura. Sin embargo, sigue siendo un tema de controversia qué tipo de abordaje quirúrgico es el apropiado. En los condrosarcomas de grado intermedio y alto, el tratamiento de elección

es la resección quirúrgica en bloque con márgenes anchos, aunque, como se puede comprender, conlleva una elevada morbilidad ya que suelen ser tumores de gran tamaño. Por otro lado, desde el punto de vista técnico puede ser muy difícil la reconstrucción atendiendo a la zona donde asiente el tumor primario. Por el contrario, los tumores de bajo grado de malignidad la técnica de curetaje asociado a terapia local adyuvante, bien sea criocirugía o bien fenolización y relleno de la cavidad con injerto óseo ha dado buenos resultados clínicos.

En los pacientes que presentan condrosarcomas de grado intermedio y alto no resecables, pero con consistencia mucosa, existe la opción de eliminarlo mediante succión del tumor como tratamiento paliativo del dolor (Gelderblom y col., 2008).

Respecto a la tasa de recurrencia local, se puede decir que es baja en los tumores de bajo grado de malignidad, aunque, sin embargo, se han dado casos de recurrencia después de 10 años de haber sido resecados. No existe consenso en relación a la frecuencia de las recidivas respecto a su localización topográfica, pero si parece que la recidiva de los tumores de bajo grado que asienta en los huesos largos conduce a una menor tasa que cuando no la hay. De cualquier forma, el tratamiento de la recidiva local es quirúrgico y similar a la cirugía del tumor primario (Chow, 2007).

En el caso de los condrosarcomas que asientan en el cráneo se suscita un grave problema, ya que no se puede realizar la resección quirúrgica con amplios márgenes. La mayoría de ellos asientan en el cartílago de la sincondrosis esfeno-petro-clival, con afectación del seno cavernoso, del hueso petroso, del esfenoideo y del clivus. Estos pacientes suelen padecer diplopía secundaria a la afectación de los pares craneales III

y VI, no hallándose en los estudios retrospectivos mayor eficacia en la combinación de la cirugía seguida de radioterapia adyuvante (Tzortzidis y col., 2006).

1.4.2. Radioterapia. Normalmente, los condrosarcomas son relativamente resistentes a la radioterapia. Sin embargo, puede ser usada como tratamiento paliativo en los condrosarcomas más radiosensibles, especialmente en los tumores mesenquimales (Krochak y col., 1983). Como norma, la radioterapia se usa en las siguientes situaciones: tras una resección incompleta para conseguir un control local de la enfermedad; o como tratamiento paliativo en los casos donde no esté indicada la cirugía.

La radioterapia convencional con fotones de alta energía puede conseguir dosis de 60 Gy, pero está contraindicada en condrosarcomas de la base del cráneo o del esqueleto axial, ya que podría dañar el tejido nervioso en proximidad. En estos casos se usa la radioterapia con protones, ya que esta técnica produce sólo una pequeña deposición de energía en los tejidos vecinos a la lesión. En estos casos, se puede lograr una tasa de control local de la lesión entre el 85 y 100%, con una toxicidad menor al 10%. Recientemente se ha usado también radioterapia con iones de carbón y otras partículas con carga consiguiendo niveles de control local similares a la radioterapia con protones con una toxicidad incluso menor (Gelderblom y col., 2008).

1.4.3. Quimioterapia. Por definición, se considera que el condrosarcoma es resistente a la quimioterapia. En esta pobre respuesta terapéutica puede estar implicada la incrementada expresión por parte de las células tumorales del gen de multi-resistencia 1 glicoproteína-P.

Además, el aumento de la presión intersticial, debido a la gran cantidad de matriz extracelular, unido a la pobre o nula vascularización tumoral también se han nombrado como posibles factores.

Existen pocos datos clínicos disponibles, que además son contradictorios, en cuanto a la eficacia que tiene la quimioterapia convencional como tratamiento adyuvante en los casos. Destacan quizá el uso de nuevos compuestos y regímenes terapéuticos tales como el uso del factor de crecimiento endotelial vascular, de la Apo2L/FNT, de la perifosfina/dasatinib/apomab o bien de la combinación de la gemcitabina con el doxetacel en ensayos clínicos prospectivos (Gelderblom y col., 2008).

1.5. Pronóstico

Se estima una tasa acumulada de supervivencia en aquellos casos de condrosarcoma no metastásico en torno al 70% a los 10 años. Diversos factores de riesgo influyen en esta tasa de supervivencia. Entre ellos destacan la extensión extracompartimental del tumor, así como el desarrollo de recidiva local. En este sentido se considera a la recidiva local como un factor de mal pronóstico en aquellos pacientes que presentan metástasis concomitantes, pero no en aquellos que no las tienen. También influye como factor de riesgo para la recidiva local los márgenes quirúrgicos libres de tumor inadecuados y el tamaño tumoral mayor a los 10 centímetros. Otros factores que también se han relacionado con el pronóstico del condrosarcoma incluyen el alto grado histológico; la edad del paciente; el hecho de ser diagnosticado por biopsia o bien ser diagnosticado de forma no invasiva; y también el elevado índice de proliferación celular (MIB-1) también han mostrado correlación con la recurrencia y la

mortalidad (Bergh y col., 2001; Rizzo y col., 2001). Sin embargo, ni la localización anatómica, ni el tipo de cirugía ni la duración de los síntomas han mostrado ser factores pronósticos (Fiorenza y co., 2002).

1.6. Biología Molecular

Desde el punto de vista de la investigación básica, los datos que nos aporta la biología molecular parecen darnos pistas de cuáles son los procesos que subyacen en esta patología. Así, la detección mediante inmunohistoquímica de los distintos sub-tipos de colágeno se ha implicado tanto en la diferenciación celular como en el pronóstico. Los colágenos tipo II y X y el proteoglicano agregcano representan un fenotipo neoplásico maduro y por tanto conllevan buen pronóstico. Por el contrario, el colágeno tipo I parece indicar una transición a un tipo más proliferativo con menor diferenciación y por tanto con peor pronóstico (Aigner y col., 2002). Otros autores han sugerido la sobre-expresión de la ciclo-oxigenasa 2 como factor pronóstico (Endo y col., 2006).

Recientemente se han encontrado varias vías oncogénicas implicadas en el desarrollo del condrosarcoma:

- Activación de la vía Akt/proteín-kinasa B (una protein kinasa serina/treonina implicada en la inhibición de la apoptosis y mediador crítico de la supervivencia celular), que se une a receptores de las células de condrosarcoma.
- Activación conjunta de las vías AKT y de la ERK 1 (Kinasa regulada por la señal extracelular) en células mesenquimales cóndroprogenitoras.

- Activación de la vía de la Kinasa Jun N-terminal y la ERK en condrosarcomas (Jang y col., 2005; Akiyama y col., 2006; Papachristou y col., 2006).

También se ha hallado correlación entre la amplificación del oncogen c-Myc y la polisomía 8 con la progresión del condrosarcoma desdiferenciado y la disminución de la supervivencia de los pacientes que lo padecen. Se ha hallado igualmente una relación entre la pérdida del cromosoma 6 y la ganancia del segmento 12q12 con un alto grado histológico. Se han encontrado en el 66% de los condrosarcomas alteraciones genéticas frecuentemente implicadas, como son la pérdida de heterocigosis en las posiciones 5q, 9p, 11p, 13q y 19q, lo que demuestra una heterogenicidad en los diferentes tipos de condrosarcoma (Morrison y col., 2005; Rozeman y col., 2006; Papachristou y col., 2006).

Otros factores moleculares están también en estudio con la esperanza de encontrar vías terapéuticas. En la tabla 1 se resumen los factores más importantes.

| Diana | Función | Abordaje terapéutico |
|---------------------------|--|---|
| Tenascina-C Carductina | Proteína de la matriz extracelular. Activa la proteína secretada Akt y le ERK 1/2 | Inhibidores de la Akt y la ERK |
| Hedgehog | Estimula la expresión de los receptores de la PTH y la proliferación de los condrocitos. | Inhibición (ciclopamina, triparanol) |
| PDGFR β | Receptor de la tirosina kinasas | Inhibición (mesilato de imatinib) |
| Receptor estrogénico | El estrógeno estimula la proliferación de los condrocitos de la metáfisis | Inhibición (tamoxifeno e inhibidores de la aromatasas) |
| MMP-1 | Degrada la matriz extracelular, facilita la salida de las células tumorales | MMP-1 siRNA |
| HDAC | Remodelación de la cromatina | Inhibición (depsipéptido) |
| MTAP | Rescate de adenina, síntesis de metionina | Anti-folatos |
| Osteoclastos | Resorción ósea | Bifosfonatos (zolendronato, minodrato) |
| VEGF-A | Angiogénesis | Proteína relacionada con el plasminógeno B, VEGF antisentido. |
| P16 ^{ink4a} | Inhibidor de la kinasa dependiente de la ciclina | Re-expresión de la p16 ^{ink4a} |

Tabla 1. Posibles vías moleculares que representan nuevas opciones terapéuticas en el condrosarcoma convencional.

ERK: Kinasa reguladora de la señal extracelular; **HDAC:** histna deacetilasas; **MMP:** metaloproteinasas de la matriz; **MTAP:** fosforilasa de la metil-thio-adenosina; **PDGFR:** receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas; **PTHrP:** Proteína relacionada con la hormona paratifoidea; **siRNA:** ARN pequeño inhibidor; **VEGF:** Factor de crecimiento vasculo-endotelial.

2. ESTATINAS

2.1 Introducción

El colesterol es un esteroles esencial para la vida, ya que es necesario, entre otras funciones, para crear la membrana plasmática que regula la entrada y salida de sustancias en las células. Es además precursor de moléculas tan importantes como las hormonas esteroideas y los ácidos biliares. Sin embargo, por otro lado, los niveles elevados de colesterol plasmático es un reconocido factor de riesgo de numerosas enfermedades, dentro de las que destacan las enfermedades cardiovasculares. Los niveles plasmáticos de colesterol es el conjunto del colesterol que proviene de la dieta, lo cual supone un tercio del total, y el colesterol que se sintetiza en el hígado, el cual supone más de las dos terceras partes. Esta es la razón por la que es necesario inhibir su biosíntesis hepática mediante diferentes estrategias terapéuticas, entre las que se encuentra el uso de las estatinas. Estas drogas son uno de los fármacos más eficaces conocidos usados clínicamente con el fin de reducir los niveles séricos de colesterol (Liao y Laufs 2005).

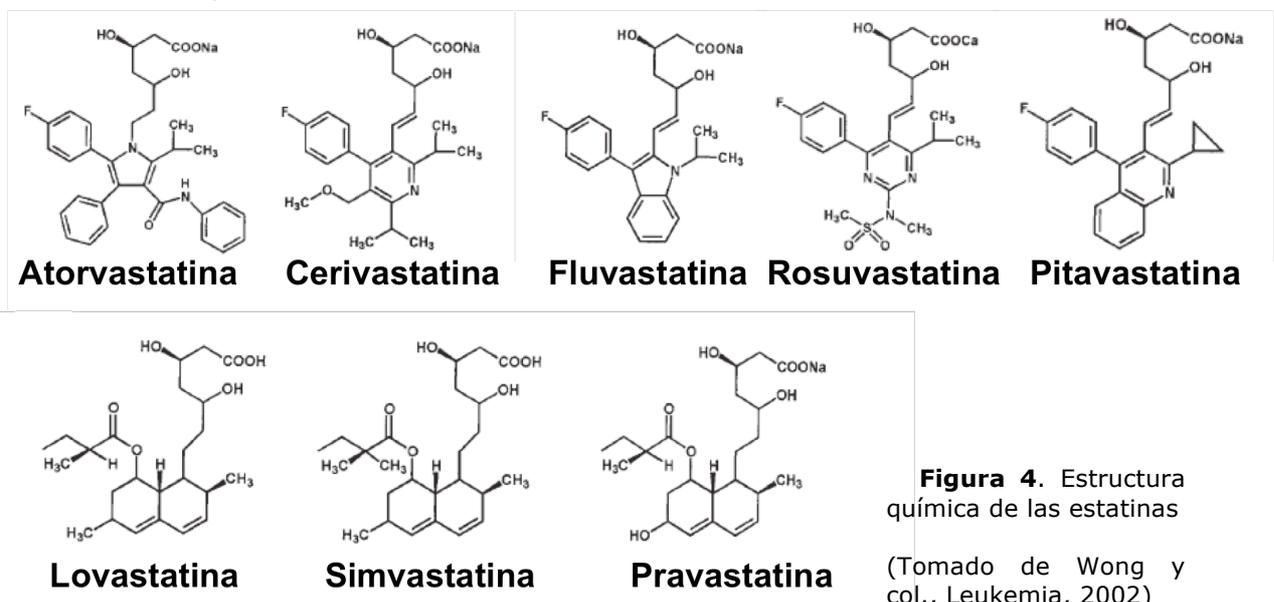


Figura 4. Estructura química de las estatinas

(Tomado de Wong y col., Leukemia, 2002)

2.2 Características principales de las estatinas

2.2.1. Método de obtención.

Desde el inicio de su uso, se pueden distinguir tres generaciones bien diferenciadas de estatinas (**Figura 4**). En la primera generación de estatinas, algunas de ellas se obtuvieron mediante fermentación fúngica. Así, la mevastatina fue la primera estatina aislada a partir del hongo *Penicillium citrinum* (Endo y col., 1976). En el caso de la lovastatina, otra estatina natural, la obtención se realizó a partir del hongo *Aspergillus terreus* (Alberts y col., 1980).

La segunda generación de estatinas se obtuvo a partir de la modificación química de la lovastatina. A este grupo pertenecen las estatinas pravastatina y simvastatina.

Por último, la tercera generación de estatinas se obtiene de forma sintética a partir de la mevastatina. Este es el caso de la fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, pitavastatina y rosuvastatina. Estas estatinas son las de mayor potencia. En la actualidad, son de uso clínico la lovastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, rosuvastatina y pitavastatina.

2.2.2. Solubilidad.

Acorde a su solubilidad en agua, las estatinas se pueden diferenciar en estatinas hidrofílicas: la pravastatina y la rosuvastatina; y las estatinas lipofílicas, como la lovastatina, la simvastatina, la atorvastatina y la cerivastatina. En el caso de la fluvastatina la solubilidad posee características intermedias.

2.2.3. Metabolismo de las estatinas.

a) **Metabolismo hepático.** Las diferentes estatinas son metabolizadas por diversos miembros de la familia de citocromos P450 (CYP 450). Así, la lovastatina, simvastatina y atorvastatina son metabolizadas por la isoenzima CYP3A4. Para la metabolización de la fluvastatina es necesaria la colaboración de diferentes sistemas enzimáticos, comenzando por la enzima CYP2C9, ayudada por las enzimas CYP3A4 y CYP2C8. En el caso de la rosuvastatina no podemos decir que sea metabolizada en sentido estricto por este sistema enzimático, pero, sin embargo, sí que interacciona con la enzima CYP2C9. Por último, decir que la pravastatina, no sigue este patrón de metabolización, sino que se transforma enzimáticamente en el citosol hepático.

Es importante el conocimiento de estas vías de metabolización ya que son la base para conocer la interacción con otros fármacos que inhiben la enzima CYP3A4, como por ejemplo los antibióticos macrólidos, los azoles, los inhibidores de las proteasas, el verapamilo o la warfarina.

b) **Excreción:** En lo que concierne a las vías de excreción, existen dos rutas de excreción de las estatinas: la urinaria y la fecal, siendo esta última la predominante (***Tabla 2***).

2.2.4. Mecanismo de acción.

Las estatinas pueden ser administrados como compuestos activos o como formas pro-fármacos. Dentro del primer grupo (compuestos activos) tenemos la atorvastatina, la cerivastatina (ya retirada del mercado), la fluvastatina y la pravastatina. Estas estatinas se administran como compuestos en forma ácida. Sin embargo, dentro de las formas

profármacos están la lovastatina y la simvastatina, que se suministran como lactonas, y han de ser hidrolizadas enzimáticamente para producir las formas activas.

En relación a las células diana sobre las que operan la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima a (HMG-CoA) reductasa, decir que como norma general son los hepatocitos. En estas células las estatinas inhiben a la reductasa de forma competitiva, mediante una unión reversible en el lugar activo de la enzima. Gracias a esta unión se produce un cambio en la estructura de la enzima conduciendo a una disminución intracelular del producto inmediato de la reacción (mevalonato) y de los productos que se sintetizan a continuación, incluidos los lípidos isoprenoides, moléculas responsables de múltiples funciones celulares esenciales gracias a los procesos de isoprenilación proteica (Alegret y Silvestre, 2006).

El valor de la constante de Michaelis-Menten (K_m) para la estatinas, o lo que es lo mismo, la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima, se encuentra en el rango nanomolar. Es por ello, por lo que estas drogas reemplazan eficientemente al sustrato natural (la HMG-CoA), el cual se une en condiciones fisiológicas con la reductasa en el rango de concentraciones micromolares (Moghadasian, 1999). Desde el punto de vista clínico, el rango terapéutico de estas drogas varía entre 10-80 mg/día, según el tipo de estatina que se use.

| Características farmacológicas de las estatinas | | | | | | | | | |
|---|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|--|--|
| Sustancia | Simvastatina | Pravastatina | Lovastatina | Fluvastatina | Atorvastatina | Rosuvastatina | Pitavastatina | | |
| Porfármacos | SI | NO | SI | NO | NO | NO | NO | | |
| Alimentos y absorción | No influyen | Disminuyen | Aumentan | Disminuyen | Disminuyen | No influyen | - | | |
| Biodisponibilidad | ≤ 5% | 18% | ≤ 5% | 24% | 14% | 20% | > 30% | | |
| Unión a proteínas plasmáticas | 94% | 50% | >95% | 98% | 98% | 88% | - | | |
| Atraviesa barrera hematoencefálica | SI | NO | SI | NO | NO | NO | SI | | |
| Metabolismo | CYP3A4 | Sulfatación | CYP3A4 | CYP2C9 | CYP3A4 | CYP2C9 | CYP2C9/ CYP2C8 | | |
| Excreción biliar | 60% | 70% | 83% | 95% | - | 90% | - | | |
| Excreción urinaria | 13% | 20% | 10% | 5% | <2% | 30% | 3% | | |
| Semivida (horas) | 2-3 | 0,8 | 1-4 | 2,5 | 20 | 20 | - | | |

Tabla 2. Propiedades farmacocinéticas clínicas de los inhibidores de la HMG- CoA reductasa.

2.2.5. Permeabilidad de las estatinas.

Todas las estatinas tienen su diana tisular en el hígado. Sin embargo, el grado de inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa en otros tejidos no hepáticos varía en función de su permeabilidad tisular y metabolismo.

Las estatinas lipofílicas, como son la lovastatina, la simvastatina y la atorvastatina, atraviesan con facilidad las membranas celulares por difusión pasiva, por lo que son potentes inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa en gran cantidad de tejidos. Sin embargo, las estatinas hidrofílicas, como es el caso de la pravastatina y de la rosuvastatina, son relativamente impermeables a estas membranas, razón por lo que son más selectivas desde el punto de vista tisular que las anteriores. En general sus acciones están limitadas al hígado.

2.3 Biosíntesis del colesterol

El colesterol desempeña funciones muy importantes en el ser vivo ya que forma parte de las membranas celulares y es el precursor de los ácidos biliares y de las hormonas esteroideas. Las células de los mamíferos, utilizan el colesterol que se genera a través de las vías endógenas y exógenas. A través de la ruta exógena, el colesterol se incorpora a las células gracias a las lipoproteínas, especialmente la LDL (lipoproteína de baja densidad). Esta molécula es introducida en la célula mediante un mecanismo de endocitosis (Brown y Goldstein, 1986), siendo a continuación degradadas las lipoproteínas en el interior de los lisosomas y el colesterol reciclado.

Cuando no hay LDL plasmática, se pone en marcha un proceso de síntesis celular a través de las propias rutas endógenas que posee la célula

(Goldstein y Brown, 1984; Goldstein y Brown, 1990). Existe una conexión entre ambas vías, de tal forma que esta vía mantiene altos los niveles de HMG-CoA reductasa mientras que el exceso de LDL plasmática y de colesterol reducen la actividad de la HMG-CoA reductasa.

En las células eucariotas el proceso de biosíntesis del colesterol se lleva a cabo en diferentes compartimentos celulares. Así, formación del HMG-CoA a partir del acetil-CoA se produce en el citosol y en los peroxisomas gracias a la acción de la HMG-CoA sintasa. La reducción del HMG-CoA hacia mevalonato tiene lugar en el retículo endoplásmico y en los peroxisomas, catalizado por la acción de la enzima HMG-CoA reductasa. Y es éste el paso limitante en la síntesis del colesterol. En la **figura 5** se resume la vía de síntesis del colesterol, denominada vía del mevalonato. Se inicia con el acetil-CoA y durante todo el proceso se genera, además del colesterol, varios subproductos de gran importancia. Entre ellos destacan el dolicol, involucrado en los procesos de glicosilación proteica; la ubiquinona, esencial durante la respiración mitocondrial y la peroxidación lipídica; la isopentenil adenina, la cual es esencial durante la modificación de ciertos RNAt; y por último, pero no por ello menos importante, los lípidos isoprenoides farnesil pirofosfato (FPP) y geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Estos dos últimos lípidos son claves para que se pueda producir la isoprenilación de las proteínas (Goldstein y Brown, 1990).

2.4 Isoprenilación proteica

En la vía del mevalonato se forman dos intermediarios de gran valor biológico. Uno de ellos tiene 15 carbonos, el farnesil pirofosfato (FPP), y el

otro, denominado geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), tiene 20 carbonos. Se entiende por isoprenilación proteica a aquel proceso mediante el cual se modifican diversas proteínas tras la adición de los lípidos isoprenoides, como es el caso del FFPP o del GGPP. En este proceso se produce una modificación post-traslacional de estas proteínas tras la formación de enlaces tio-éter entre la cisteína de las proteínas y los grupos isoprenilos. Para ello, las enzimas prenil transferasas se unen a cisteínas en la posición carboxi-terminal y catalizan la unión covalente de FPP, es el caso de la farnesiltransferasa (FTasa) en un proceso denominado farnesilación; y de GGPP, en el caso de la geranylgeranyltransferasa I (GGTasa I) en el proceso denominado geranylgeranilación.

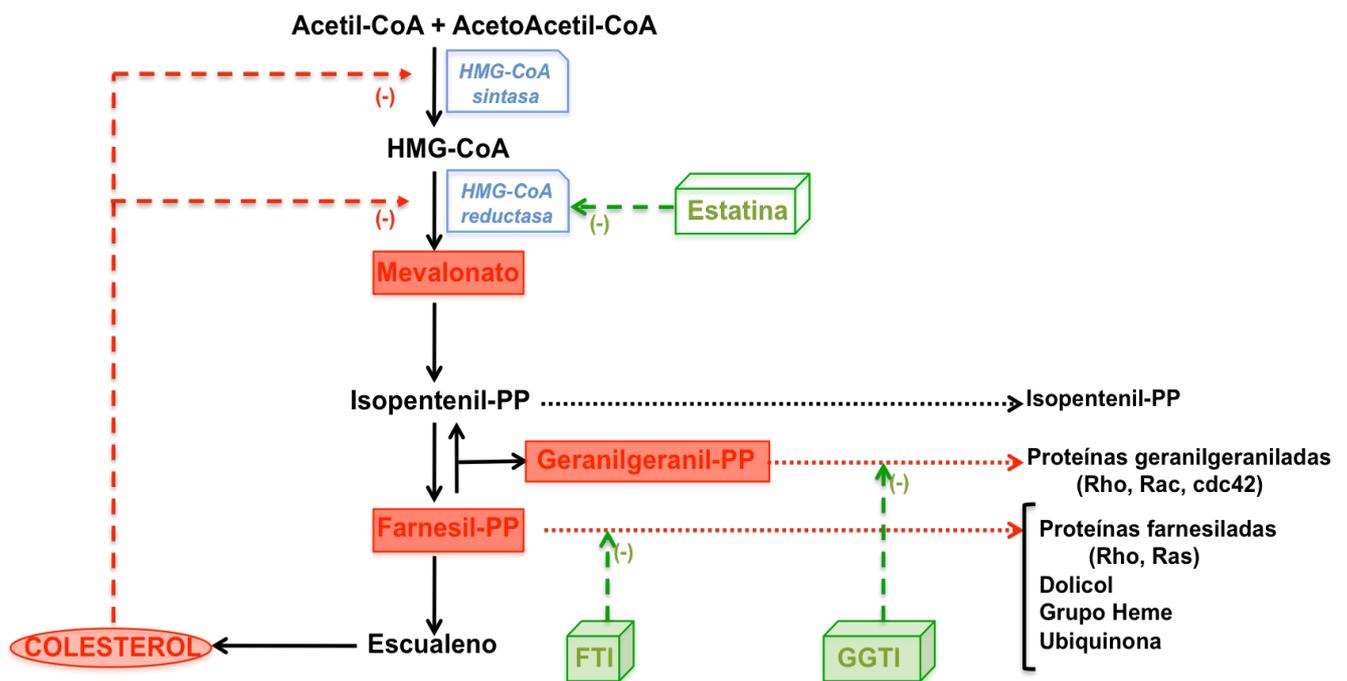


Figura 5. Biosíntesis del colesterol.

Numerosas son las proteínas que son modificadas mediante este proceso de isoprenilación y se sabe que éstas juegan un papel crítico en procesos íntimamente relacionados con la actividad celular. Así, las proteínas Ras y Rho

son, entre otras, los mayores sustratos para la isoprenilación con FPP y GGPP para poder unirse a la membrana y con ello completar su actividad biológica (Maltese, 1990; Seabra, 1998; Morgan y col., 2003).

2.5 Proteínas RhoGTPasas

Las RhoGTPasas son un conjunto de proteínas englobadas dentro de la superfamilia de proteínas Ras de 20-30 kDa que ejercen un elevado número de funciones celulares de gran importancia. Entre ellas, se ha demostrado el papel de Rho en la remodelación del citoesqueleto celular. También se ha descrito su actividad en el transporte de membrana, en la activación transcripcional y en el control del crecimiento celular (Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997). Se ha relacionado su actividad con el tamaño celular; con la proliferación y con la tasa apoptosis/supervivencia; con la citoarquitectura, la polaridad celular o la adhesión celular (Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997; Schmitz y col., 2000; Aznar y Lacal, 2001a; Aznar y Lacal, 2001b). Son de destacar igualmente sus acciones sobre la progresión del ciclo celular; sobre la capacidad para evitar la inducción de muerte celular por apoptosis; sobre el papel que juega en la formación de nuevos vasos sanguíneos; y, finalmente, sobre la capacidad de las células para desplazarse, invadir y generar fenómenos metastásicos, pilares esenciales en el fenotipo agresivo tumoral.

Las RhoGTPasas se expresan en todas las especies, y está formada por 22 miembros integrantes de la familia de proteínas Rho, subdivididos a su vez en seis grupos (Wennerberg y Der, 2004): a) Rho (RhoA, RhoB, RhoC); b) Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG); c) Cdc42 (Cdc42, TC10, TCL,

Chp, Wrch-1); d) Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE); e) RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2); f) Miro (Miro-1y Miro-2).

Destacan por sus peculiaridades las subfamilias RhoBTB y Miro ya que las proteínas son más grandes que las habituales pequeñas GTPasas. Además, se piensa que la subfamilia Miro podría estar relacionada con la regulación transcripcional y durante la endocitosis (Aspenström y col., 2004). También se sabe que los miembros de esta subfamilia pueden participar en los fenómenos de apoptosis (Fransson y col., 2003).

Desde el punto de vista estructural y funcional, las proteínas Rho están presentes en dos estados: un estado activo, unidas a GTP, y uno inactivo, unidas a GDP. Cuando el GTP se une a las proteínas Rho se produce un cambio en la estructura proteica que permite procesar la información y propagar la señal al interior de la célula. Entre los efectores *downstream* a Rho (**Figura 6**), destaca la familia de proteínas MAP quinasa, la quinasa dependiente de Rho (ROCK), la fosfatidilinositol 5-quinasa (PIP 5-K) y Dia y la proteína quinasa N (PKN) (Bishop y Hall, 2000).

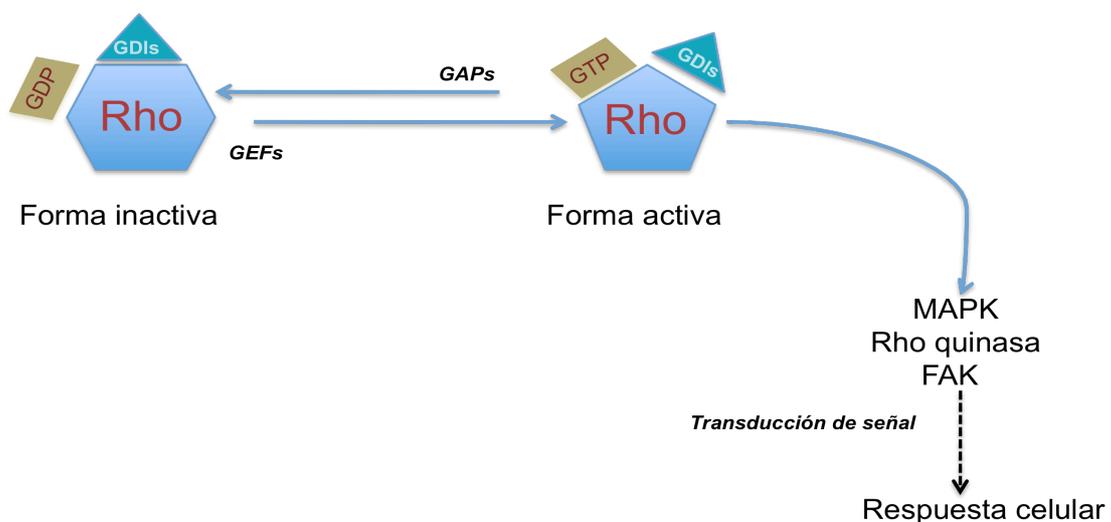


Figura 6. Transducción de la señal a través de las proteínas Rho-GTP.

Las proteínas Rho cambian cíclicamente entre sus formas activas e inactivas (Schmitz y col., 2000), siendo catalizadas estas reacciones por las proteínas "*guanine-nucleotide-exchange factors*" (GEFs); por las "*GTPase-activating proteins*" (GAPs) y por las proteínas "*guanine-nucleotide-dissociation inhibitors*" (GDIs).

3. APOPTOSIS

3.1. Introducción. El equilibrio poblacional entre las células que se forman y las que mueren es esencial para mantener el estado de salud de un organismo vivo en su totalidad. La supervivencia celular viene, por tanto, determinada por aquellos factores promotores de la formación de nuevas células y por el freno controlado de la muerte celular. Diversas razones hacen que este equilibrio se pueda romper y con ello condicionar diferentes estados patológicos. Así, en muchas enfermedades humanas se describen alteraciones en la supervivencia celular que favorecen la génesis de diversas enfermedades, entre las que destacan el cáncer, las infecciones virales, las enfermedades autoinmunes, o los desórdenes neurodegenerativos (Thompson, 1995).

En el caso concreto que nos ocupa, es decir, en los procesos tumorales malignos, estas células pierden el control fisiológico y se vuelven resistentes a las indicaciones que les conducen a la muerte de forma natural; estimulan la formación ilimitada de nuevas células; promueven un crecimiento desmesurado del tejido tumoral, en el que, además, se impulsa en exceso la formación de nuevos vasos sanguíneos y todo ello, en conjunto, desencadena un proceso denominado enfermedad metastásica, en la que el

tumor original invade y coloniza otros tejidos a distancia, siendo esta habitualmente la causa de muerte del paciente que porta este tumor (Tarnok y cols., 2006).

Es por ello fácil de entender que tratar al tumor implica ocuparse de todos y cada uno de estos eventos. Sin embargo, si fuésemos capaces de diseñar un tratamiento encaminado concretamente a promover la muerte de las células tumorales estaríamos dando un paso muy importante para corregir el proceso natural de la biología tumoral.

Se reconocen desde hace mucho tiempo dos mecanismos básicos bien diferenciados capaces de inducir la muerte celular, que se denominan muerte por necrosis y muerte por apoptosis. Ambos tipos tienen unas diferencias bien definidas. En el caso de la muerte inducida por necrosis la célula sufre una serie de daños a través de un proceso no ordenado en el que se produce un descenso en los niveles energéticos, expresados por los valores de la concentración de ATP; a continuación la célula se vuelve tumefacta; sufre un proceso de lisis acompañado de un incremento del contenido intracelular y de una respuesta pro-inflamatoria del tejido afecto (Eguchi y cols., 1997; Wyllie, 1980). Por el contrario, en la apoptosis la muerte celular se lleva a cabo a través de una serie de acontecimientos programados y perfectamente regulados, dependientes de la energía y encaminados a evitar la superpoblación celular y a que las células dañadas puedan pasar a las siguientes generaciones con el material celular dañado (Gerschenson y Rotello, 1992). Diversas situaciones, tanto fisiológicas como patológicas, inducen apoptosis, destacando las especies reactivas del oxígeno y los agentes genotóxicos (Radford, 1986; Wood y Youle, 1994; Nagata, 1997).

3.2. Cambios Morfológicos. En la apoptosis no existe un cuadro inflamatorio asociado. Los datos más significativos son la compactación nuclear precoz y la condensación citoplasmática. Posteriormente, el núcleo se rompe en varios pedazos. Las células se rompen en cuerpos apoptóticos, que poseen un componente nuclear en su interior, mientras que los orgánulos citoplasmáticos aparecen indemnes. Estos cuerpos suelen ser fagocitados por los macrófagos con intención de eliminarlos. Este tipo de muerte celular ocurre en células individuales de una manera asincrónica, lo cual lo diferencia de la necrosis. En la **Tabla 3** se resumen las diferencias morfológicas básicas entre la necrosis y la apoptosis. Sin embargo, a pesar de lo dicho, normalmente la necrosis y la apoptosis coexisten muchas veces tras el daño celular (O'Brien y cols, 2000).

| Características | Necrosis | Apoptosis |
|----------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Tipo de muerte | Catastrófica | Programada |
| Modo | Pasivo | Activo (ATP dependiente) |
| Volumen celular | Aumenta | Disminuye |
| Densidad celular | Disminuye | Aumenta |
| Lisis de la m. plasmática | Al principio | Al final |
| Hidrólisis del ADN | Al final | Temprana |
| Orgánulos | Lisados | Compactos |
| Respuesta inflamatoria | Si | No |

Tabla 3. Diferencias generales entre apoptosis y necrosis.

3.3. Vías de señalización de la apoptosis.

El proceso de apoptosis se puede desencadenar a través de múltiples vías de señalización. La apoptosis está controlada por diversas señales celulares implicadas en la regulación del destino celular, bien sea hacia la muerte o hacia la supervivencia celular.

3.3.1. Vías implicadas en la transducción de señal.

En esta vía están implicados receptores que al activarse conducen a la muerte celular y es por lo que se les denominan receptores de muerte celular. Están encargados de detectar señales que provienen del entorno extracelular y transmitirlos al interior celular a través de una señal pro-apoptótica. En general este tipo de receptores pertenecen a la superfamilia de receptores TNF (*Tumor Necrosis Factor*). Otros receptores involucrados en la apoptosis son los relacionados con Fas/Apo1, cuya activación, cuando se le une en su dominio extracelular su correspondiente ligando, conduce a la activación de su dominio intracelular (denominado dominio de muerte) y este dominio interacciona con determinadas proteínas citoplasmáticas necesarias para la transducción de la señal a través de las caspasas.

Otra vía de transducción de señal es a través de los cambios en la concentración del calcio iónico. En los casos dependientes del Ca^{2+} se produciría una activación de las endonucleasa Ca^{2+} -dependientes implicadas en la degradación de la histona H1.

En otros casos, la PKC (Protein Kinasa C) puede activar o prevenir la apoptosis, al igual que le ocurre al AMPc, dependiendo del modelo apoptótico que se estudie.

La ceramida, molécula resultante de la hidrólisis de la esfingomielina, es un iniciador de la apoptosis cuando interviene TNF, a través de la

inducción del factor de transcripción c-Jun, vía Ras.

Determinadas CDKs (*Cyclin Dependent Kinases*) pueden promover la apoptosis, como es el caso de la ciclina B y E en la apoptosis inducida por daño del ADN, y de la ciclina A, inducida por el factor de transcripción Myc.

Las proteínas Ras, miembros de la superfamilia de GTPasas promotoras de muerte celular o supervivencia dependiendo de las moléculas que participen en cada caso. Puede inducir muerte celular si se activa la proteína Raf a través de la vía ERK; o puede promover la supervivencia celular si se activa PI3K.

3.3. 2. Factores de transcripción implicados.

El factor de transcripción AP-1 (*Activating Protein-1*) está formado por homo- o heterodímeros de las proteínas nucleares Fos (c-Fos, Fos B, Fra1 y Fra2), Jun (c-Jun, JunB y JunD) y proteínas con cremallera de leucina bZIP (ATF-2, ATF3/LRF1, B-ATF). En algunos casos se necesita AP-1 para provocar apoptosis; sin embargo, en otros casos no es necesario.

El factor de transcripción NFκB (*Nuclear Factor kappaB*) pasa del citoplasma al núcleo uniéndose al ADN a través de las secuencias κB y, dependiendo del estímulo y de la línea celular que se considere, generará una respuesta protectora o promotora de la apoptosis.

Las proteínas Myc son una familia de proteínas nucleares que controlan diversas funciones celulares. Se han descrito tres miembros: c-myc, N-myc y L-myc. La sobreexpresión de c-myc confiere susceptibilidad a las células tumorales para entrar en apoptosis. Por otro lado, su anulación las hace más resistentes a morir por apoptosis. La entrada en apoptosis mediada por c-myc está mediada por las proteínas bcl-2 y p53.

La proteína p53 es una proteína fosforilada involucrada en dos funciones celulares importantes: la decisión de que la célula entre en apoptosis o progrese a través del ciclo celular; y tomar parte en la reparación del ADN. De forma genérica, p53 evalúa los daños en el ADN y decide si se debe parar el ciclo celular para reparar los daños, en caso de que sean leves. En caso de que este daño sea más grave, p53 actúa como un factor protector induciendo a la célula a que entre en apoptosis.

***PLANTEAMIENTO Y
OBJETIVOS***

1.- PLANTEAMIENTO

El uso de las estatinas como fármacos reductores de los niveles de colesterol plasmático ha supuesto una importante disminución en la tasa de mortalidad secundaria a las alteraciones cardiovasculares que produce este desarreglo metabólico. Sin embargo, en los estudios epidemiológicos encaminados para evaluar la disminución de la tasa de mortalidad secundaria a enfermedades cardiovasculares debido al subsecuente descenso de los niveles de colesterol provocado por las estatinas se pudo comprobar que el descenso en la mortalidad fue superior al esperable por el simple hecho de disminuir la concentración de colesterol plasmático. Se observó, que además de la reducción de este lípido, los pacientes sujeto de evaluación en estos estudios morían menos por cáncer.

Por otro lado, sabemos que los condrosarcomas son tumores sólidos extremadamente agresivos y con escasas o nulas opciones terapéuticas, quedando circunscritas prácticamente a la cirugía, ya que son normalmente radio- y quimio-resistentes.

Por ello, nos preguntamos que si las estatinas, poseedores de esta capacidad antitumoral ya probada en otras estirpes tumorales, podría ser de utilidad en el tratamiento de los condrosarcomas, ya que estos tumores son tan resistentes a la quimioterapia. En base a este planteamiento, nos hemos propuesto los siguientes objetivos.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo general:

Evaluar la posible acción antitumoral de las estatinas *in vitro* en los condrosarcomas de rata y humano

2.2.- Objetivos específicos:

1. Determinar el efecto de las estatinas sobre la viabilidad celular de las líneas de condrosarcoma humano y de rata al ser comparada con células control fibroblástico y condroblástico no tumoral.
2. Demostrar que las estatinas ejercen su efecto deletéreo sobre los condrosarcomas a través de la muerte celular programada (apoptosis).
3. Comprobar que la alteración en la isoprenilación de la proteína RhoA está presente en la acción de las estatinas sobre las células de condrosarcoma.
4. Comprobar que el efecto sobre la viabilidad celular, la apoptosis y la implicación de RhoA sobre estas líneas celulares está vehiculizado por la vía del mevalonato.
5. Diseñar la vía del mevalonato para determinar qué intermediarios de esta vía están involucrados en los efectos observados.
6. Definir si las acciones de las estatinas sobre estas células es por igual en las dos subfamilias de estos fármacos o, por el contrario, el grado de lipo o hidrofiliidad juega algún papel diferencial.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIALES

Los anticuerpos anti-RhoA , IgG anti-conejo ligado a peroxidasa de rábano y el IgG de cabra anti-ratón se obtuvieron de la empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); la inmunoglobulina anti-ratón conjugada con peroxidasa se obtuvo de Dako (Glostrup, Dinamarca). El anticuerpo anti-tubulina (T3526) se obtuvo de Sigma-Aldrich. Los fármacos simvastatina, fluvastatina, lovastatina, atorvastatina y pravastatina fueron obtenidos de diversas casas comerciales (**Tabla 4**). Los lípidos isoprenoides FPP (F6892), GGPP (G6025) y los demás reactivos fueron obtenidos de Sigma.

2. CELULAS Y CULTIVOS CELULARES

Las líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422 fueron generosamente cedidas por el Dr. Jeff Stevens, del Iowa Hospitals & Clinics (Universidad de Iowa City, IA, E.E.U.U.). La línea celular de condrosarcoma humano SW1353 y la línea de fibroblastos inmortalizados NIH3T3 (controles) fueron compradas a la ATCC (*American Type Culture Collection*). Estas líneas celulares se cultivaron en RPMI 1640, suplementado con FBS al 10%, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las líneas celulares fueron cultivadas a 37° C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Utilizamos también como células control, junto a las NIH3T3, a condroblastos primarios obtenidos en nuestro laboratorio, siguiendo el siguiente procedimiento:

2.1. Cultivo primario de condroblastos.

Los condroblastos primarios se obtuvieron de ratas de la cepa Sprague-Dawley recién nacidas (entre 3 y 4 días de edad). En primer lugar, tras anestesiar a los animales, se aisló la región costal, obteniéndose varios fragmentos de cartílago costal. Dichos fragmentos fueron primero troceados con el bisturí en fragmentos de aproximadamente 4 mm² y luego digeridos secuencialmente con colagenasa tipo IA al 0,2% (Sigma) y con tripsina al 0,2% en el incubador a 37° C y CO₂ al 5% durante 20, 40 y 90 minutos. De la tercera digestión, las células obtenidas se cultivaron en placas de cultivo de 60 mm con medio de cultivo α -MEM (Cambrex BioScience), suplementado con desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, ultra-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina, 250 μ g/ml de fungizona y FBS al 10%. El medio de cultivo se cambió inicialmente a las 72 horas y luego cada 48 horas hasta que el cultivo alcanzó la confluencia de la placa. A continuación, estas células, consideradas como el primer pase celular, fueron subcultivadas usando tripsina al 0,05% y EDTA al 0,01% (Cambrex) en placas de 60 mm. Los experimentos que más tarde se detallarán se realizaron con células en el segundo pase celular.

2.2 Tratamientos.

Las concentraciones de las estatinas usadas en este estudio vienen reflejadas en la **Tabla 4**). Las concentraciones de los lípidos isoprenoides FPP y GGPP fueron de 5 μ M, mientras que la del mevalonato fue de 200 μ M. Los inhibidores de la farnesil transferasa (FTI 277) y de la geranilgeraniltransferasa (GGTI 298) se usaron a concentraciones de 20

μM y 50 μM, respectivamente. El resto de los tratamientos serán detallados a lo largo de la tesis.

| FÁRMACO | CASA COMERCIAL | DOSIS |
|----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| Atorvastatina | Sigma-Aldrich | 0,06/0,6/1/2/6/10/20/100 μM |
| Fluvastatina | Alexis-Biochemicals | 0,06/0,6/1/2/6/10/20/100 μM |
| Lovastatina | Enzo Life Sciences | 0,06/0,6/1/2/6/10/20/100 μM |
| Pravastatina | Sigma-Aldrich | 0,06/0,6/1/2/6/10/20/100 μM |
| Simvastatina | Merck-Millipore | 0,06/0,6/1/2/6/10/20/100 μM |

Tabla 4. Relación de estatinas usadas, casas comerciales y dosis usadas en estos experimentos.

3. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

El estudio de la viabilidad celular se realizó cuantificando el proceso de reducción de la sal de tetrazolio de MTT [3-(4,5-metiltiazol-2il-)-2,5 difeniltetrazolium bromuro] a nivel mitocondrial, según el método clásico descrito por Mosmann (Mosmann, 1983). En primer lugar se cultivaron las líneas celulares LTC, C422, SW1353, NIH3T3 y los condroblastos primarios a una concentración de 5×10^3 células en cada pocillo para las células de condrosarcoma; 35×10^2 células en cada pocillo para las células NIH3T3; y 75×10^3 células en cada pocillo para condroblastos primarios. Estas células fueron resuspendidas en 200 μl de medio de cultivo suplementado con FBS al 10% y fueron incubadas durante 24 horas en placas de 96 pocillos. Pasado este tiempo, se añadió medio de cultivo fresco y el fármaco correspondiente. Tras acabar el tiempo de tratamiento, se retiró el medio, se añadió 200 μl de medio de

MTT a una concentración de 0,5 mg/ml disuelto en el medio de cultivo con FBS y se incubó durante 4 horas a 37° C en oscuridad para permitir su reducción por las células metabólicamente activas. A continuación, se aspiró el medio y se solubilizó el precipitado de formazán tras añadir SDS al 20% en HCL 0,02N durante un tiempo comprendido entre 12 y 16 horas. La medición se realizó mediante la cuantificación de la absorbancia a una densidad óptica de 562nm con un lector de microplacas ELX800 (Bio-TEK Instruments, Inc). Los datos obtenidos se presentaron las medias \pm SEM de los porcentajes sobre el control no tratado (sólo vehículo) de cada concentración empleada en 3 experimentos independientes.

4. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS

Se estudiaron los cambios relacionado con la muerte celular por apoptosis en las líneas celulares LTC y SW1353 mediante tres enfoques técnicos:

1.- Mediante el marcaje de los núcleos apoptóticos usando la técnica de **DAPI**.

2.- Estudiando la fragmentación internucleosomal del ADN mediante la técnica de **DNA laddering** (escalera de ADN).

3.- Mediante la **citometría de flujo** con el doble marcaje de anexina V y yoduro de propidio.

4.1. Técnica de DAPI.

Se estudió la muerte celular inducida por mecanismos apoptóticos evaluando las modificaciones en la forma celular, especialmente en sus estructuras nucleares, en las líneas celulares tras teñirlas con DAPI. En

primer lugar, las células fueron sembradas durante un día antes del inicio del tratamiento en placas de 6 pocillos. Tras ser tratadas durante 24 horas, se lavaron las células con PBS y se fijaron durante treinta minutos con paraformaldehído al 4% disuelto en PBS. A continuación, y tras un segundo lavado con PBS, se tiñeron los núcleos con el reactivo DAPI (4',6-diaminodiino-2-fenilindol, Sigma) a una concentración de 1 µg/ml en condiciones de oscuridad, durante un tiempo de 30 minutos. Seguidamente, de cada experimento se tomaron 10 µl, se colocaron en un porta, se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia de UV de banda estrecha (Olympus BX50F4) y a continuación se cuantificaron las células apoptóticas. Éstas se reconocían por sus núcleos fragmentados, evaluándose de 30 a 35 células por campo en 10 a 14 campos elegidos aleatoriamente. De esta forma se cuantificaban qué porcentaje de células apoptóticas se observaban en cada experimento sobre un total de 500 células evaluadas en cada situación experimental. Tras realizar el contaje en todas las situaciones, se obtenía la media \pm SEM de los datos obtenidos en 2 o 3 experimentos independientes.

4.2. Estudio de la fragmentación del ADN.

Se estudiaron los cambios en la respuesta apoptótica en las líneas LTC y SW1353 mediante la fragmentación del ADN tras cultivar las células a una densidad 2×10^5 células por pocillo durante 72 horas en platos de 6 pocillos. A continuación las células fueron tratadas con las estatinas asociadas o no con mevalonato (200 µM), FPP (5 µM), GGPP (5 µM) o ambos lípidos isoprenoides durante 24 y 48 horas. Los inhibidores de las prenil transferasas se administraron durante 1 día a las siguientes dosis: FTI-277 (20 µM), GGTI-298 (50 µM), o la combinación de ambos.

Material y Métodos

Luego, se peletearon las células, se lisaron en 200 μ l de tampón (10 mM de Tris/HCl pH 8.0, 1mM de EDTA y 0.2% de Tritón X-100); centrifugándose por último a 12.000 x g durante 20 minutos. Las muestras obtenidas se incubaron con 5 mg/ml de RNasa (Sigma), durante 1 hora a 37° C y durante otra hora también a 37° C con 20 mg/ml de Proteinasa K (Sigma). Los pasos siguientes fueron extracciones repetidas con fenol y precipitación de las muestras con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20° C durante al menos 12 horas. El ADN obtenido tras centrifugación a 12.000 x g , se lavó con 70% etanol y se volvió a sedimentar y resuspender con 50 μ l del tampón TE (10 mM Tris-HCl a pH 8.0 y 1mM EDTA). Este ADN se analizó en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV (Bio Imaging System-Syngene). Las bandas de la escalera de ADN se analizaron densitométricamente mediante el software de dominio público Scion Image Beta 4.02 para Windows.

4.3. Citometría de flujo con el doble marcaje de anexina V y yoduro de propidio.

En esta técnica, se detecta en primer lugar la anexina V, que es una proteína-dependiente del calcio, de 35-36 kDa, unida a fosfoproteínas y con alta afinidad por la fosfatidilserina fosfolipídica, acoplándose a esta última en aquellas que expongan esta proteína en el mecanismo membranal de *flip-flop*. La anexina V-FITC se emplea para detectar apoptosis temprana conjuntamente con el yoduro de propidio (IP, Anexina V-FITC+/IP-). Cuando las células son Anexina V-FITC⁺/IP⁺, estamos ante un proceso de apoptosis tardío/proceso necrótico. Sin

embargo, cuando las células son Anexina V-FITC⁻/IP⁻, las células son viables.

Para este experimento, se estudiaron los cambios en la distribución del perfil del ciclo celular en las líneas LTC y SW1353 usando el kit AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit (Ref.: 556547, Becton Dickinson Pharmigen). Estas células fueron sembradas durante 72 horas en placas de 6 pocillos. Luego, se trataron con las estatinas, a las dosis establecidas, solas o combinadas con mevalonato (200 μ M), FPP (5 μ M), GGPP (5 μ M), ambos lípidos isoprenoides, FTI-277 (20 μ M), GGTI-298 (50 μ M) o ambos inhibidores de las prenil-transferasas durante 24 y 48 horas.

Luego, tras aspirar el medio se añadió 100 μ l del tampón con 4 μ l de Anexina V-FITC y 10 μ l de IP a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 15 minutos.

Seguidamente, las células fueron resuspendidas con 400 μ l del mismo tampón, en oscuridad; y, por último, se realizó el análisis con el citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson, San José, CA) y los datos de los histogramas generados se cuantificaron con el software Cell Quest (Beckton Dickinson, San José, CA).

Para poder diferenciar la apoptosis de la necrosis y evaluar la cantidad de células viables durante los experimentos, se cuantificaron los resultados mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{ células Anexina V-FITC}^+ \text{ IP}^-}{\text{IP}^-}$$

IP⁻

siendo IP la suma de las células viables (Anexina V-FITC⁻ IP⁻) y de las células que presentan apoptosis temprana (Anexina V-FITC⁺ IP⁻).

5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

5.1. Obtención de lisados totales: preparación para medir la proteína RhoA.

Siguiendo el método descrito por Stamatakis (Stamatakis et al 2002) se sembraron células LTC y SW1353 durante 24 horas en placas de 60 mm. Cuando estaban a un 70-80% de subconfluencia fueron tratadas con las estatinas con o sin mevalonato (200 μ M) y los lípidos isoprenoides: FPP (5 μ M), GGPP (5 μ M), o la combinación de ambos a 37° C. A continuación, las células fueron tratadas con el buffer de lisis en PBS frío. Esta suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 1.000 *g*. A continuación se aspiró el sobrenadante y se volvió a resuspender con 200 μ l del tampón de lisis frío (Tris 1M pH 7,5, EGTA 0,1 mM, EDTA 0,1 M, β -Mercaptoetanol 0,1mM, 2 /ml de cada uno de los inhibidores de proteasas (Sigma) leupeptina, aprotinina, pepstatina, PMSF 100 mM, SDS 0,5%). Seguidamente se homogeneizaron los lisados pasándolos de 10 a 15 veces a través de agujas de diámetro 25^{5/8}. Después de la centrifugación, se tomó el sobrenadante como el lisado total celular y se conservó a -80° C.

5.2. Obtención de fracciones celulares: fraccionamiento subcelular para la proteína RhoA.

Siguiendo el método ya citado de Stamatakis et al (2002), los cultivos subconfluentes de LTC y SW1353 fueron sembrados durante 24 horas en placas de 60 mm y tratadas con las estatinas solas o combinadas con 200 μ M de mevalonato. Luego las células fueron tratadas con PBS frío y homogeneizados en tampón de lisis (Tris 20 mM

pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, sacarosa 250 mM y DTT (Ditiotreitol) 0.1 mM conteniendo 2 µg/ml de cada uno de los inhibidores de proteasas (leupeptina, aprotinina, pepstatina). Por último, los lisados se centrifugaron a 200.000 g durante 30 minutos a 4° C (Beckman TLA100 rotor). La fracción membranal se obtuvo del sobrenadante de esta centrifugación y la fracción citosólica del pellet celular.

5.3. Cuantificación de proteínas.

Siguiendo el método clásico de Bradford (Bradford 1976) se determinó la concentración proteica con el kit de Bio-Rad (Protein Assay Dye Reagent Concentrate Catalog Number 500-0006).

5.4. Ensayos de Western Blot.

Para el estudio proteico se hizo una electroforesis vertical (Mini-Protean® 3 Cell, Bio-Rad) en geles de poliacrilamida-SDS al 15%. En primer lugar, las proteínas fueron transferidas a las membranas PVDF (Immuno-Blot® PVDF, Bio-Rad) mediante el equipo Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) durante 16 horas a 4° C. A continuación se tiñeron las membranas con rojo *Ponceau* con el fin de confirmar la homogeneidad de la carga de proteínas en cada pocillo, así como la uniformidad de la transferencia antes de iniciar el proceso de incubación con los anticuerpos: anticuerpo primario anti RhoA (dilución 1:1000, 2 horas de incubación a temperatura ambiente, Santa Cruz Biotech). Tras esta incubación, se realizaron de 1 a 3 lavados con el tampón TBST-T y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón (dilución 1:6000, 40 minutos de incubación a temperatura ambiente,

Dako). Las membranas se bloquearon a temperatura ambiente durante una hora con leche desnatada al 10% disuelta en tampón TBST-T.

6. ANALISIS ESTADISTICO

Los valores numéricos obtenidos se expresaron como media \pm SEM, y fueron comparados los grupos tratados con los no tratados, así como los procedentes de las células tumorales contra las células que sirvieron como controles. La significación estadística de las diferencias observadas entre los grupos se evaluó usando el test del análisis de la varianza ANOVA, y, a continuación, un análisis post hoc con el test de Scheffé. Se asumió una diferencia significativa cuando $p > 0,05$

RESULTADOS

1.- ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

1.1.- La simvastatina tiene un efecto antiproliferativo en las líneas de condrosarcoma de rata LTC y C422.

En las líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422 evaluamos la sensibilidad a la acción de la simvastatina en estas líneas, en comparación con las células controles (células NIH3T3 y cultivos primarios de condroblastos). En primer lugar, el ensayo con MTT objetivó una marcada disminución de la viabilidad celular en las líneas tumorales tras 24 y 48 horas de tratamiento con la simvastatina. Este efecto antitumoral fue máximo a la concentración de 10 μM de simvastatina (*Figura 7*).

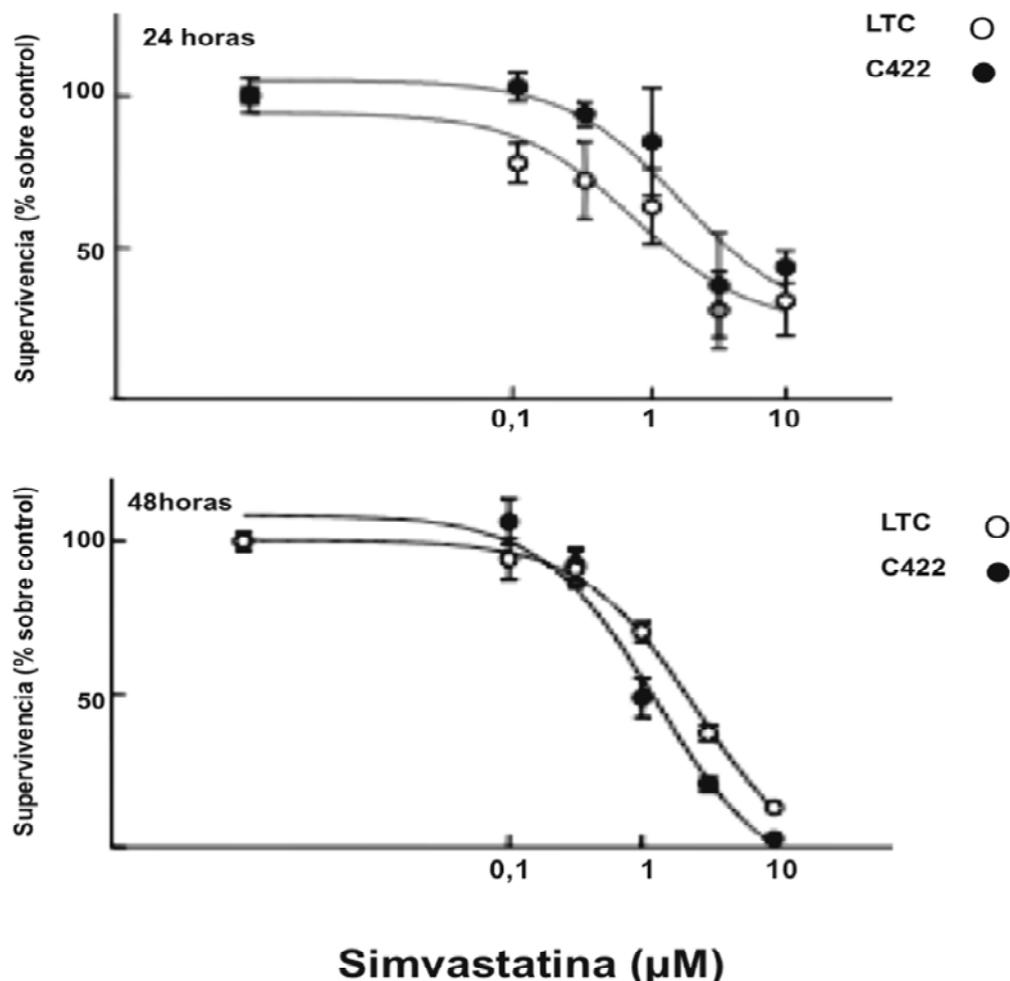


Figura 7. Disminución de la viabilidad celular en líneas celulares de condrosarcoma de rata. Gráfica comparativa de la actividad MTT en las líneas celulares LTC y C422. En todos los ensayos la actividad se representa por la media \pm SEM de tres experimentos

En estas líneas la acción supresora de la viabilidad celular fue contrarrestada tras la adición de 200 μM de mevalonato, indicativo de que este efecto farmacológico es dependiente de la vía del mevalonato (Figura 8).

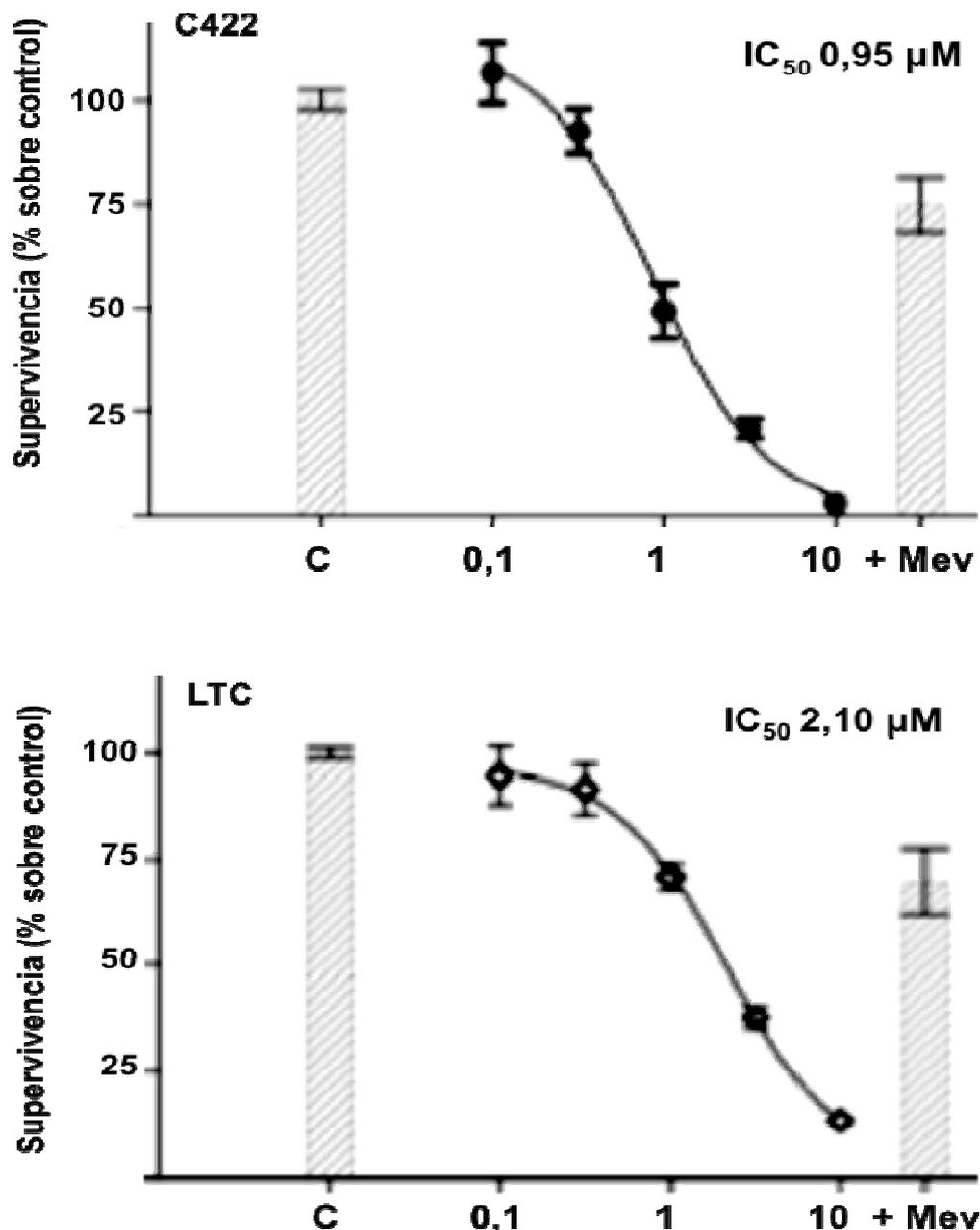


Figura 8. Representación de la viabilidad celular en líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422. En ambos casos la disminución de la viabilidad inducida por la simvastatina pudo ser revertida casi en su totalidad tras añadir el mevalonato. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

Resultados

Las concentraciones inhibitorias del crecimiento celular al 50% (IC₅₀) inducida por la simvastatina (**Tabla 5**) oscilaron entre el 0.74-2.60 µM, en el caso de la línea celular LTC, y de 1.64-1.29 µM para la línea C422 (p<0.05, p<0.01), en comparación con los condroblastos primarios), y con los fibroblastos, respectivamente (**Figuras 9 y 10**). Sin embargo, en caso de los fibroblastos NIH3T3 la viabilidad celular no se modificó significativamente a dosis menores a 10 µM (p<0.05).

| | IC ₅₀ (µM) |
|--------|-----------------------|
| LTC | 0,74-2,60 |
| C422 | 1,29-1,64 |
| NIH3T3 | 4,75 |

Tabla 5. Valores de las IC₅₀ de las líneas tumorales LTC y C422 frente al control NIH3T3. Se representa la media ± SEM de tres experimentos

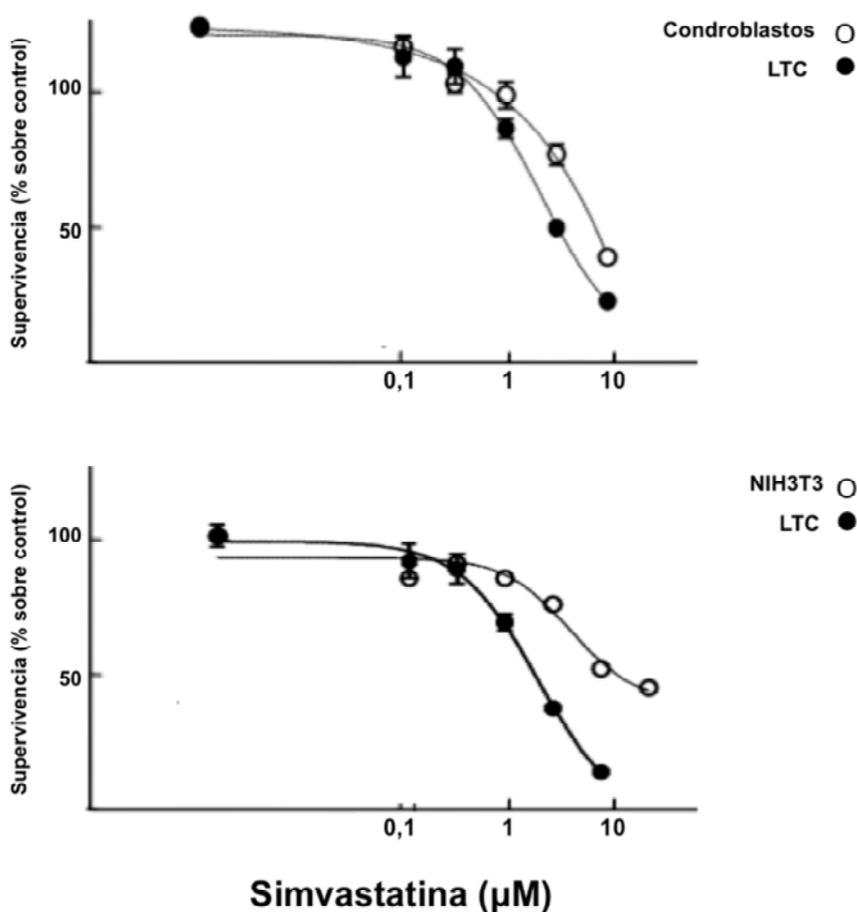


Figura 9. Representación gráfica de la viabilidad celular en líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422 en comparación con la de condroblastos primarios y fibroblastos. La IC₅₀ fue entre 3 y 6 veces menor en las células tumorales que en las no transformadas. Se representa la media ± SEM de tres experimentos

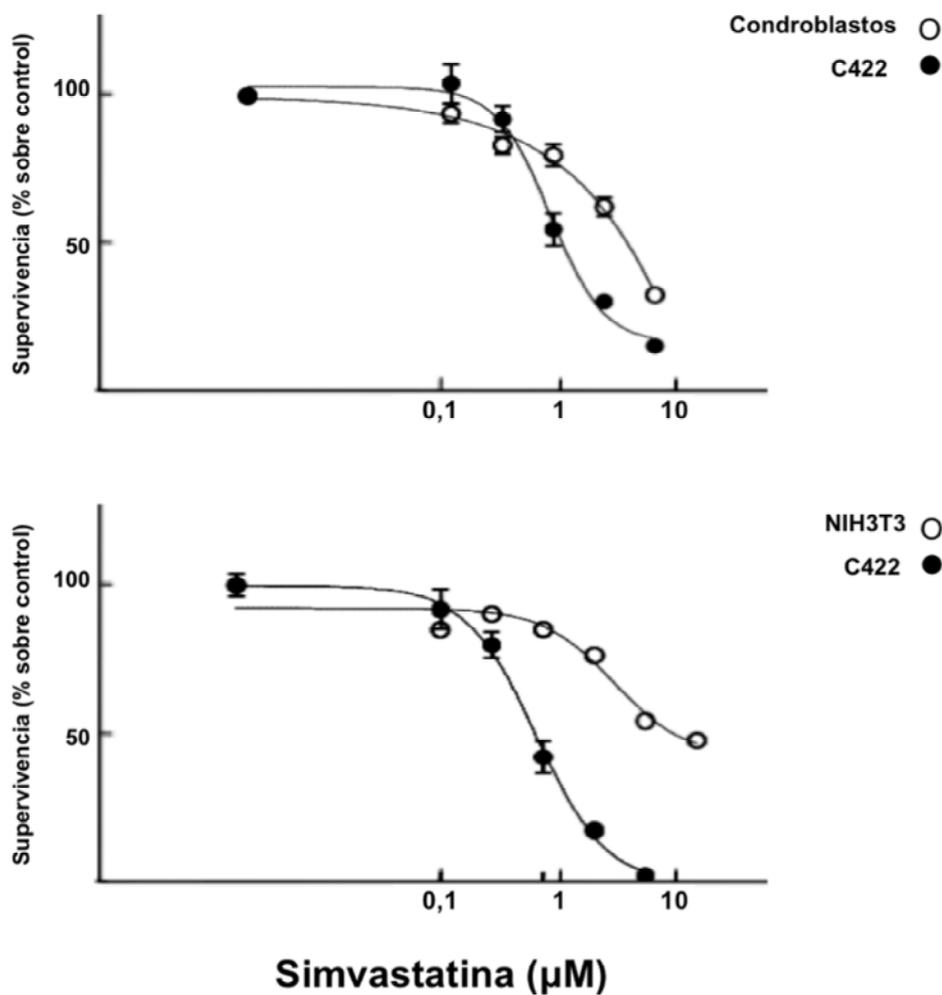


Figura 10. Representación gráfica de la viabilidad celular en líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422 en comparación con la condroblastos primarios y fibroblastos. La IC_{50} fue entre 3 y 6 veces menor en las células tumorales que en las no transformadas. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

Cuando este mismo efecto se estudió en las células cartilaginosa no transformadas, provenientes de los cartílagos costales de ratas neonatas, los resultados obtenidos nos indicaron que el efecto antitumoral de la simvastatina en el condrosarcoma parece que es selectivo en las células tumorales y no en las sanas. Ello es debido a que la viabilidad no se afectó con los tratamientos de simvastatina en los condroblastos normales a las concentraciones farmacológicas usadas en las células tumorales.

El efecto antitumoral de la simvastatina sobre los condrosarcomas fue dosis- y tiempo-dependiente, descendiendo progresivamente la viabilidad con la concentración y el tiempo, siendo máximos a una dosis de 10 μM de simvastatina y tras 72 horas de administración del fármaco (**Figura 11**).

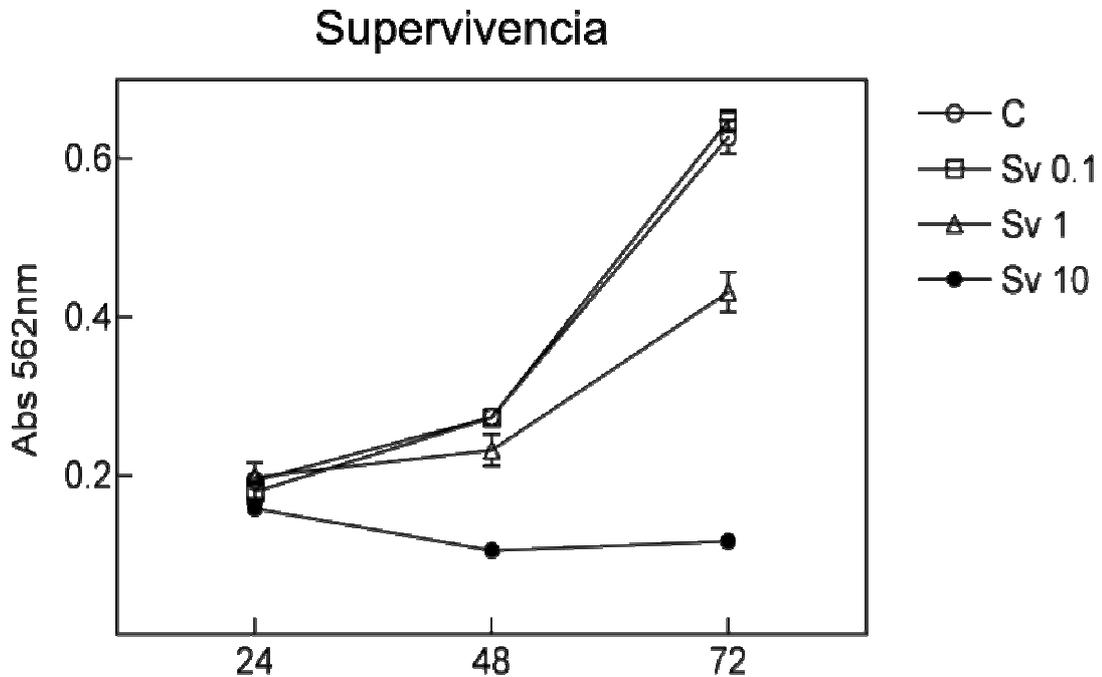


Figura 11. La disminución de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma de rata LTC fue dependiente de la dosis administrada de simvastatina, siendo máxima a 10 μM . A una dosis de 1 μM a las 72 horas la diferencia en la disminución de la viabilidad fue significativa respecto a los controles (33% superior respecto al control, $p < 0,001$). Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

El efecto antitumoral de la simvastatina fue dependiente de la vía del mevalonato. Cuando las células tumorales fueron co-tratadas con simvastatina y con mevalonato, la reversión sobre la disminución de la viabilidad fue completa. Este efecto fue similar al obtenido tras la co-administración de los dos lípidos isoprenoides FPP y GGPP con la simvastatina. El grado de reversión del efecto de la simvastatina, sin embargo, fue menor cuando sólo se co-administró con FPP que cuando se hizo con GGPP, lo cual sugiere que la afectación de la viabilidad celular parece depender más de los procesos de geranylgeranilación que de farnesilación (**Figura 12**)

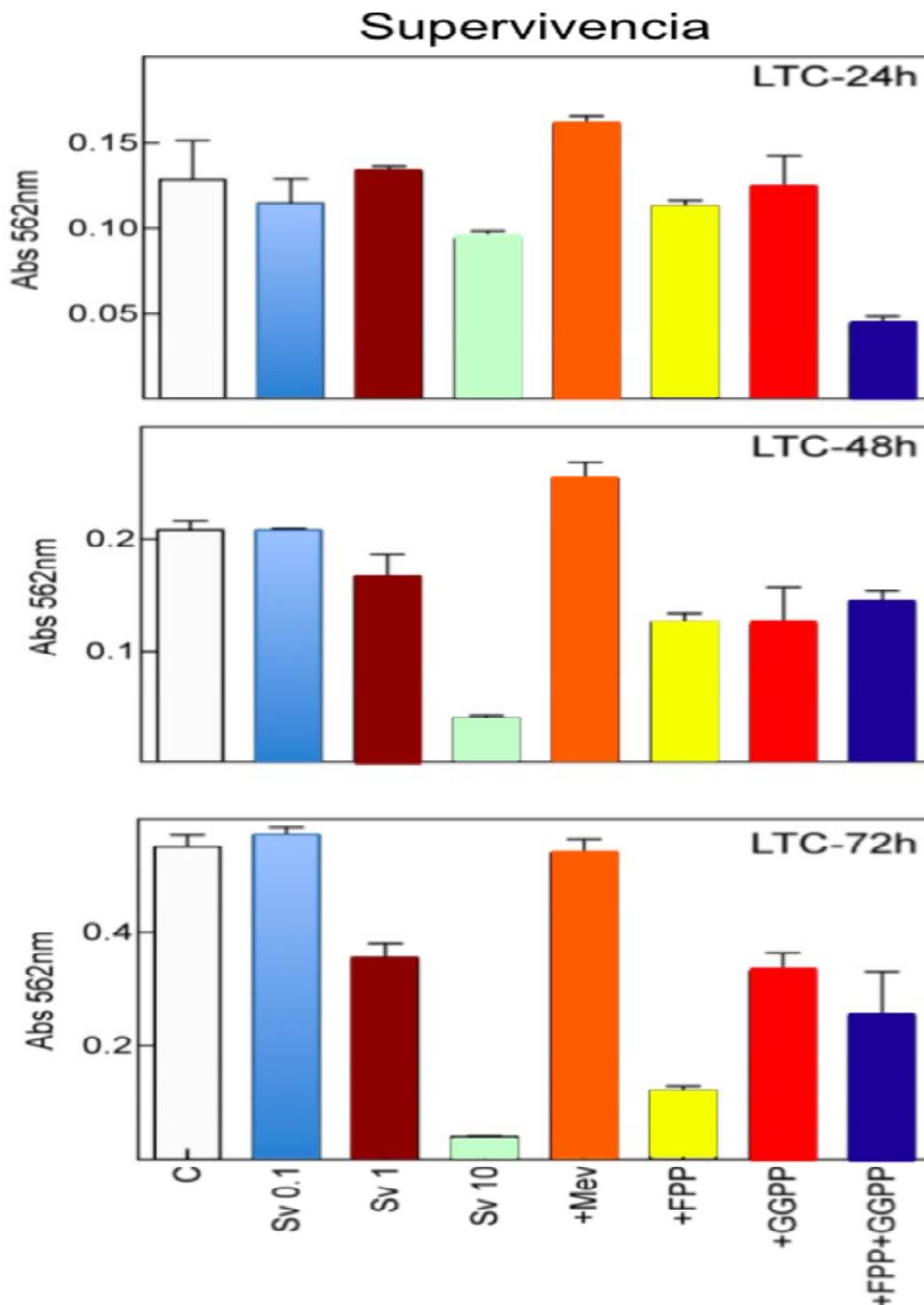


Figura 12. La disminución de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma de rata LTC fue dependiente de la dosis administrada de simvastatina y del tiempo durante el cual fueron tratadas. La reversión del proceso fue completa cuando se administró conjuntamente con el mevalonato y parcial cuando se coadministró con los diferentes lípidos isoprenoides. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

1.2.- Las estatinas lipofílicas ejercen un efecto antiproliferativo que es dependiente del tiempo y la dosis en las líneas SW1353.

En los gráficos que se exponen a continuación, se observa que el mismo efecto observado en las líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422 también se reproduce en la línea celular de condrosarcoma humano SW1353, lo cual indica que esta respuesta no depende de la especie tratada. En la **Figura 13**, se pueden observar los mismos resultados usando la simvastatina en la línea humana, siendo esta respuesta tiempo y dosis dependiente.

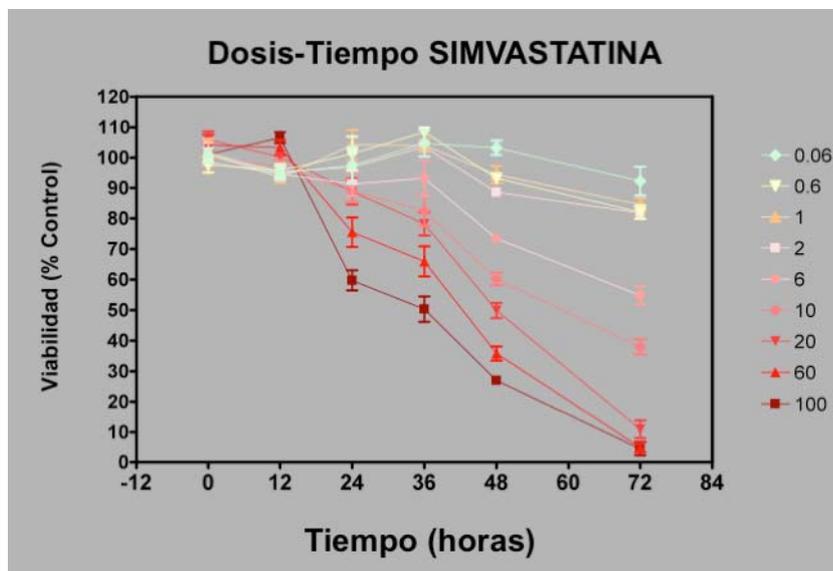
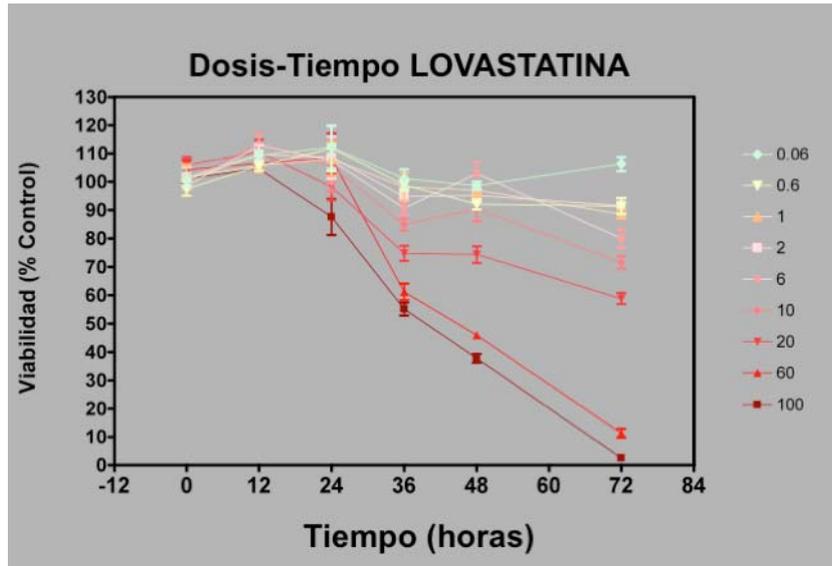


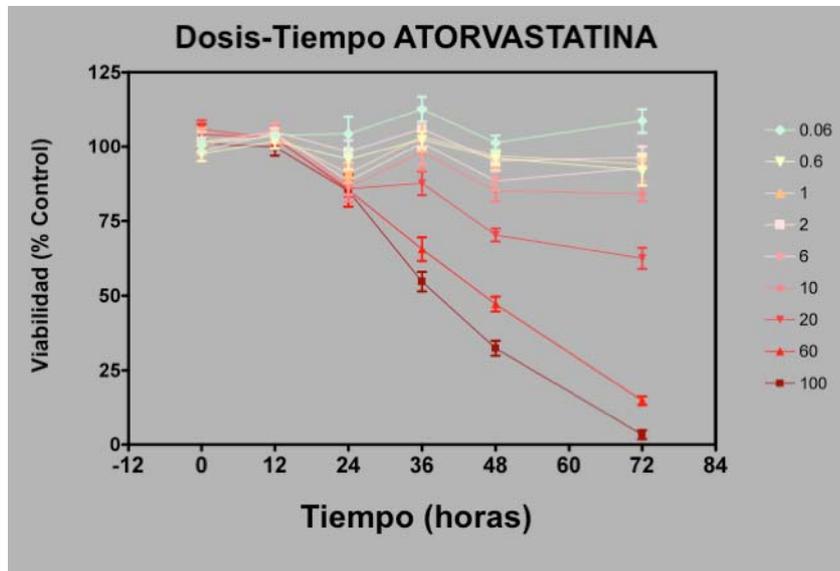
Figura 13. La disminución de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma humano SW1353 fue dependiente de la dosis administrada de simvastatina y del tiempo durante el cual fueron tratadas. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

Lo siguiente que se estudió era si este efecto era clase-dependiente de la familia de las estatinas y en qué medida. Para ello utilizamos diferentes estatinas lipofílicas (lovastatina, atorvastatina y fluvastatina) e hidrofílicas (pravastatina). Como se puede comprobar en las gráficas de la **Figura 14**, en las que se representa la viabilidad celular tras ser tratadas con la lovastatina, atorvastatina y fluvastatina, el perfil de la respuesta a estas tres drogas fue similar al observado tras ser tratadas con simvastatina, siendo esta respuesta tanto tiempo- como dosis-dependiente.

(A)



(B)



(C)

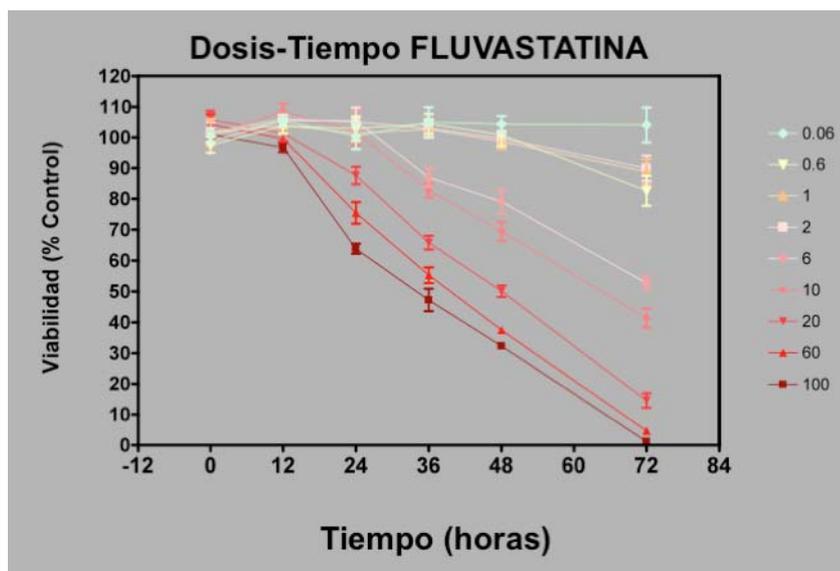


Figura 14. La disminución de la viabilidad en la línea celular de condrosarcoma humano SW1353 fue dependiente de la dosis administrada de lovastatina (A), de atorvastatina (B) y de fluvastatina (C) del tiempo durante el cual fueron tratadas. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

Resultados

Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de la pravastatina sobre la viabilidad celular (**Figura 15**), se observó que no ejercía ningún tipo de efecto a lo largo del tiempo que duró el experimento, ni con ninguna de las dosis utilizadas. Estos resultados nos indican que la acción de las estatinas sobre la viabilidad celular en los condrosarcomas tiene un efecto clase, pero sólo con las estatinas lipofílicas, pero no con las hidrofílicas.

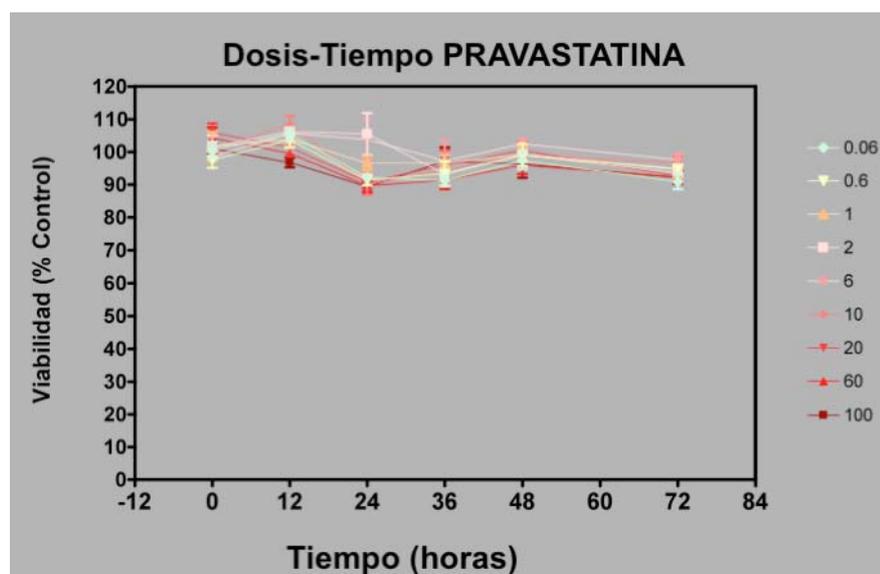


Figura 15. La viabilidad en la línea celular de condrosarcoma humano SW1353 no se afectó con ninguna dosis administrada de pravastatina durante todo el tiempo durante el cual fueron tratadas. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

Las IC_{50} de las diferentes estatinas al cabo de 72 horas queda reflejado en la **Tabla 6** y en la **Figura 16**. Se observa que, mientras las IC_{50} de las estatinas lipofílicas oscilaron entre 0,99-8,61 μ M, en el caso de la estatina hidrofílica (pravastatina) la IC_{50} fue superior a 100 μ M.

| ESTATINA | IC_{50} (μ M) |
|---------------|----------------------|
| Pravastatina | >100 |
| Lovastatina | 5,19 |
| Fluvastatina | 0,99 |
| Atorvastatina | 8,61 |
| Simvastatina | 1,53 |

Tabla 6. Representación de la sensibilidad a las estatinas (IC_{50}) en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El condrosarcoma no fue sensible a la pravastatina.

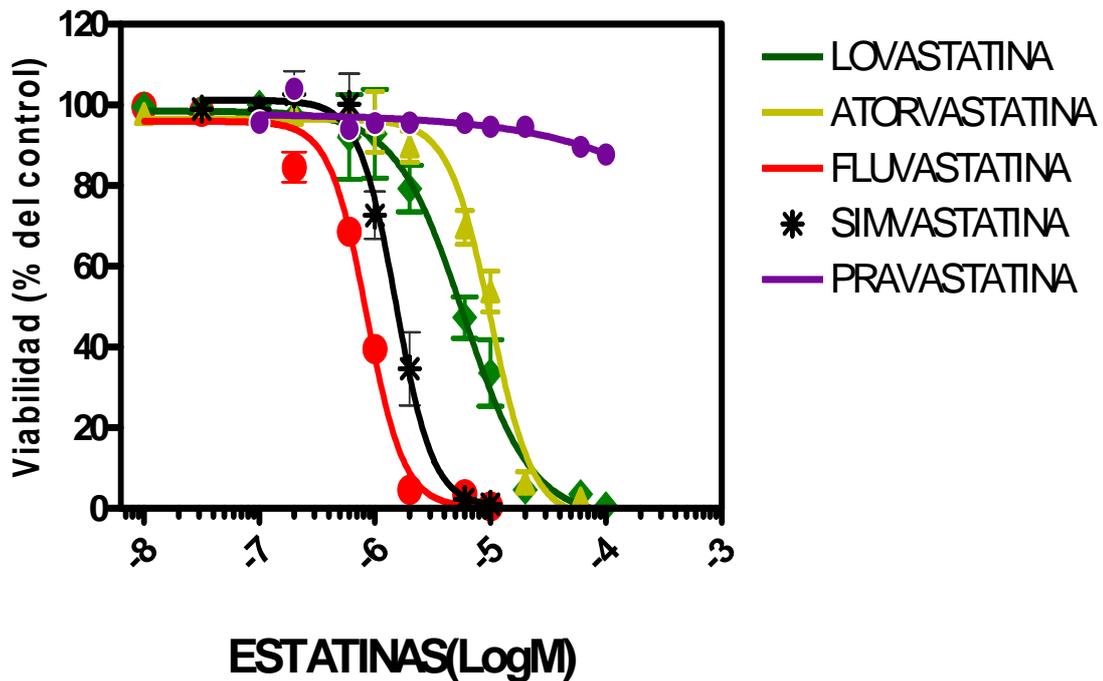


Figura 16. Representación de la sensibilidad a las estatinas (IC_{50}) en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El condrosarcoma no fue sensible a la pravastatina. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

1.3.- El mevalonato y el GGPP revierten la toxicidad inducida por las estatinas en las líneas SW1353.

Al igual que ocurre con las líneas de condrosarcoma de rata LTC y C422, el efecto antiproliferativo de las estatinas lipofílicas es dependiente de la vía del mevalonato. Como se puede observar en las gráficas siguientes, la curva de viabilidad se desplaza hacia la derecha tras la co-administración de mevalonato, de FPP y de GGPP. Este desplazamiento es máximo cuando se administra junto a la estatina el mevalonato y el GGPP. Sin embargo, es mínima o inexistente cuando se añade FPP. Estos datos no sólo nos informan de que el efecto antiproliferativo de las estatinas lipofílicas es dependiente de la vía del mevalonato, sino que, además, los fenómenos que acontecen dependen de los procesos de geranilgeranilación proteica (**Figura 17, 18, 19 y 20**).

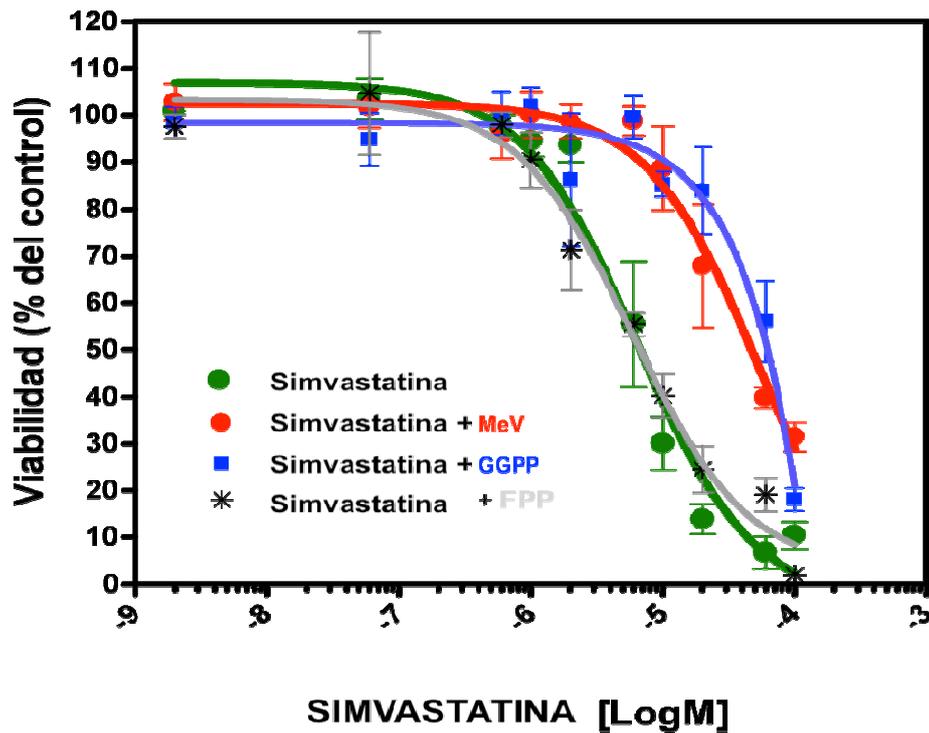


Figura 17. Representación de la sensibilidad a la simvastatina en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El proceso es dependiente de la vía del mevalonato. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

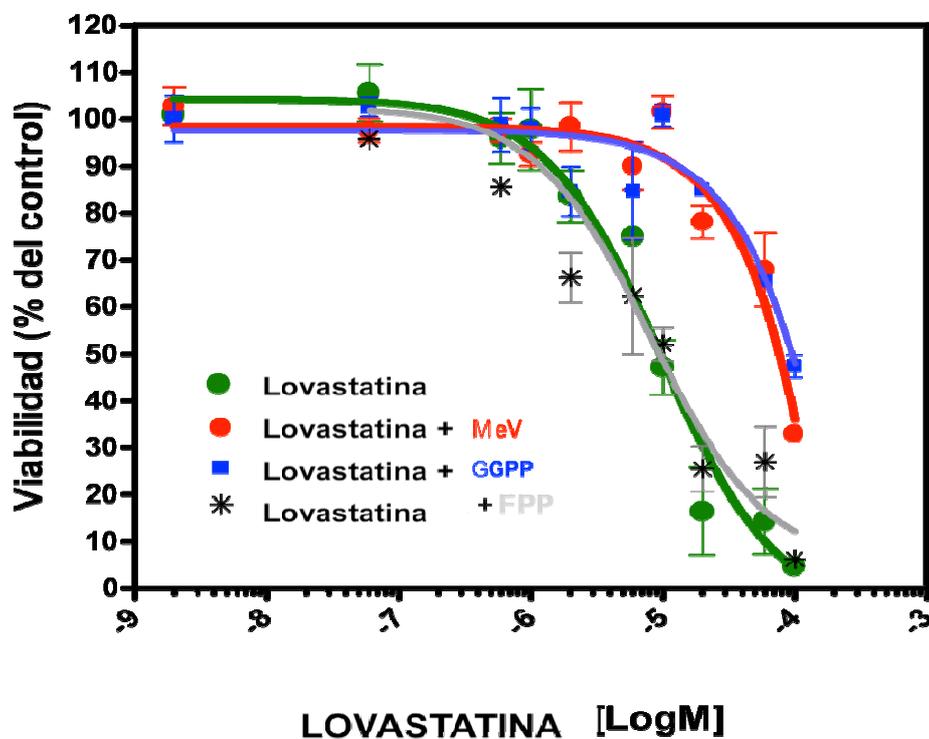


Figura 18. Representación de la sensibilidad a la lovastatina en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El proceso es dependiente de la vía del mevalonato. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

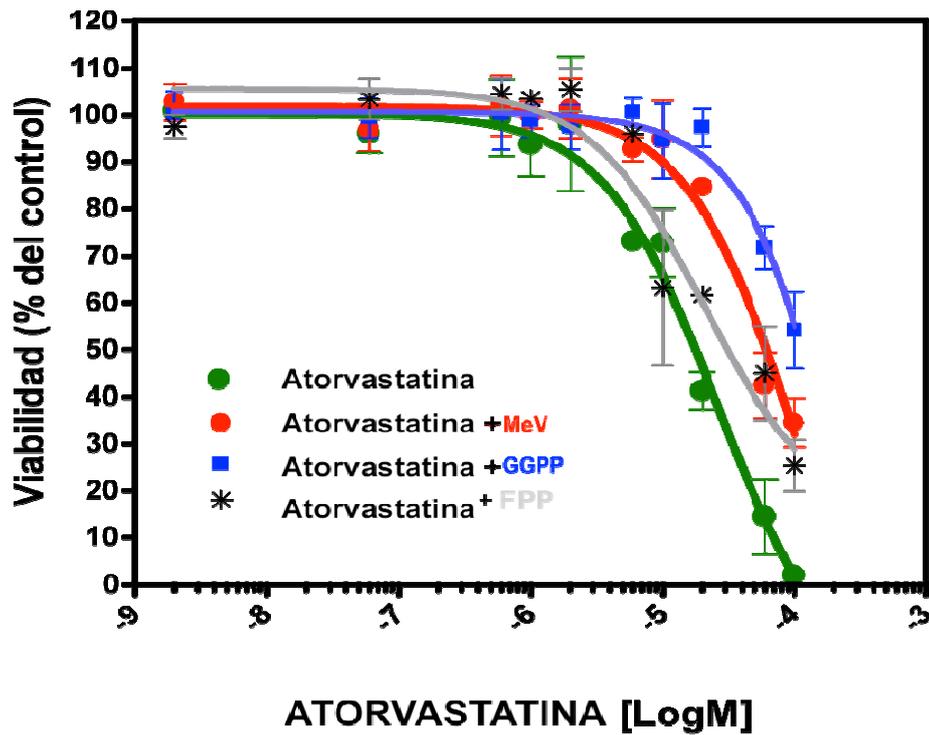


Figura 19. Representación de la sensibilidad a la atorvastatina en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El proceso es dependiente de la vía del mevalonato. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

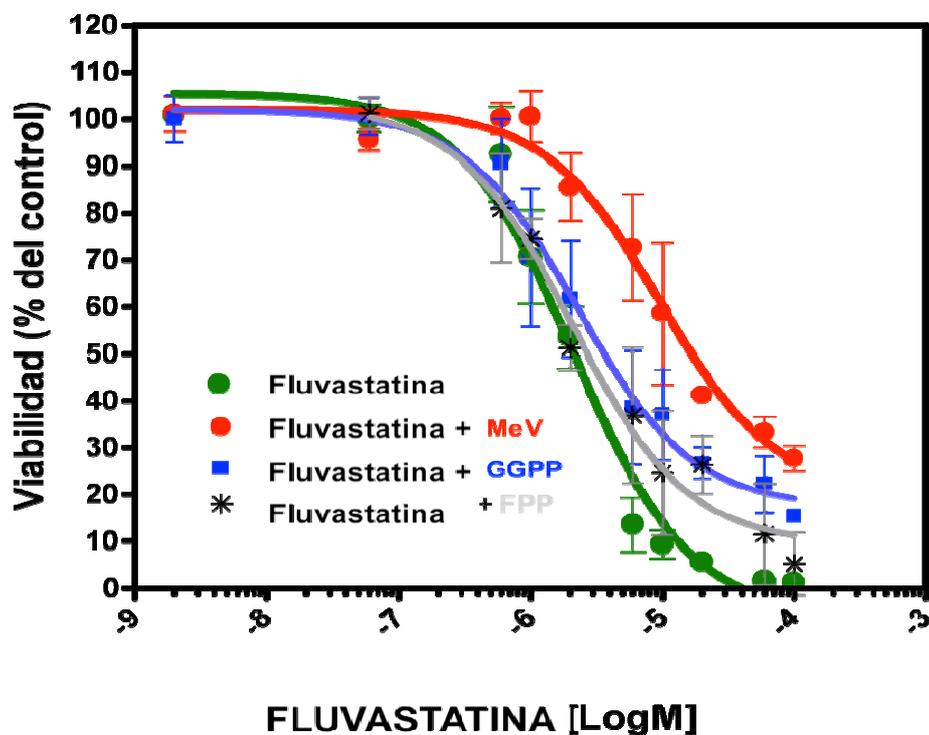


Figura 20. Representación de la sensibilidad a la fluvastatina en la línea de condrosarcoma humano SW1353. El proceso es dependiente de la vía del mevalonato. Se representa la media \pm SEM de tres experimentos

2.- ENSAYO DE APOPTOSIS

2.1.- Modificaciones morfológicas en las líneas LTC y C422.

El tratamiento con la simvastatina (10 μM) durante 48 horas provocó en las dos líneas de condrosarcoma de rata (LTC y C422) alteraciones morfológicas propias de alteración de la viabilidad dependiente de un proceso de apoptosis. Así, se observó que estas células presentaban un aspecto redondeado y encogido. Además, cuando las placas de cultivo se agitaban suavemente, estas células redondeadas fueron incapaces de mantenerse adheridas al sustrato del plato de cultivo y se desprendían del mismo, indicando con ello que el tratamiento farmacológico, además, afectaba a la capacidad de adhesión celular. Estas modificaciones morfológicas se contrarrestaron tras la coadministración de la simvastatina con mevalonato (200 μM) (**Figura 21**), indicando de nuevo que el efecto de la estatina es dependientes de esta vía metabólica.

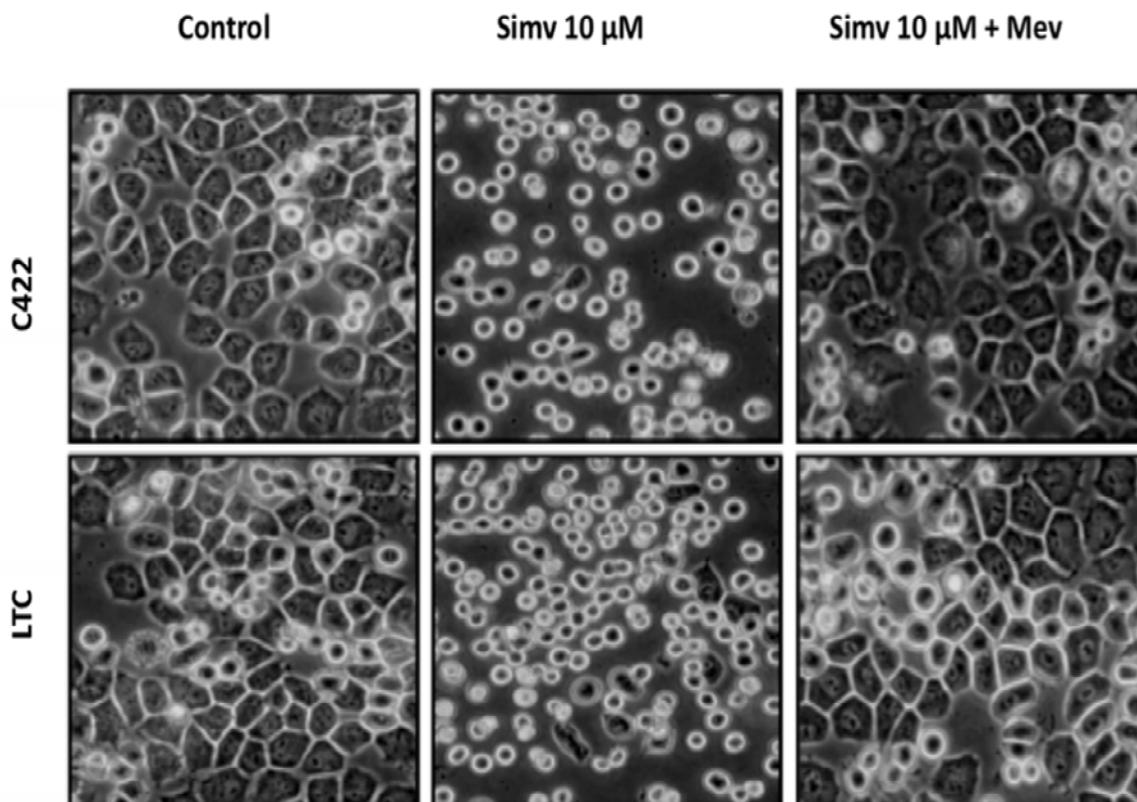


Figura 21. El tratamiento con simvastatina de las líneas LTC y C422 provocó cambios morfológicos característicos de apoptosis, que fueron revertidos en su totalidad con la coadministración del mevalonato

2.2.- Estudio mediante marcaje con DAPI.

Cuando las células LTC y C422 fueron tratadas con 10 μ M de simvastatina el porcentaje de células con núcleos fragmentados y con cromatina condensada, indicadores de la existencia de un proceso apoptótico, debidas al marcaje con DAPI, mostró un aumento del número de respecto a la situación control (**Figura 22**). Mientras en el grupo control se observó un 2,5% de células positivas para DAPI, en el grupo tratado el porcentaje ascendió hasta un 25% (10 veces más), siendo este incremento significativo desde el punto de vista estadístico (**Tabla 7**, $p < 0.01$). Tras la co-administración con 200 μ M de mevalonato, este efecto revirtió, siendo la diferencia sólo de 0,8 veces menor, no siendo estadísticamente significativa. Cuando se utilizó como control la acción del quimioterápico etopósido a dosis de 5 y 10 μ M, el porcentaje de células apoptóticas fue superior al encontrado en la situación control (1,36 veces y 2,64 veces, respectivamente, siendo en estos casos las diferencias significativas, con $p < 0,02$). Sin embargo, el efecto del quimioterápico a estas dosis no superó a la producida por la simvastatina a una dosis de 10 μ M. A la dosis de 5 μ M de etopósido se cuantificaron 7,35 veces menos células

| TRATAMIENTO | % APOPTOSIS | % vs CONTROL |
|---------------------|-------------|--------------|
| Control | 2,5 | |
| 10 μ M Sv | 25 | 1000 |
| 10 μ M Sv + Mev | 2 | 80 |
| 5 μ M Etop | 3,4 | 136 |
| 10 μ M Etop | 6,6 | 264 |
| Golpe de calor | 11,3 | 452 |

Tabla 7. Porcentaje de células positivas para DAPI en tratamiento con simvastatina. **Mev** mevalonato; **Etop** etopósido

apoptóticas que con la simvastatina. En el caso del etopósido a una dosis de 10 μM de etopósido se cuantificaron 3,39 veces menos células apoptóticas que con la simvastatina. Por último, cuando se utilizó el golpe de calor como método para provocar la apoptosis celular, el porcentaje de células apoptóticas fue 4,52 veces superior que en la situación control ($p < 0.01$), pero menor que la provocada por la simvastatina (2,21 veces menor, $p < 0.01$).

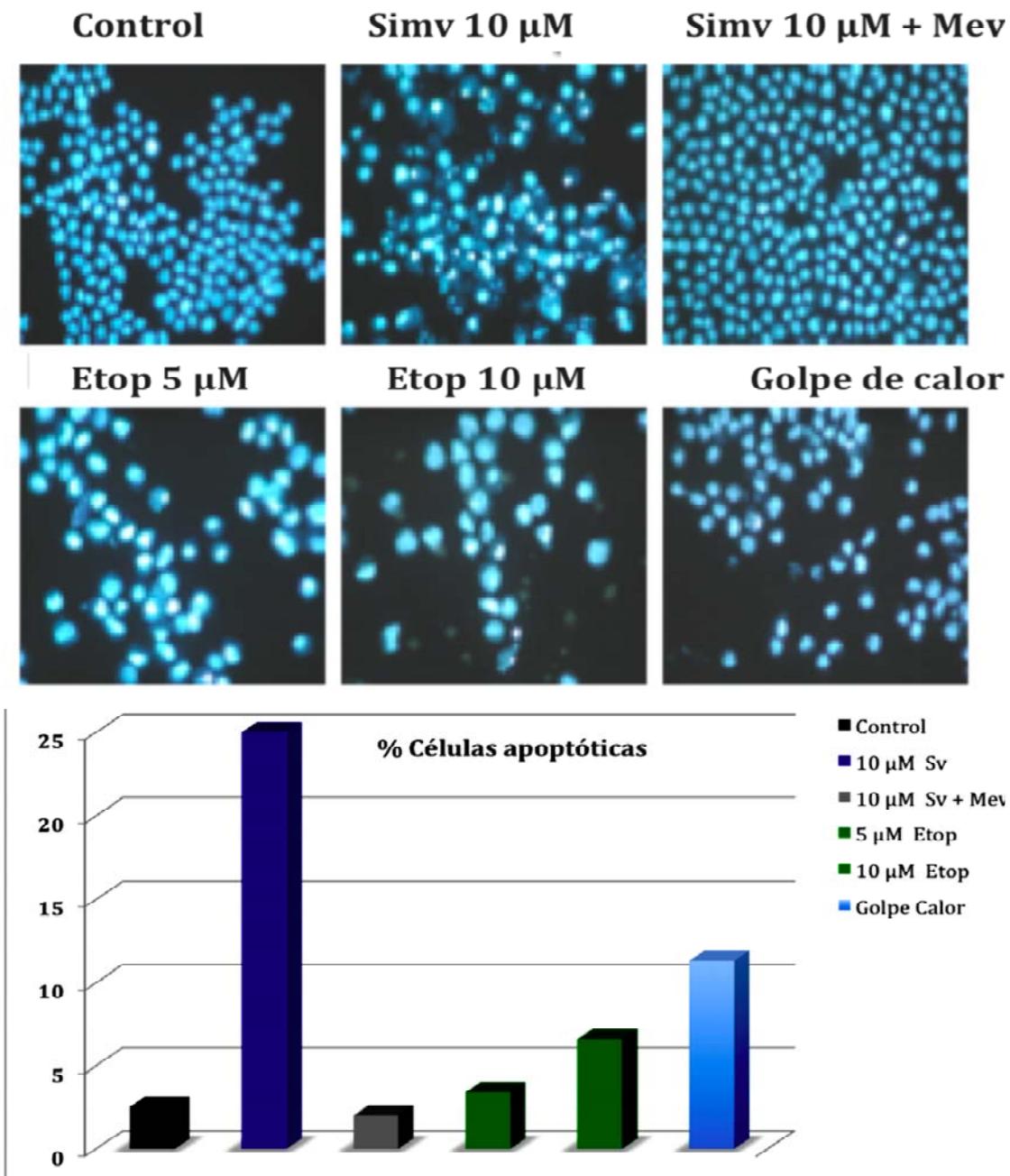


Figura 22. Fotografía y representación gráfica de la inducción de apoptosis evaluada mediante la tinción de DAPI tras tratamiento de las células de condrosarcoma con simvastatina, comparado con situaciones control tratado con etopósido y con golpe de calor.

2.3.- Estudio de apoptosis mediante *DNA laddering*.

Cuando las células LTC y C422 fueron tratadas con simvastatina a dosis de 0,1, 1 y 10 μM durante 24, 48 y 72 horas, se observó que se producía una degradación del ADN que fue dependiente del tiempo y de la dosis, siendo apreciable a partir de las 48 horas con dosis superiores a 1 μM . Este efecto apoptótico fue revertido tras la co-administración con 200 μM de mevalonato, indicando de nuevo que este proceso es dependiente de esta vía metabólica (Figura 23).

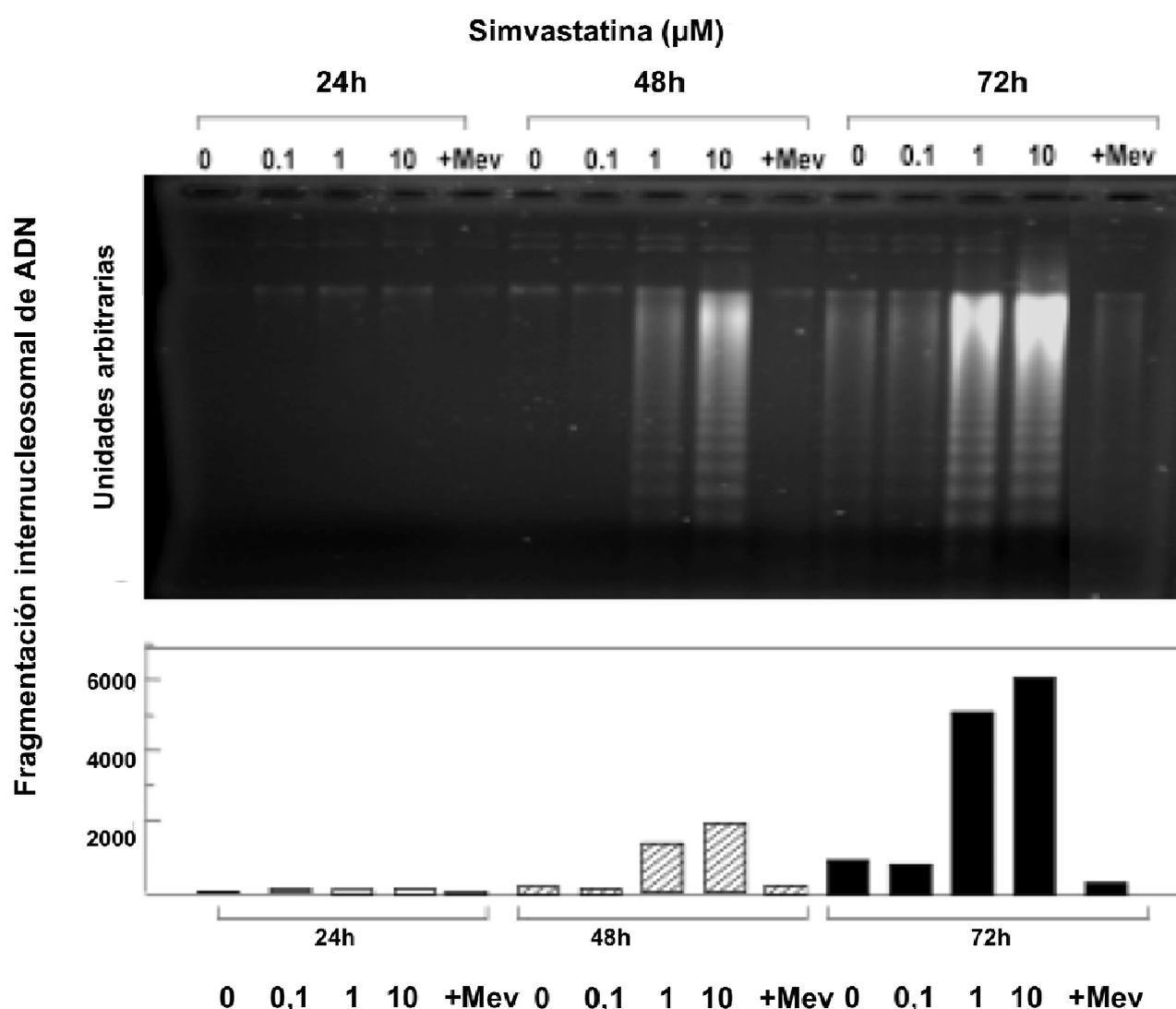


Figura 23. Representación gráfica de la inducción de apoptosis evaluada mediante la degradación del ADN tras tratamiento de las células de condrosarcoma de rata con diferentes dosis de simvastatina durante 24, 48 y 72 horas.

Resultados

Cuando se evaluó el efecto de la simvastatina en células de condrosarcoma humano SW1353 se observó el mismo efecto de degradación en escalera del ADN que en las células de condrosarcoma de rata anteriormente reseñado (**Figura 24**). El efecto fue dosis dependiente (0,3, 1, 3, 10, 30 y 100 μM), siendo revertido con el mevalonato y con los lípidos FPP y GGPP. Este efecto de la simvastatina fue dependiente del tiempo igualmente (12, 24, 36, 48 y 72 horas), sobre todo a partir de las 36 horas, siendo revertido con el mevalonato, con el lípido isoprenoide GGPP y parcialmente con el FPP.

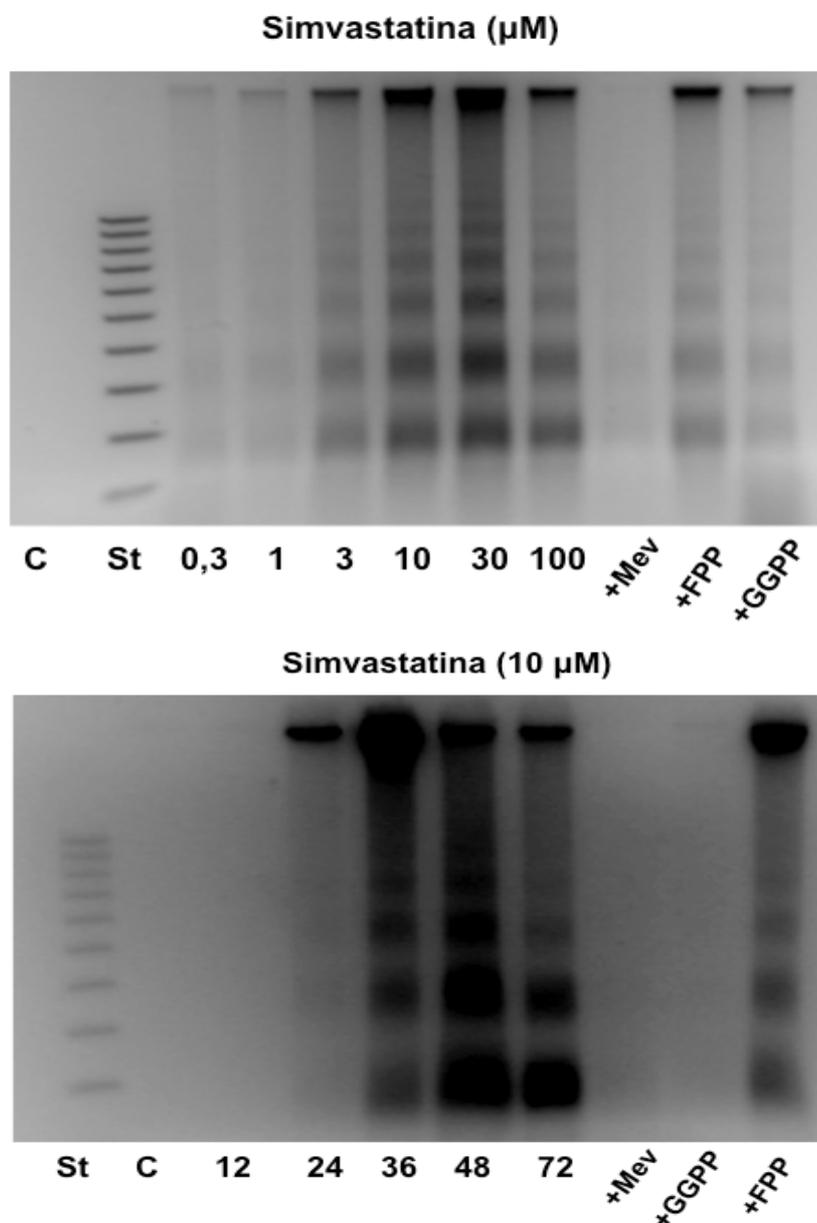


Figura 24. Representación gráfica de la inducción de apoptosis evaluada mediante la degradación del ADN tras tratamiento de las células de condrosarcoma humano con diferentes dosis de simvastatina durante diferentes tiempos. El efecto fue dependiente del tiempo y la dosis y revertido por el mevalonato y el GGPP, pero no por el FPP.

Resultados

Se observó además que este efecto de las estatinas en células de condrosarcoma humano SW1353 fue dependiente de los procesos de geranilgeranilación (mimetizado tras la adición de GGTI), y dependiente de la lipofilidad de la estatina, ya que se reproducía tras la adición de fluvastatina, atorvastatina y lovastatina, pero no tras añadir la estatina hidrofílica pravastatina (**Figura 25**).

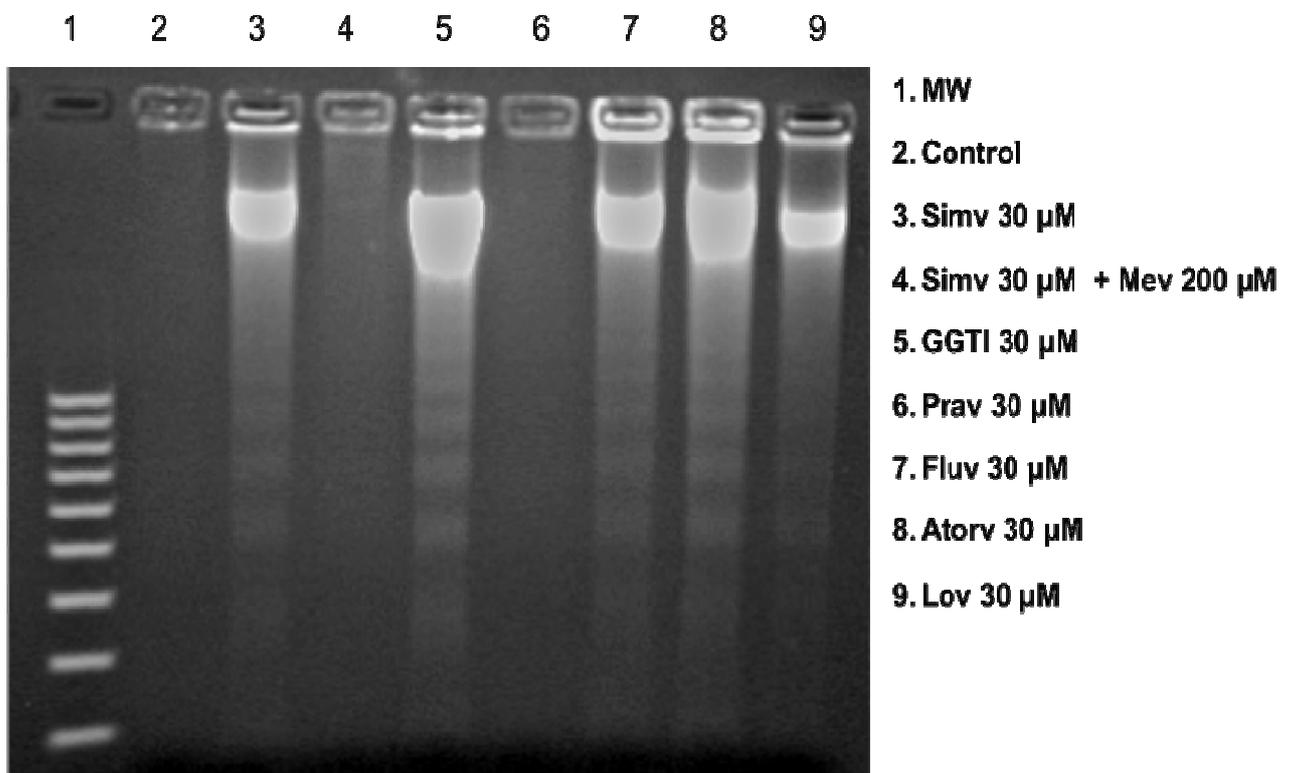


Figura 25. Representación gráfica de la inducción de apoptosis evaluada mediante la degradación del ADN tras tratamiento de las células de condrosarcoma humano con diferentes estatinas. El efecto fue mimetizado por GGTI y no se reprodujo cuando se utilizó una estatina hidrofílica (pravastatina).

2.4.- Estudio de apoptosis mediante citometría de flujo.

Cuando las células de condrosarcoma de rata LTC fueron tratadas con simvastatina a una dosis de 10 μ M durante 48 horas y se marcaron las células con yoduro de propio, se observó que la droga producía una disminución en la fase de síntesis, con parada del ciclo sobre todo en la fase G0-G1 (**Figura 26**).

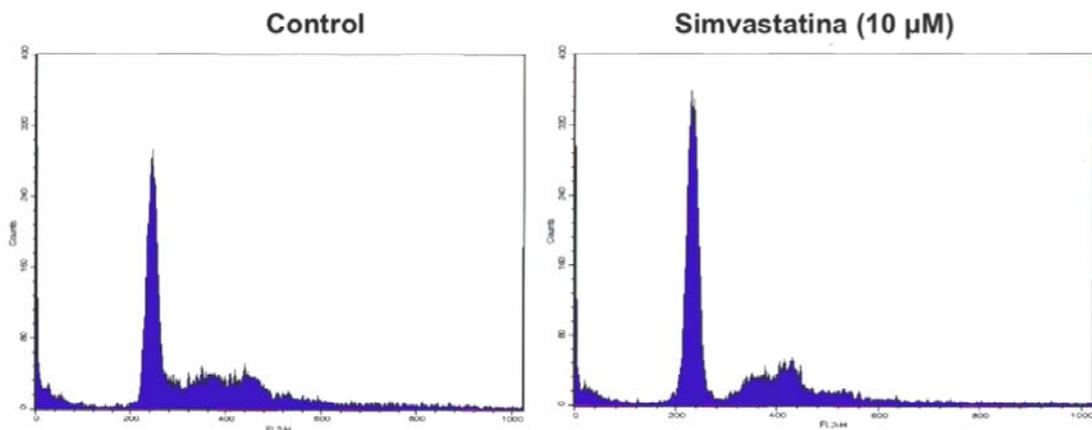


Figura 26. Representación gráfica del perfil del ciclo celular en la situación control y tras tratamiento con 10 μM de simvastatina, observándose una disminución en la fase de síntesis del ADN y una parada del ciclo en la fase G0/G1.

Esta parada del ciclo celular producido por la estatina se vio acompañada de cambios en el pico SubG0, indicando la presencia de muerte celular por apoptosis. Este efecto apoptótico de las estatinas sobre la línea de condrosarcoma humano SW1353 se evaluó, por tanto, midiendo el porcentaje de células en esta población subdiploide. En primer lugar se constató que las estatinas inducen un incremento en el porcentaje de células en esta población subdiploide, que es dependiente de la dosis y de la vía del mevalonato, ya que revierte tras su co-administración. Se observó de nuevo que la inducción de apoptosis sólo ocurre con las estatinas lipofílicas, pero no en las hidrofílicas, como es el caso de la pravastatina (**Figura 27**).

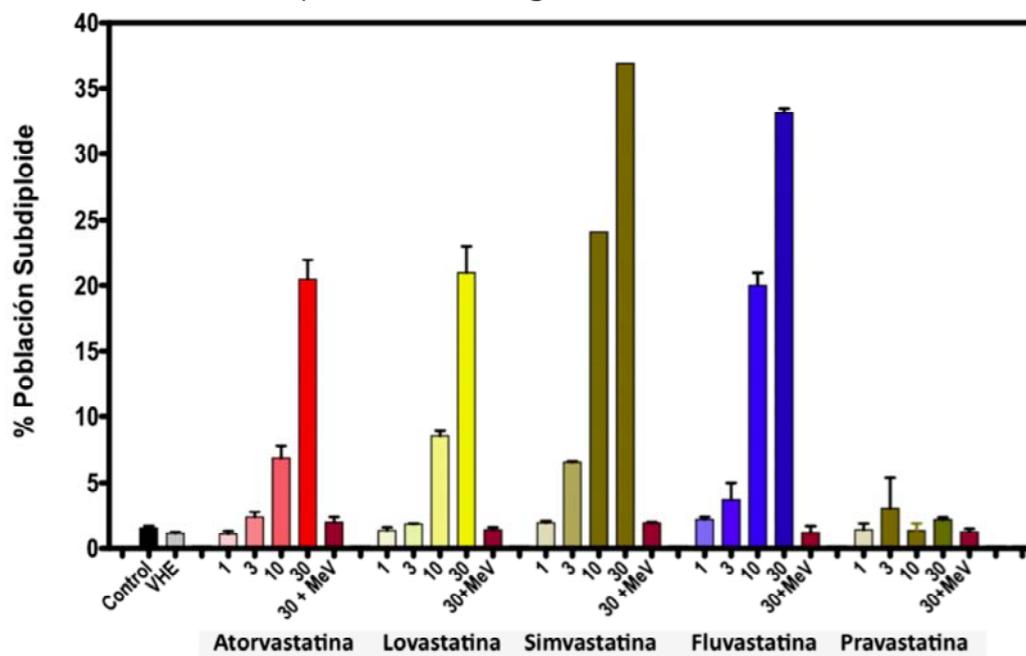


Figura 27. Incremento del pico SubG0 tras el tratamiento con las estatinas lipofílicas, pero no con la hidrofílica (pravastatina), que es dosis dependiente y que se revierte con el mevalonato.

Además, esta respuesta depende esencialmente de los fenómenos de geranilgeranilación proteica, ya que el efecto apoptótico de la simvastatina en las líneas SW1353 revierte tras la adición de GGPP de manera dosis-dependiente, pero no con el FPP (**Figura 28**).

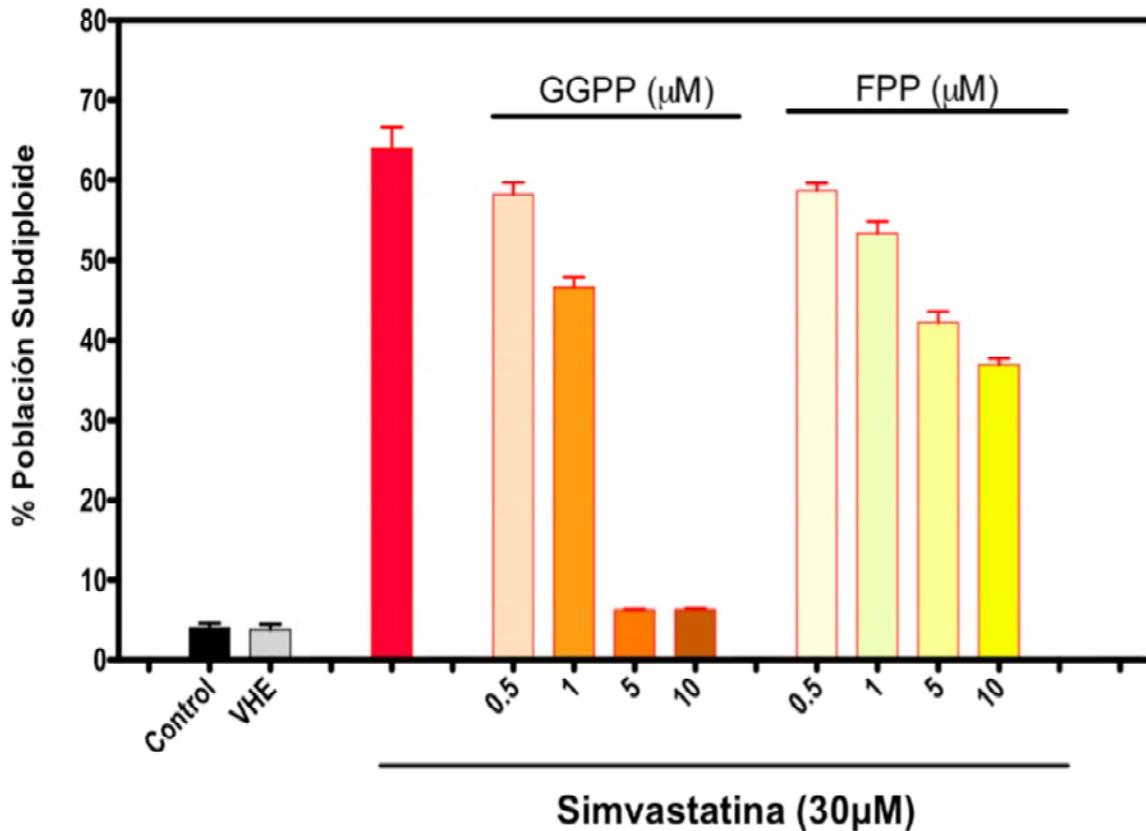


Figura 28. Incremento del pico SubG0 tras el tratamiento con la simvastatina, que se revierte con el GGPP, pero no tras la adición de FPP.

Igualmente, se observó un efecto dosis-respuesta sobre la inducción de apoptosis representada por el incremento de la población subdiploide en las líneas SW1353 tras la administración de los inhibidores de la isoprenilación proteica FTI y GGTI, siendo constatable de forma dosis-dependiente tras la administración de este último, pero no tras la administración del FTI. Ambos experimentos demuestran la importancia de la geranilgeranilación proteica en estos fenómenos (**Figura 29**).

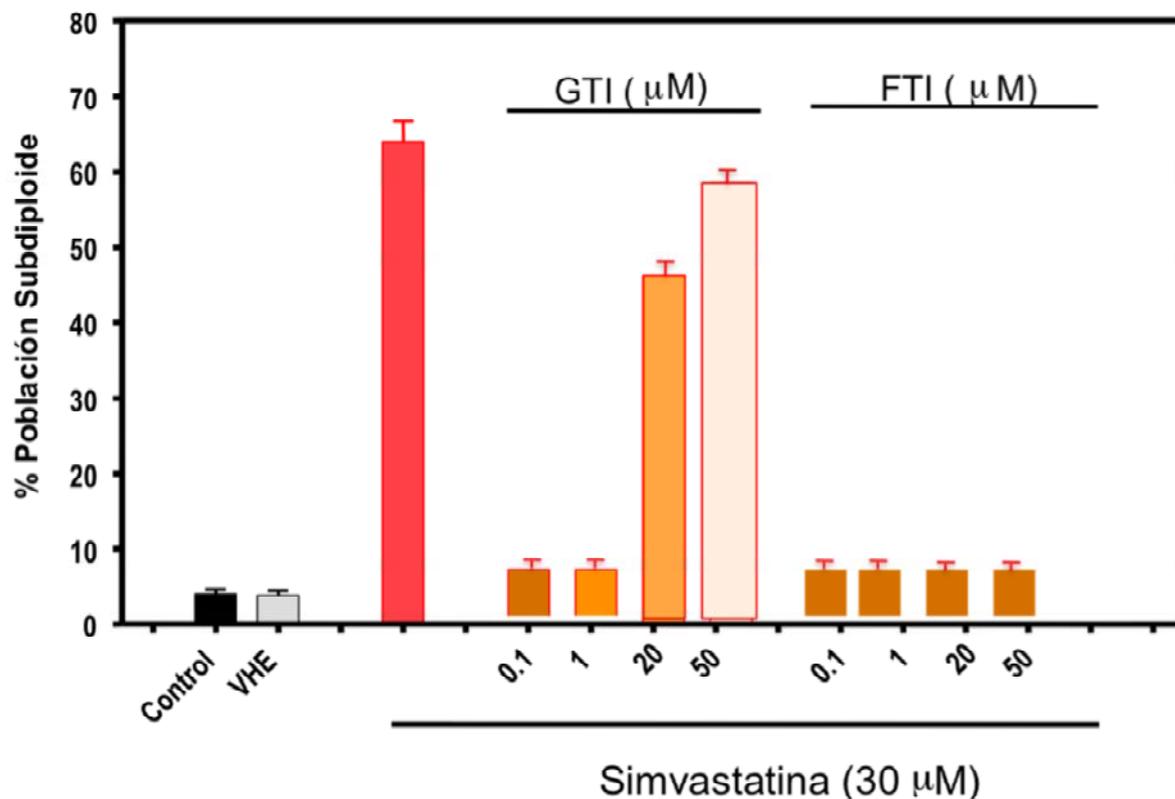


Figura 29. Incremento del pico SubG0 tras el tratamiento con la simvastatina, que se mimetiza con el GGTI, pero no con el tratamiento con FTI.

Al analizar en detalle la distribución de las células y ver el porcentaje de células acorde a la detección de la Anexina V y del Ioduro de Propidio, se observó que la simvastatina incrementó el porcentaje de células anexina V⁺/IP⁺ de manera dosis-dependiente en las líneas SW1353. Este efecto fue revertido por el mevalonato, por el GGPP y el GGPP + FPP. Fue parcialmente revertido por el FPP; no fue mimetizado por el FTI, pero sí por el GGTI, indicando de nuevo que es un proceso dependiente de la geranylgeranilación proteica (**Figura 30**).

La simvastatina incrementa el porcentaje de células anexina V⁺/IP⁺ entre un 35,17% y un 310,17% respecto a la situación control. Tras la adición de FTI sólo incrementó un 26,27%, mientras que cuando se añadió GGTI, el incremento fue del 357% (**Tabla 8**).

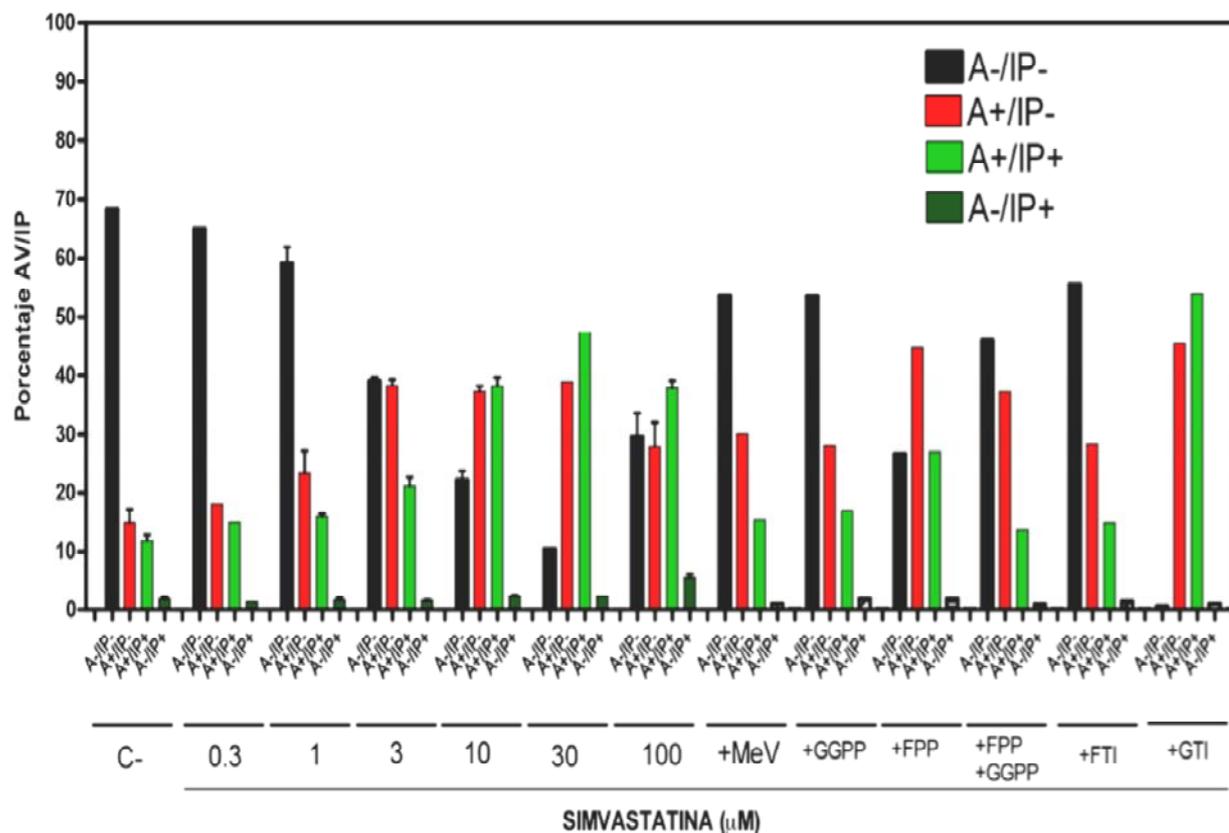


Figura 30. Incremento de la fracción de células anexina V⁺/IP⁺ tras el tratamiento con la simvastatina, que se mimetiza con el GGTTI, pero no con el tratamiento con FTI, y se revierte por el GGPP y el mevalonato, pero no por el FPP.

| Simv (µM) 48h | AV/IP ^{-/-} | AV/IP ^{+/-} | AV/IP ^{+/+} | AV/IP ^{-/+} |
|---------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| C | 68,25 | 14,95 | 11,80 | 1,85 |
| 1 | 59,05 | 23,30 | 15,95 | 1,70 |
| 3 | 39,00 | 38,30 | 21,10 | 1,65 |
| 10 | 22,13 | 37,27 | 38,20 | 2,35 |
| 30 | 10,40 | 38,90 | 48,40 | 2,30 |
| 100 | 29,54 | 27,85 | 37,90 | 5,55 |
| 10Sv + Mev | 53,60 | 30,10 | 15,40 | 1,00 |
| 10Sv + GGPP | 53,50 | 28,00 | 17,00 | 1,80 |
| 10Sv + FPP | 26,60 | 44,70 | 27,00 | 1,80 |
| 10 Sv + GGPP + FPP | 46,00 | 37,20 | 13,60 | 0,90 |
| FTI | 55,50 | 28,30 | 14,90 | 1,40 |
| GGTI | 0,60 | 45,50 | 53,90 | 1,00 |

Tabla 8. Incremento del porcentaje de células anexina V⁺/IP⁺ respecto a la situación control tras tratamiento con simvastatina y con GGTTI, pero no con FTI.

Resultados

Igualmente, la simvastatina incrementó el porcentaje de células anexina V⁺/IP⁺ de manera tiempo-dependiente en las líneas SW1353. Este efecto también fue revertido por el mevalonato tras 48 horas de tratamiento con 10 μ M de simvastatina (**Figura 31**). Este incremento fue del 26,52%, 49,72%, 132% y 141% al cabo de 12, 24, 36 y 48 horas, siendo completamente revertido con el mevalonato en este último tiempo de estudio (**Tabla 9**).

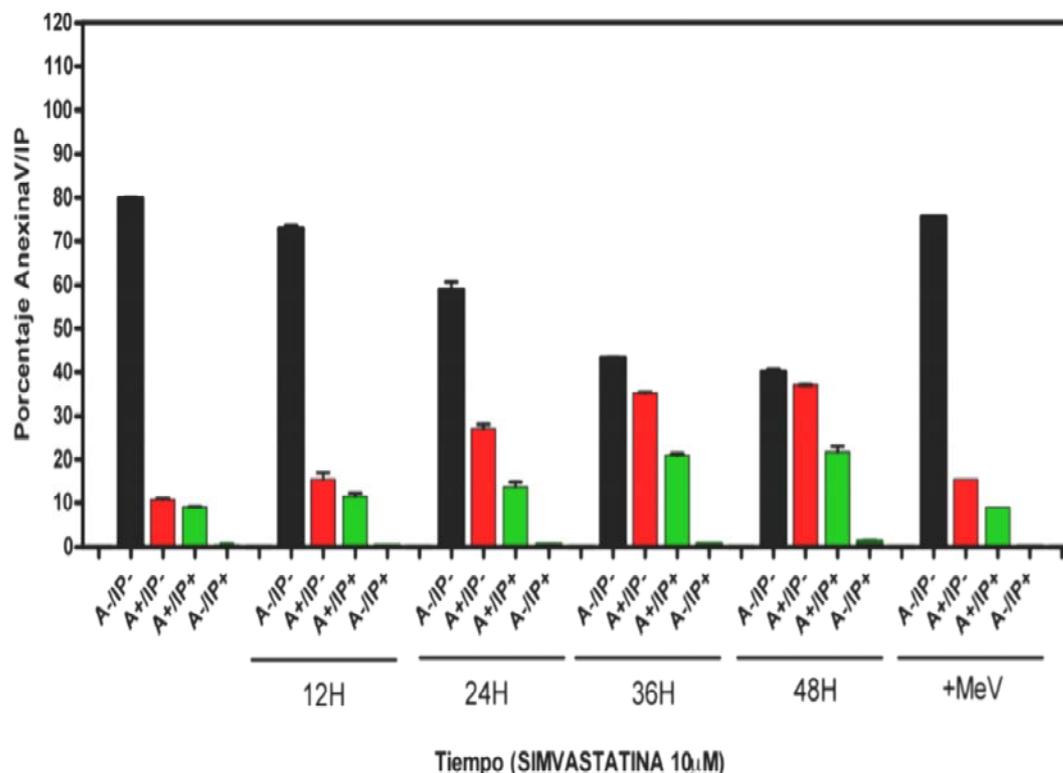


Figura 31. El incremento de la fracción de células anexina V⁺/IP⁺ tras el tratamiento con la simvastatina fue dependiente del tiempo en el que fueron tratadas las células.

| Simv (10 μ M) | AV/IP -/- | AV/IP +/- | AV/IP +/+ | AV/IP -/+ |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| C | 79,70 | 10,65 | 9,05 | 0,55 |
| 12 h | 72,75 | 15,50 | 11,45 | 0,30 |
| 24 h | 58,90 | 27,15 | 13,55 | 0,55 |
| 36 h | 43,20 | 35,25 | 21,00 | 0,65 |
| 48 h | 39,95 | 37,05 | 21,80 | 1,25 |
| 48 h + Mev | 75,50 | 15,50 | 9,00 | 0,10 |

Tabla 9. Incremento del porcentaje de células anexina V⁺/IP⁺ respecto a la situación control tras tratamiento con simvastatina y a lo largo de los diferentes tiempos de tratamiento.

3.- ESTUDIO DE LA EXPRESION PROTEICA.

Tras la extracción proteica total y analizar la expresión de la proteína RhoA, en comparación con el *housekeeping* gene β -actina, observamos como se produce un acúmulo de la forma no-isoprenilada de la proteína RhoA, cuando las células son tratadas con simvastatina. Este efecto se contrarresta tras la adición del mevalonato, y se observa igualmente cuando añadimos las estatinas lipofílicas, pero no cuando se tratan con la estatina hidrofílica pravastatina (**Figura 32**). En ninguna de estas situaciones experimentales se modificó la expresión de la β -actina.

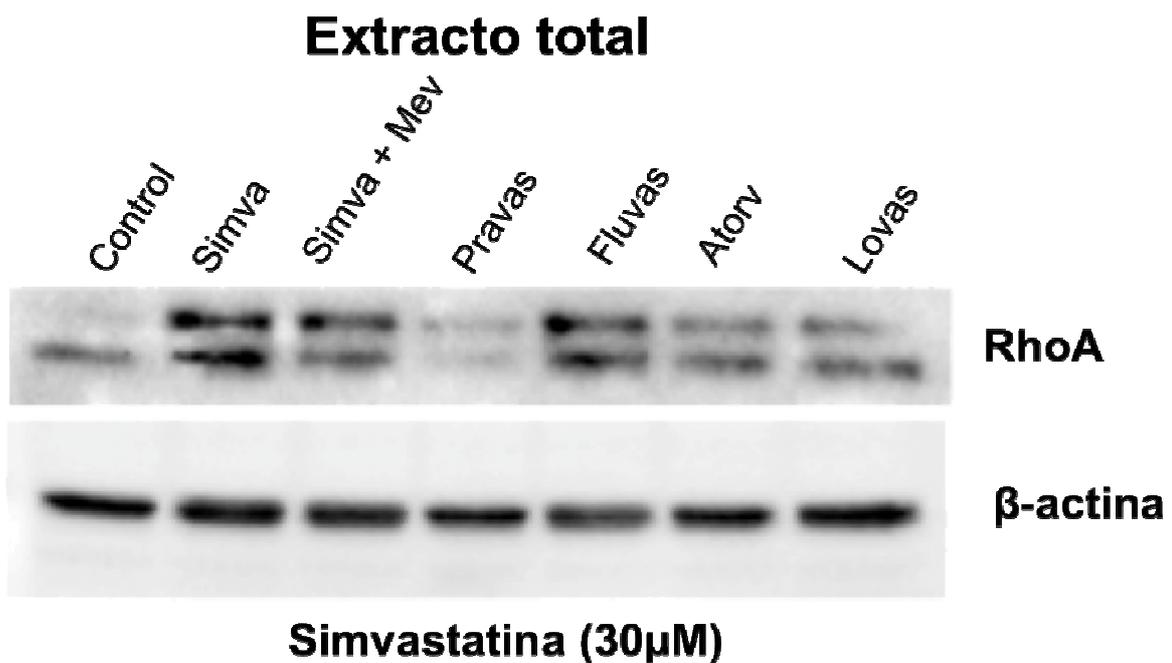


Figura 32. Acúmulo de la forma no isoprenilada de la proteína RhoA tras tratamiento con simvastatina. Este efecto es revertido por el mevalonato. Se produce igualmente con las estatinas lipofílicas, pero no con la hidrofílica (pravastatina).

Cuando se realizó el fraccionamiento subcelular, se observó como la expresión de la proteína RhoA era mayor en la fracción citosólica que en la membranal. Este hecho es indicativo de que la forma no isoprenilada de esta proteína es incapaz de quedarse anclada a la membrana celular y se delocaliza

a su posición citosólica. Este efecto se revirtió con el mevalonato y se mimetizó con el inhibidor de la prenil-transferasa GGTI. En ninguna de estas situaciones experimentales se modificó la expresión de la β -actina (**Figura 33**).

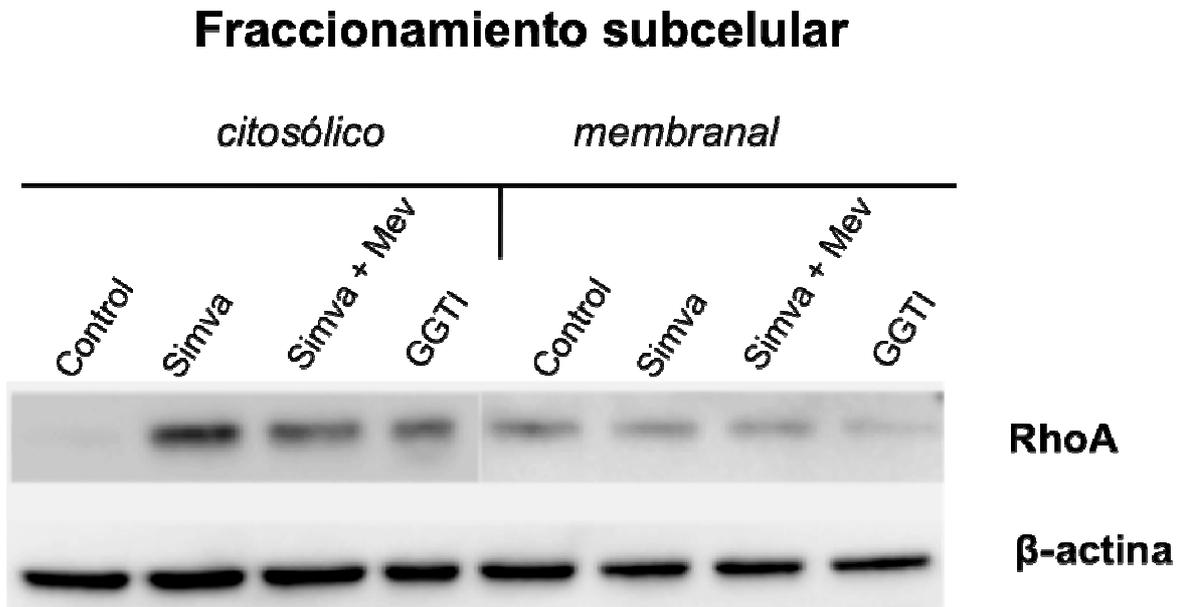


Figura 33. De-localización de la forma no isoprenilada de la proteína RhoA desde la membrana al citosol tras tratamiento con simvastatina. Este efecto fue revertido por el mevalonato y mimetizado por GGTI.

Por último, estudiando también la expresión de la proteína RhoA en las fracciones subcelulares citosólica y membranar, se observó que este efecto es también evidente para todas las estatinas lipofílicas, excepto nuevamente para la estatina hidrofílica pravastatina. En ninguna de estas situaciones experimentales se modificó la expresión de la β -actina (**Figura 34**).

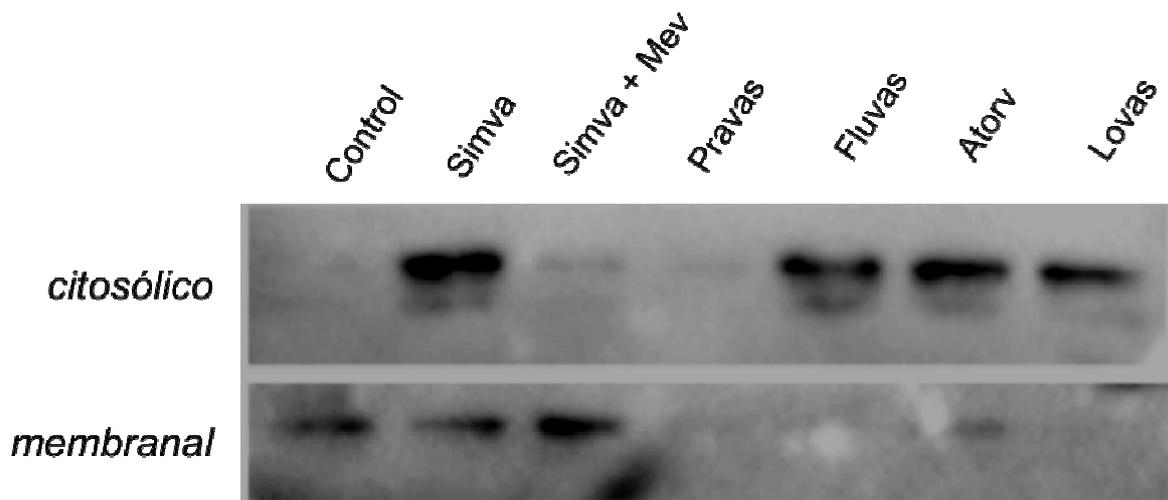
Fraccionamiento subcelular

Figura 34. De-localización de la forma no isoprenilada de la proteína RhoA desde la membrana al citosol tras tratamiento con simvastatina. Este efecto fue revertido por el mevalonato y se produce igualmente con las estatinas lipofílicas, pero no con la hidrofílica (pravastatina).

DISCUSIÓN

El condrosarcoma es un tumor maligno al que le ocurre lo que a muchos tumores óseos, en que los hallazgos físicos no ayudan mucho en el diagnóstico, salvo que el tumor sea muy grande y palpable. A este problema diagnóstico se le suma el que, hasta el presente, no se conocen tratamientos efectivos para este tumor, dado que es resistente a la radioterapia y a la quimioterapia. Por ello, la supervivencia en los condrosarcomas de alto grado malignidad no supera el 15% de los casos, debido a la aparición en el 70% de los pacientes de metástasis pulmonares. En el 30% de los casos se presentan recidivas a pesar de las grandes amputaciones a las que son sometidos los pacientes. A pesar de ello, este tipo de tratamiento tan agresivo es la única opción terapéutica en la actualidad. Esta resección quirúrgica, no siempre efectiva, condiciona una altísima morbi-mortalidad y en los casos en los que sobreviven, condicionan grandes y traumáticas amputaciones.

Por este motivo, y con el fin de obtener tratamientos eficaces en el tratamiento del condrosarcoma, se intentan identificar nuevas vías metabólicas que puedan ser explotadas terapéuticamente. Por esta razón, el desarrollo de drogas que puedan inhibir el crecimiento celular e inducir la muerte de la célula podría ser útil en el tratamiento de los condrosarcomas.

En esta Tesis Doctoral ideamos estudiar la acción *in vitro* de un grupo de drogas utilizadas desde hace varios años para reducir los niveles plasmáticos de colesterol, las estatinas, en el tratamiento de los condrosarcomas.

Desde el punto de vista clínico, el tratamiento hipocolesterolemizante con las estatinas está asociado con una reducción

de la formación de la placa arterioesclerótica y de la estabilización de la placa arterioesclerótica preexistente (Schartl y col., 2001). Sin embargo, estos beneficios clínicos de las estatinas no sólo están relacionados con la reducción de los niveles de colesterol séricos, sino con los llamados efectos pleitrópicos de estas drogas (Bellosta y col., 2000). Así, se sabe que a nivel vascular afecta los procesos inflamatorios que acontecen, a las alteraciones de la función endotelial y sobre el estrés oxidativo relacionado con la formación de la placa de ateroma (Werner y col., 2002); produciendo, además, una inhibición en la formación de trombos (Wolfovitz, 2005). Más allá de sus efectos cardiovasculares, el uso de estatinas se ha visto relacionado positivamente en la demencia, en la evolución del infarto cerebral, en la enfermedad de Alzheimer, en la esclerosis múltiple, en la osteoporosis, en la enfermedad renal crónica, en los transplantes, en la degeneración macular y en las enfermedades autoinmunes, por ejemplo (Wolfovitz, 2005).

Este efecto colateral de las estatinas se relaciona con la síntesis y la función de los lípidos isoprenoides farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP). Se sabe que el FPP y el GGPP interactúan con la familia de proteínas hidrófilas Ras uniéndose covalentemente a ellas. La lipofilicidad obtenida gracias a este complejo permite la interacción de la proteína Ras con las membranas celulares. La familia Ras, necesaria para la diferenciación y proliferación celular, y el crecimiento celular en el cáncer, igualmente, es habitualmente farnesilada. Sin embargo, un miembro de la familia de Ras, la proteína Rho, importante para la formación del citoesqueleto, y la progresión de crecimiento de las células, es normalmente geranilgeranilada. Otras

proteínas también geranilgeraniladas incluyen las proteínas Rab, necesarias para el transporte de vesículas dentro de la célula; la familia Rap, que desempeña un papel en la replicación celular, la activación plaquetaria y la generación de radicales de oxígeno; y las proteínas G, necesarias en el proceso de transducción de señales (Faggiotto y Paoletti, 1999).

Cada vez son más los estudios que identifican a las estatinas como posibles agentes quimioterapéuticos en la terapia y/o prevención del cáncer (Mo y Elson, 2004; Hindler et al., 2006) a través de sus interacciones con funciones celulares esenciales, como es el caso del crecimiento de la células tumorales (Sumi y col., 1992). Además, se han identificado estos efectos pleiotrópicos con cambios en la célula cancerígena relacionados con la proliferación celular, diferenciación, supervivencia, morfología celular, motilidad e inducción de apoptosis (Jakóbisiak y Golab, 2003). Por otro lado, dentro de su capacidad antitumoral hay que destacar los efectos anti-angiogénicos al disminuir la producción de factores de crecimiento endoteliales (Holash y col., 1999); al inhibir la formación de tubos capilares (Vincent y col., 2001; Park y col., 2002); al inhibir la proliferación-migración de las células endoteliales; y al inducir la apoptosis de estas células vasculares (Dulak y Józkwicz, 2005).

Varios efectos han sido descritos tras la inhibición de la síntesis de FPP y GGPP por las estatinas en las células tumorales, como la potenciación del efecto apoptótico, la disminución de la proliferación celular, y la disminución de la invasividad.

Así, en relación con la apoptosis, Dimitroulakos describe que la

lovastatina induce apoptosis en células de leucemia mieloide aguda, pero no en los progenitores normales de la médula ósea con dosis que pueden alcanzarse in vivo (Dimitroulakos y col., 1999). En líneas celulares del sarcoma de Ewing CHP-100 el análisis de *microarrays* de ADN confirmó que la lovastatina altera el programa de la expresión génica, y, tras la diferenciación morfológica, las células sufrieron apoptosis rápidamente (Kim y col., 2000).

Por otro lado, en relación con el ciclo celular y la proliferación celular, el fallo en la geranilgeranilación de proteínas del citoesqueleto, como las proteínas Rho, es el evento molecular más probable en la inhibición de la progresión del ciclo celular. En este sentido, la inhibición de la síntesis de los isoprenoides, pero no del colesterol, por las estatinas disminuyó la síntesis de ADN inducida de PDGF e inhibe la proliferación celular mediante la detención del ciclo celular entre la fase de transición G1/S. Algunos autores piensan que este efecto es mediado por la acción de la vía $p21^{WAF1/CIP1}/p53/E2F$ (Lee y col., 1998; Rao y col., 1998). Sin embargo, otros autores encuentran que la inhibición del ciclo celular por las estatinas es independientemente de esta vía (Rao y col., 1998). Una vía alternativa sugerida por algunos autores, es a través de la vía de p73, independiente de p53 /E2F (Park y col., 2002)

Respecto a la acción sobre la invasividad, se sabe que el cambio más deletéreo durante la progresión del cáncer es el cambio de un tumor con crecimiento localizado a una forma metastásica (Clark, 2000). En este sentido, se sabe que las estatinas están implicados en la modificación de las proteínas del citoesqueleto involucradas en la migración celular, aumentando con ello la motilidad celular a través de la

acción de RhoA (Matsumoto, 2001), con una alteración concomitante de la función quimiotáctica. Por otro lado, algunos autores sugieren que otra acción antitumoral de las estatinas se relaciona con la inhibición de la degradación de la matriz extracelular (Denoyelle y col., 2001) y sobre la disminución de su capacidad invasiva. En este sentido se ha demostrado que el nivel de expresión de RhoA en los tumores es varias veces superior a la del tejido normal circundante (Clark, 2000). Además, el tratamiento de los animales portadores de tumor con inhibidores de la HMG-CoA reductasa ha demostrado que disminuye la metástasis de pulmón de células de melanoma de ratón B16F10 (Jani y col., 1993); de las células de cáncer de mama del ratón (Alonso y col., 1998); de las metástasis en ganglios linfáticos de las células de linfoma de rata (Matar y col., 1999); y la metástasis hepáticas de las células del cáncer de colon de ratón (Mehta y col., 1998).

A lo largo de los años han ido aumentando el número de estudios en los que se evalúa la potencial acción de las estatinas como posibles agentes quimioterapéuticos en la terapia y/o prevención del cáncer (Mo y Elson, 2004; Hindler y col., 2006; Osmak, 2012; Thurnher y col., 2012; Zeichner y col., 2012; Clendening y Penn, 2012; Gronich y Rennert, 2013). Es importante el uso de estos fármacos ya que la inhibición de la síntesis de isoprenoides por las estatinas es un paso esencial en la regulación de la proliferación celular y en la apoptosis (Joo y Jetten, 2010).

Se sabe que la depleción de los lípidos isoprenoides, fundamentalmente el GGPP producida por la inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa, es el principal mecanismo que regula la muerte

celular en líneas celulares tumorales después de la exposición a las estatinas (Cafforio y col., 2005; Rattan y col., 2006). Esta inhibición en la síntesis endógena de los lípidos isoprenoides resulta usualmente en modificaciones en los procesos de isoprenilación, y por tanto, de modificaciones post-traslacionales en ciertas proteínas que, a su vez, inhiben la activación de diferentes proteínas efectoras que intervienen en los procesos de señalización celular. Generalmente, estas proteínas que sufren modificaciones post-traslacionales pertenecen a la familia de proteínas Rho y K-Ras y son denominadas pequeñas GTPasas (Jani y col., 1993; Denoyelle y col., 2001; Kusama y col., 2001).

Son numerosos los estudios aparecidos en los últimos años que demuestran el efecto de estos fármacos tanto en tumores sólidos (Beales y col., 2013; Park y col., 2013; Singh y Singh, 2013; Singh y col., 2013; Liu y col., 2014; Lytras y col., 2014; Yeganeh y col., 2014) como hematológicos (Qi y col., 2013; van Besien y col., 2013; Chae y col., 2014; Song y col., 2014). En todos casos se ha observado un retardo en el crecimiento tumoral y/o la inhibición del procesos metastático (Jakóbisiak y Golab, 2003). Adicionalmente, varios ensayos clínicos estudian actualmente la actividad antitumoral de las estatinas (Thibault y col., 1996; Larner y col., 1998; Dimitroulakos y col., 2001; Minden y col., 2001; Knox y col., 2005).

Sin embargo, no existen referencias sobre el uso de las estatinas en los condrosarcomas, razón por la que decidimos estudiar en este tipo tumoral su acción sobre los fenómenos apoptóticos inductores de muerte celular tumoral.

Por todo ello, el presente trabajo que presentamos como Tesis

Doctoral ha mostrado que las estatinas lipofílicas simvastatina, lovastatina, atorvastatina y fluvastatina, pero no la estatina hidrofílica pravastatina, tras inhibir a la enzima HMG-CoA reductasa, inhiben la viabilidad celular de las líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422 y la humana SW1353, además, de provocar la muerte celular por apoptosis de las mismas. Asociado a estos fenómenos, estos efectos de las estatinas lipofílicas en estas líneas de condrosarcoma mostraron una dependencia de RhoA, al alterarse su isoprenilación y delocalizarse de su posición membranal hacia la citosólica.

En diferentes líneas celulares tumorales, como el cáncer de próstata, el carcinoma gástrico, el carcinoma pancreático, el adenocarcinoma de colon, el neuroblastoma, el glioblastoma, el mesotelioma, el melanoma y las células de la leucemia mieloide aguda ya ha sido mostrado por otros autores una inhibición de la viabilidad celular tras ser tratadas con estatinas (Sumi y col., 1992; Newman y col., 1997; Bouterfa y col., 2000; Kim y col., 2000). Sin embargo, en tumores de estirpe mesenquimal sólo hay datos consistentes en líneas celulares de osteosarcoma de rata. Recientemente se ha descrito que la simvastatina disminuye la viabilidad celular e induce apoptosis en la línea de osteosarcoma de rata UMR-106 (Sandoval-Usme y col., 2014). En los resultados que presentamos en la presente Tesis Doctoral demostramos que las estatinas ejercen un efecto deletéreo *in vitro* sobre la viabilidad celular de los condrosarcomas.

Nuestros resultados demuestran una inhibición de la viabilidad celular en las líneas celulares de condrosarcoma de rata LTC y C422 tras ser estimuladas con FBS al 10% para favorecer el crecimiento y la

proliferación celular (Nagata, 1997). Este efecto fue independientemente de las características fenotípicas del tipo celular estudiado y, además, fue dependiente de la dosis y del tiempo durante el cual fueron tratadas las células. Así, por ejemplo, se observó que con la dosis de 10 μM de simvastatina la línea celular de rata C422 mostró mayor eficacia al cabo de 48 horas de tratamiento que en la línea celular de rata LTC; aunque la IC_{50} para las células C422 fue de 0.95 μM y para las LTC fue de 2.10 μM . En este sentido se sabe que a la concentración plasmática de 0.10 a 3.92 μM (24 mg/kg/día) corresponde a un rango de dosis que produce la apoptosis *in vitro* en diferentes tipos tumorales sensibles a estas drogas (Dimitroulakos y col., 1999; Dimitroulakos y col., 2001), estando en nuestro modelo en concordancia con estas observaciones. La IC_{50} media para las células C422 y para las LTC estuvo en torno 1.5 μM , mientras que en las células controles NIH3T3 fue de 4,75 (3 veces superior). Así mismo, otros autores han observado que las células normales parecen ser más resistentes a los efectos antiproliferativos de las estatinas que las células tumorales (Dimitroulakos y col., 2001; Kusama y col., 2001). En nuestros resultados llegamos a la misma conclusión, al observar como la viabilidad celular prácticamente no sufrió cambio alguno cuando se trataron los fibroblastos NIH3T3 y las células condroblásticas sanas, demostrándose con ello una mayor selectividad de la droga en las células tumorales del condrosarcoma.

Otros autores, como Dimitroulakos y Newman (Newman y col., 1997; Dimitroulakos y col., 1999) ya apoyaron antes la hipótesis del efecto selectivo de las estatinas sobre células transformadas. Este dato parece estar también en correlación con los datos experimentales que

muestran mayor eficacia pro-apoptótica de las estatinas fundamentalmente en las células que están activamente proliferando (Han y Wyche, 1996; Park y col., 1999; Kim y col., 2000; Marom y col., 1994). Esto hace que este efecto apoptótico tenga mayor selectividad en las células tumorales que en las células sanas.

Es importante destacar que la adición del mevalonato, producto de la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa, previno el efecto inhibitorio de la viabilidad celular tal y como otros autores ya habían informado previamente (Soma y col., 1992). Ello prueba que el efecto de estas drogas es dependiente específicamente de esta vía metabólica. Respecto a la capacidad de los lípidos isoprenoides FPP y GGPP para revertir el efecto de las estatinas, está claro que la acción es fundamentalmente dependiente del GGPP, resaltando con ello los fenómenos de geranilgeranilación como responsables de los efectos terapéuticos de las estatinas.

Este efecto sobre la viabilidad celular en células de condrosarcoma de rata fue igualmente confirmado en la línea de condrosarcoma humano SW1353, comprobándose, al igual que en el caso de la rata, que este efecto fue tiempo y dosis dependiente, que fue contrarrestado por los miembros de la vía del mevalonato, esencialmente por este último y por el GGPP; y, un dato muy importante, es que este efecto sólo se produjo con la estatinas lipofílicas y no con las hidrofílicas, como la pravastatina.

Diversos trabajos han mostrado que las estatinas inducen apoptosis a nivel experimental en diferentes modelos tumorales, como es el caso de la leucemia mono-mielocítica juvenil; en tumores el rabdo-

miosarcoma; en el meduloblastoma; en el mesotelioma maligno; en el astrocitoma; o en los carcinomas de células escamosas de cérvix, o de cabeza y cuello (Rubins y col., 1998; Bouterfa y col., 2000; Dimitroulakos y col., 2001; Dimitroulakos y col., 2002). En nuestro modelo, hemos demostrado que la simvastatina induce apoptosis en células de condrosarcoma de rata y humano, al observar una pérdida del anclaje celular al sustrato; al generarse cuerpos apoptóticos, al redondearse la célula y constreñirse el citoplasma; al producirse la fragmentación internucleosomal del ADN, característica de los procesos apoptóticos; y, por último, al producirse los cambios en el perfil de la citometría de flujo con Anexina-V y ioduro de propidio característicos de la apoptosis. Además, otro aspecto muy interesante de este trabajo, es que la apoptosis inducida en las células de condrosarcoma tras ser tratadas con estatinas sólo fue evidente cuando la estatina usada tenía características lipofílicas, pero no siendo sensibles a las hidrofílicas, como la pravastatina.

En esta Tesis hemos demostrado, además, que los cambios apoptóticos inducidos por las estatinas se pueden revertir con mevalonato, lo cual indica que esta vía metabólica resulta imprescindible para la supervivencia celular de los condrosarcomas. Este mismo fenómeno ha sido observado por otros autores, los cuales han mostrado que la depleción de mevalonato es responsable de la apoptosis inducida por las estatinas (Xia y col., 2001). De todos los metabolitos que intervienen en esta vía metabólica, las evidencias científicas parecen demostrar que el único lípido isoprenoide capaz de inhibir la apoptosis tras ser tratadas con las estatinas es el GGPP, tal como ha sido defendido

por algunos autores (Marcelli y col., 1998; Agarwal y col., 1999; Xia y col., 2001).

En concordancia con esta hipótesis, en nuestros resultados se demuestra que el GGPP previene la apoptosis inducida por simvastatina con mayor efectividad que el FPP, tal como ha sido observado por otros autores (Marcelli y col., 1998; Agarwal y col., 1999; Xia y col., 2001). Esto nos indica que la geranylgeranilación juega un papel crítico en los mecanismos de supervivencia de algunas células tumorales. Ahondando más en este aspecto, este hecho ha sido confirmado por otros autores usando inhibidores específicos de la geranylgeranil transferasa, como es el GGTI. Así, similares resultados se han observado experimentalmente al demostrarse que el GGTI es más potente que la lovastatina para producir apoptosis, mientras que este efecto fue más pobre cuando se añadía FTI (Xia y col., 2001). De igual manera, nuestros resultados demuestran que GGTI, mimetizando la acción de la simvastatina, fue más eficiente que el FTI para inducir apoptosis en las células de condrosarcoma humano. Ello, de nuevo, recalca el papel esencial de la geranylgeranilación en estos fenómenos observados en los condrosarcomas. Aunque no sabemos bien por qué la geranylgeranilación es más importante que la farnesilación de proteínas en la supervivencia celular, ya que aproximadamente sólo entre el 0,5% y el 1% de todas las proteínas celulares están geranylgeraniladas, y sólo un pequeño número de ellas han sido debidamente identificadas (Prendergast y col., 2000). Entre estas proteínas destacan las GTPasas de pequeño tamaño K-Ras y N-Ras, así como la familia de proteínas Rho. En base a este hecho, una hipótesis para demostrar que la disminución de la viabilidad celular y la inducción

de apoptosis tumoral de los condrosarcomas podría ser debido a que la depleción de este lípido isoprenoide provoca una inadecuada localización subcelular de estas proteínas geranilgeraniladas, (Cafforio y col., 2005). Se sabe que la prenilación de determinadas proteínas permite su localización en la membrana celular, lo cual condiciona su activación y la puesta en marcha de una respuesta celular en cascada (Van Aelst y D'Souza-Schorey, 1997). Como se ha dicho anteriormente, determinados integrantes de las GTPasas Ras y Rho son las principales proteínas modificadas post-translacionalmente por mecanismos de isoprenilación y, por tanto, son las principales dianas para los procesos inhibitorios de las estatinas (Liao, 2002).

En consecuencia con lo dicho, nuestros resultados mostraron un aumento en los niveles de expresión de la proteína total RhoA cuando las células fueron tratadas con la simvastatina. Este resultado no significa que aumente la expresión de RhoA debido al tratamiento con la simvastatina, sino que estos cambios en la expresión de RhoA a nivel post-traslacional disminuyen la degradación de RhoA, produciendo un acúmulo en los niveles proteicos de su forma no isoprenilada, tal como fue demostrado por Stamatakis en 2002 (Stamatakis y col., 2002). La acción de la estatina fue contrarrestada por el co-tratamiento con mevalonato, demostrando de nuevo la implicación de esta vía metabólica en este efecto. Además, fue observado que el efecto sobre RhoA tras el tratamiento con simvastatina se reprodujo de igual forma con el tratamiento con las otras estatinas lipofílicas (fluvastatina, atorvastatina y lovastatina), pero no con la estatina hidrofílica (pravastatina), indicando con ello la selectividad en la acción de este subtipo de estatinas.

Además, la acción de la simvastatina condujo a una delocalización de la proteína RhoA de su localización membranal hacia la localización citosólica. Este efecto fue contrareestado por el mevalonato; mimetizado por el inhibidor de la prenil-transferasa GGTI; y remedado por las estatinas lipofílicas (fluvastatina, atorvastatina y lovastatina), pero no por la estatina hidrofílica (pravastatina).

El condrosarcoma plantea un problema clínico muy importante ya que existen muy pocas opciones curativas. Por naturaleza, el condrosarcoma es quimio- y radio-resistente, y en un número importante de casos el tratamiento quirúrgico no es efectivo. Por ello, es prioritario encontrar algún tratamiento que ayude a controlar este tumor.

Una vía fundamental mediante al cual las células malignas se vuelven resistente a los fármacos anti-neoplásicos es evitar la apoptosis (Fulda, 2010), por lo que la identificación de compuestos moduladores de este proceso es clave a la hora de aumentar el arsenal terapéutico.

En nuestros experimentos, las estatinas indujeron una disminución de la viabilidad en las células de condrosarcoma, pero no en las de cartílago no-tumorales, asociado a una inducción de un proceso de muerte celular por apoptosis. Creemos que estos resultados ofertan una alternativa en el tratamiento de los condrosarcoma, ya que, en primer lugar, abre una nueva vía de investigación terapéutica en un tumor con pocas o nulas opciones curativas. En segundo lugar, las estatinas son fármacos con los que existe gran experiencia de uso, por lo que, su farmacocinética, farmacodinamia y seguridad son bien conocidos, no representando, por tanto, un inconveniente para la investigación. Por último, en tercer lugar, es interesante destacar que las estatinas (al

contrario que los antineoplásicos habituales) no afectan negativamente la función de las células no tumorales, y por tanto son de esperar menos efectos secundarios con su administración.

En conclusión, este trabajo de investigación ha respondido a las hipótesis y objetivos planteados acerca del efecto que ejercen las estatinas, en un modelo tumoral de células de condrosarcoma. Así, se ha observado en nuestro modelo celular, que son capaces de inhibir la viabilidad celular y de provocar su muerte mediada por apoptosis. Estos efectos son articulados a través de la ruta de síntesis del mevalonato, aunque de forma selectiva por las estatinas lipofílicas y no por las hidrofílicas, a través de la inactivación de las proteínas RhoA. A pesar de ello, se necesitan más estudios que nos permitan evaluar la importancia de la aplicación terapéutica de este tipo de drogas en el tratamiento de los condrosarcomas.

CONCLUSIONES

1.- Las estatinas inducen *in vitro* disminución de la viabilidad celular en las células de condrosarcoma.

2.- La disminución de la viabilidad celular inducida por las estatinas no depende de la especie tratada, ya que se reproduce tanto en las líneas de condrosarcoma de rata LTC y C422 como en la de condrosarcoma humano SW1353.

3.- La acción antitumoral *in vitro* de las estatinas sobre los condrosarcomas tiene mayor selectividad en las células tumorales que en las células no tumorales.

4.- La disminución de la viabilidad celular *in vitro* inducida por las estatinas en los condrosarcomas es dependiente de la vía del mevalonato.

5.- La disminución de la viabilidad celular dependiente de la vía del mevalonato es esencialmente debido a la ausencia de GGPP.

6.- La disminución de la viabilidad *in vitro* provocada por las estatinas es un efecto farmacológico tipo clase observable sólo con las estatinas lipofílicas (simvastatina, lovastatina, atorvastatina y fluvastatina), pero con las hidrofílicas (pravastatina).

7.- Las estatinas inducen in vitro inducción de apoptosis celular en las líneas celulares de condrosarcoma.

8.- La apoptosis inducida por las estatinas no depende de la especie tratada, ya que se reproduce tanto en las líneas de condrosarcoma de rata LTC y C422 como en la de condrosarcoma humano SW1353.

9.- La inducción de apoptosis celular in vitro inducida por las estatinas en los condrosarcomas es dependiente de la vía del mevalonato.

10.- El efecto apoptótico inducido por las estatinas es dependiente de la vía del mevalonato, revertido tras añadir GGPP y mimetizado por la acción inhibidora de GGTI.

11.- La apoptosis in vitro inducida por las estatinas es un efecto farmacológico tipo clase observable sólo con las estatinas lipofílicas (simvastatina, lovastatina, atorvastatina y fluvastatina), pero con las hidrofílicas (pravastatina).

12.- Las estatinas provocan acúmulo de la forma no isoprenilada de la proteína geranylgeranilada RhoA.

13.- La acumulación de la proteína RhoA es dependiente de la vía del mevalonato y sólo es producida por las estatinas lipofílicas (simvastatina, lovastatina, atorvastatina y fluvastatina), pero por las hidrofílicas (pravastatina).

14.- El tratamiento con las estatinas provoca una delocalización de la proteína RhoA desde la fracción membranal a la citosólica, que es dependiente de la vía del mevalonato y es mimetizado por GGTI.

15.- El efecto sobre la delocalización de RhoA lo provocaron las estatinas lipofílicas (simvastatina, lovastatina, atorvastatina y fluvastatina), pero por las hidrofílicas (pravastatina).

BIBLIOGRAFIA

- Aigner T, Müller S, Neureiter D, Illstrup DM, Kirchner T, Björnsson J** (2002). Prognostic relevance of cell biologic and biochemical features in conventional chondrosarcomas. *Cancer*; 94:2273–2281.
- Agarwal B, Rao CV, Bhendwal S, Ramey WR, Shirin H, Reddy BS, Holt PR.** (1999). Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology*; 117: 838–847.
- Agarwal B, Bhendwal S, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR** (1999). Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*; 5: 2223-9.
- Akiyama H, Furukawa S, Wakisaka S, Maeda T** (2006). Cartducin stimulates mesenchymal chondroprogenitor cell proliferation through both extracellular signal regulated kinase and phosphatidylinositol 3kinase/Akt pathways. *FEBS J*; 273:2257–2263.
- Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Albers-Schonberg G, Hensens O, Hirshfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J** (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 77:3957-61.
- Alegret M, Silvestre JS** (2006). Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2006; 28:627-56.
- Alonso DF, Farina HG, Skilton G, Gabri MR, De Lorenzo MS, Gomez DE** (1998). Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast Cancer Res Treat*; 50:83-93

- Aspenström P, Fransson A, Saras J** (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*; 377(Pt 2):327-37.
- Aznar S, Lacal JC** (2001a). Searching new targets for anticancer drug design: the families of Ras and Rho GTPases and their effectors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; 67:193-234.
- Aznar S, Lacal JC** (2001b). Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett*; 165(1):1-10.
- Beales IL, Hensley A, Loke Y** (2013). Reduced esophageal cancer incidence in statin users, particularly with cyclo-oxygenase inhibition. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. Aug 6; 4:69-79.
- Bellosta S, Ferri N, Arnaboldi L, Bernini F, Paoletti R, Corsini A** (2000). Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes. *Diabetes Care*; 23 Suppl 2:B72-8.
- Bergh P, Gunterberg B, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG** (2001). Prognostic Factors and Outcome of Pelvic, Sacral, and Spinal Chondrosarcomas. *Cancer*; 91:1201-12.
- Bishop AL, Hall A** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*; 348 Pt 2:241-55.
- Bouterfa HL, Sattelmeyer V, Czub S, Vordermark D, Roosen K, Tonn JC** (2000). Inhibition of Ras farnesylation by lovastatin leads to downregulation of proliferation and migration in primary cultured human glioblastoma cells. *Anticancer Res*; 20:2761-7.
- Brenner W, Conrad EU, Eary JF** (2004). FDG PET imaging for grading and prediction outcome in chondrosarcoma patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*; 31:189-195.

- Brown MS, Goldstein JL** (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*; 232:34-47.
- Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F** (2005). Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis*; 26:883-91.
- Chae YK, Trinh L, Jain P, Wang X, Rozovski U, Wierda WG, Keating MJ, Estrov Z** (2014). Statin and aspirin use is associated with improved outcome of FCR therapy in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 27; 123: 1424-6.
- Chow WA** (2007). Update on Chondrosarcomas. *Curr Opin Oncol*; 19:371-376.
- Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO.** (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 406: 532-535.
- Clendening JW, Penn LZ.** (2012). Targeting tumor cell metabolism with statins. *Oncogene*. 29; 31: 4967-78.
- Curado. M. P., Edwards, B., Shin. H.R., Storm. H., Ferlay. J., Heanue. M. and Boyle. P., eds** (2007). *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX.* IARC Scientific Publications No. 160, Lyon, IARC.
- Denoyelle C, Vasse M, Körner M, Mishal Z, Ganné F, Vannier JP, Soria J, Soria C.** (2001). Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis*; 22:1139-48.
- Dimitroulakos J, Nohynek D, Backway KL, Hedley DW, Yeger H, Freedman MH, Minden MD, Penn LZ** (1999). Increased sensitivity of acute myeloid leukemias to lovastatin-induced apoptosis: A potential therapeutic approach. *Blood*; 93:1308-18.

- Dimitroulakos J, Ye LY, Benzaquen M, Moore MJ, Kamel-Reid S, Freedman MH, Yeger H, Penn LZ.** (2001). Differential sensitivity of various pediatric cancers and squamous cell carcinomas to lovastatin-induced apoptosis: therapeutic implications. *Clin Cancer Res*; 7:158-67.
- Dimitroulakos J, Marhin WH, Tokunaga J, Irish J, Gullane P, Penn LZ, Kamel-Reid S.** (2002). Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia*; 4:337-46.
- Dorfman HD, Czerniak B** (1998). En: "Bone tumors". St. Louis. MO: Mosby, Inc.; pp. 353-440.
- Dulak J, Józkwicz A.** (2005). Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*; 5:579-94.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y.** (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*; 57: 1835-40.
- Endo A, Kuroda M, Tanzawa K** (1976). Competitive inhibition of 3 hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*; 72:323-6.
- Endo M, Matsumura T, Yamaguchi T, Yamaguchi U, Morimoto Y, Nakatani F, Kawai A, Chuman H, Beppu Y, Shimoda T, Hasegawa T.** (2006). Cyclooxygenase-2 overexpression associated with a poor prognosis in chondrosarcomas. *Hum Pathol*; 37: 471-6.
- Faggiotto A, Paoletti R.** (1999). State-of-the-Art lecture. Statins and blockers of the renin-angiotensin system: vascular protection beyond their primary mode of action. *Hypertension*; 34: 987-96.

- Fiorenza F, Abudu A, Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM, Ayoub K, Mangham DC, Davies AM** (2002). Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone. *J Bone Joint Surg [Br]*; 84B: 93-9.
- Forscher CA, Casciato DA** (2000). En: "Manual of Clinical Oncology". 4ª Edición. Editores: Dennis A. Casciato y Barry B. Lowitz. Lippincott Williams & Wilkins, Pág. 354.
- Fransson A, Ruusala A, Aspenström P** (2003). Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem*; 278:6495-502.
- Fulda S** (2010). Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *Int J Cell Biol*; 18.
- Gelderblom H, Hogendoorn P C.W., Dijkstra SD, Van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiau AHM, Bovée J V.M.G** (2008). The clinical approach towards chondrosarcoma. *The Oncologist*; 13:320-329.
- Gerschenson LE, Rotello RJ** (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *Faseb J*; 6:2450-5.
- Goldstein JL, Brown MS** (1984). Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res*; 25:1450-61.
- Goldstein JL, Brown MS** (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*; 343:425-30.
- Gronich N, Rennert G** (2013). Beyond aspirin-cancer prevention with statins, metformin and bisphosphonates. *Nat Rev Clin Oncol*; 10: 625-42.
- Han Z, Wyche JH** (1996). Lovastatin induces apoptosis in metastatic ovarian cell line. *Cell Death Differ*; 3: 223-228.
- Hindler K, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD** (2006). The role of statins in cancer therapy. *Oncologist*; 11:306-15.

- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ** (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*; 284:1994-8.
- Hudson TH, Moser RP Jr, Gilkey FW, Aoki J** (1990). Chondrosarcoma. In: Moser RP Jr, *ed.* Cartilaginous tumors of the skeleton. Philadelphia, Pa: Hanley & Belfus; 155–205.
- Jakóbisziak M, Golab J.** (2003). Potential antitumor effects of statins. *Int J Oncol*; 23:1055-69.
- Kim JS, Pirnia F, Choi YH, Nguyen PM, Knepper B, Tsokos M, Schulte TW, Birrer MJ, Blagosklonny MV, Schaefer O, Mushinski JF, Trepel JB.** (2000). Lovastatin induces apoptosis in a primitive neuroectodermal tumor cell line in association with RB down-regulation and loss of the G1 checkpoint. *Oncogene*; 19: 6082–6090.;
- Jang J-H, Chung C-P** (2005). Tenascin-C promotes cell survival by activation of Akt in human chondrosarcoma cell. *Cancer Lett*; 229:101–105.
- Jani JP, Specht S, Stemmler N, Blanock K, Singh SV, Gupta V, Katoh A.** (1993). Metastasis of B16F10 mouse melanoma inhibited by lovastatin, an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Invasion Metastasis*; 13:314-24.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ.** (2006). Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*; 56:106–130.
- Joo JH, Jetten AM** (2010). Molecular mechanisms involved in farnesolinduced apoptosis. *Cancer Lett*; 287: 123.
- Kim SI, Kim HJ, Han DC, Lee HB.** (2000). Effect of lovastatin on small GTP binding proteins and on TGF-beta1 and fibronectin expression. *Kidney Int Suppl*; 77:S88-92.

- Knox JJ, Siu LL, Chen E, Dimitroulakos J, Kamel-Reid S, Moore MJ, Chin S, Irish J, LaFramboise S, Oza AM.** (2005). A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or of the cervix. *Eur J Cancer*; 41:523-30.
- Krochak R, Harwood AR, Cummings BJ, Quirt IC** (1983). Results of radical radiation for chondrosarcoma of bone. *Radiother Oncol*; 1:109-115.
- Kusama T, Mukai M, Iwasaki T, Tatsuta M, Matsumoto Y, Akedo H, Nakamura H** (2001). Inhibition of epidermal growth factor-induced RhoA translocation and invasion of human pancreatic cancer cells by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Cancer Res*; 61:4885-91.
- Larner J, Jane J, Laws E, Packer R, Myers C, Shaffrey M.** (1998). A phase I-II trial of lovastatin for anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Am J Clin Oncol*; 21:579-83.
- Lee SJ, Ha MJ, Lee J, Nguyen P, Choi YH, Pirnia F, Kang WK, Wang XF, Kim SJ, Trepel JB** (1998). Inhibition of the 3-hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase pathway induces p53 independent transcriptional regulation of p21^{WAF1/CIP1} in human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem*; 273:10618-23.
- Liao JK** (2002). Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest*; 110:285-8.
- Liao JK, Laufs U** (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 45:89-118.
- Liu Y, Qin A, Li T, Qin X, Li S.** (2014) Effect of statin on risk of gynecologic cancers: A meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *Gynecol Oncol.*; 133:647-655.

- Liu Y, Tang W, Wang J, Xie L, Li T, He Y, Deng Y, Peng Q, Li S, Qin X.** (2014). Association between statin use and colorectal cancer risk: a meta-analysis of 42 studies. *Cancer Causes Control.*; 25: 237-49.
- Lytras T, Nikolopoulos G, Bonovas S.** (2014). Statins and the risk of colorectal cancer: an updated systematic review and meta-analysis of 40 studies. *World J Gastroenterol.*; 20:1858-70.
- Maltese WA** (1990). Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells. *FASEB J*; 4: 3319-28.
- Marcelli M, Cunningham GR, Haidacher SJ, Padayatty SJ, Sturgis L, Kagan C, Denner L.** (1998). Caspase-7 is activated during lovastatin-induced apoptosis of the prostate cancer cell line LNCaP. *Cancer Res*; 58: 76-83.
- Marom M, Ben-Baruch G, Roitelman J, Kloog Y.** (1994). Lack of correlation between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and lovastatin resistance in nerve growth factor treated PC-12 cells. *Cell Mol Neurobiol*; 14: 119-132
- Matar P, Rozados VR, Binda MM, Roggero EA, Bonfil RD, Scharovsky OG** (1999). Inhibitory effect of Lovastatin on spontaneous metastases derived from a rat lymphoma. *Clin Exp Metastasis*; 17: 19-25.
- Matsumoto Y, Tanaka K, Harimaya K, Nakatani F, Matsuda S, Iwamoto Y.** (2001). Small GTP-binding protein, Rho, both increased and decreased cellular motility, activation of matrix metalloproteinase 2 and invasion of human osteosarcoma cell. *Jpn J Cancer Res.* 92: 429-438.
- Mehta N, Hordines J, Sykes D, Doerr RJ, Cohen SA** (1998). Low density lipoproteins and Lovastatin modulate the organ-specific transendothelial migration of primary and metastatic human colon adenocarcinoma cell lines *in vitro*. *Clin Exp Metastasis*; 16:58794.

- Minden MD, Dimitroulakos J, Nohynek D, Penn LZ.** (2001). Lovastatin induced control of blast cell growth in an elderly patient with acutemyeloblastic leukaemia. *Leuk Lymphoma*; 40:659-62.
- Mo H, Elson CE** (2004). Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)*; 229:567-85.
- Moghadasian MH** (1999). Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci*; 65:1329-37.
- Morgan MA, Ganser A, Reuter CW** (2003). Therapeutic efficacy of prenylation inhibitors in the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia*; 17:1482-98.
- Morrison C, Radmacher M, Mohammed N, Suster D, Auer H, Jones S, Riggenbach J, Kelbick N, Bos G, Mayerson J.** (2005). MYC amplification and polysomy 8 in chondrosarcoma: array comparative genomic hybridization, fluorescent in situ hybridization, and association with outcome. *J Clin Oncol*; 23:9369–9376.
- Mosmann T** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*; 65:55-63.
- Murphey MD, Flemming DJ, Boyea SR, Bojescul JA, Sweet DE, Temple HT** (1998). Enchondroma *versus* chondrosarcoma in the appendicular skeleton: differentiating features. *RadioGraphics*; 18:1213–1245.
- Murphey MD, Walker EA, Wilson AJ, Kransdorf MJ, Temple HT, Gannon FH** (2003). Imaging of Primary Chondrosarcoma: Radiologic-Pathologic Correlation. *RadioGraphics*; 23:1245–1278.
- Nagata S.** (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*; 88: 355-65.

- Newman A, Clutterbuck RD, Powles RL, Catovsky D, Millar JL** (1997). A comparison of the effect of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors simvastatin, lovastatin and pravastatin on leukaemic and normal bone marrow progenitors. *Leuk Lymphoma*; 24:533-7.
- O'Brien T, Babcock G, Cornelius J, Dingeldein M, Talaska G, Warshawsky D, Mitchell K.** (2000). A comparison of apoptosis and necrosis induced by hepatotoxins in HepG2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*; 164: 280-90.
- Osmak M.** (2012). Statins and cancer: current and future prospects. *Cancer Lett.*; 324:1-12.
- Papachristou DJ, Papachristou GI, Papaefthimiou OA, Agnantis NJ, Basdra EK, Papavassiliou AG.** (2005). The MAPK-AP-1/-Runx2 signalling axes are implicated in chondrosarcoma pathobiology either independently or via up-regulation of VEGF. *Histopathology*; 47:565-574.
- Papachristou DJ, Goodman MA, Cieply K, Hunt JL, Rao UN.** (2006). Comparison of allelic losses in chondroblastoma and primary chondrosarcoma of bone and correlation with fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Pathol*; 37:890-898.
- Park WH, Lee YY, Kim ES, Seol JG, Jung C W, Lee CC, Kim BK.** (1999). Lovastatin-induced inhibition of HL-60 cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis. *Anticancer Res*; 19: 3133-3140.
- Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L, Begley U, Tang D, Galper JB.** (2002). 3-hydroxyl-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res*; 91:143-50.

- Park HS, Schoenfeld JD, Mailhot RB, Shive M, Hartman RI, Ogembo R, Mucci LA.** (2013). Statins and prostate cancer recurrence following radical prostatectomy or radiotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.*; 24:1427-34.
- Park YH, Jung HH, Ahn JS, Im YH.** (2013). Statin induces inhibition of triple negative breast cancer (TNBC) cells via PI3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun.*; 439:275-9.
- Prendergast GC.** (2000). Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic mechanism and clinical prospects. *Curr Opin Cell Biol*; 12: 166–173.
- Qi XF, Zheng L, Lee KJ, Kim DH, Kim CS, Cai DQ, Wu Z, Qin JW, Yu YH, Kim SK** (2013). HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway. *Cell Death Dis.*; 4:e518.
- Radford IR.** (1986). Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*; 49: 611-20.
- Rao S, Lowe M, Herliczek TW, Keyomarsi K** (1998). Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53. *Oncogene*; 17:2393-402.
- Rattan R, Giri S, Singh AK, Singh I.** (2006). Rho/ROCK pathway as a target of tumor therapy. *J Neurosci Res*; 83:243-55.
- Rizzo M, Ghert MA, Harrelson JM, Scully SP** (2001). Chondrosarcoma of bone: analysis of 108 cases and evaluation for predictors of outcome. *Clin Orthop Relat Res*; 391:224-33.

- Rozeman LB, Szuhai K, Schrage YM, Rosenberg C, Tanke HJ, Taminiau AH, Cleton-Jansen AM, Bovée JV, Hogendoorn PC.** (2006). Array-comparative genomic hybridization of central chondrosarcoma. *Cancer*; 107:380–388.
- Rubins JB, Greatens T, Kratzke RA, Tan AT, Polunovsky VA, Bitterman P.** (1998). Lovastatin induces apoptosis in malignant mesothelioma cells. *Am J Respir Crit Care Med*; 157: 1616-22.
- Sandoval-Usme MC, Umaña-Pérez A, Guerra B, Hernández-Perera O, García-Castellano JM, Fernández-Pérez L, Sánchez-Gómez M.** (2014). Simvastatin impairs growth hormone-activated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway in UMR-106 osteosarcoma cells. *PLoS One*. Jan 29; 9(1).
- Schartl M, Bocksch W, Koschyk DH, Voelker W, Karsch KR, Kreuzer J, Hausmann D, Beckmann S, Gross M** (2001). Use of intravascular ultrasound to compare effects of different strategies of lipid-lowering therapy on plaque volume and composition in patients with coronary artery disease. *Circulation*; 104:387-92.
- Schmitz AA, Govek EE, Böttner B, Van Aelst L** (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*; 261: 1-12.
- Seabra MC** (1998). Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases. *Cell Signal*; 10:167-72.
- Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W.** (2013). Statins are associated with a reduced risk of hepatocellular cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*; 144:323-32.
- Singh PP, Singh S.** (2013). Statins are associated with reduced risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*; 24: 1721-30.

- Soma MR, Corsini A, Paoletti R** (1992). Cholesterol and mevalonic acid modulation in cell metabolism and multiplication. *Toxicol Lett*; 6465 Spec No: 1-15.
- Song X, Liu BC, Lu XY, Yang LL, Zhai YJ, Eaton AF, Thai TL, Eaton DC, Ma HP, Shen BZ.** (2014). Lovastatin inhibits human B lymphoma cell proliferation by reducing intracellular ROS and TRPC6 expression. *Biochim Biophys Acta*; 1843:894-901.
- Stamatakis K, Cernuda-Morollón E, Hernández-Perera O, Pérez-Sala D.** (2002). Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway. *J Biol Chem*; 277:49389-96.
- Sumi S, Beauchamp RD, Townsend CM Jr, Uchida T, Murakami M, Rajaraman S, Ishizuka J, Thompson JC** (1992). Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by lovastatin. *Gastroenterology*; 103:982-9.
- Tarnok A, Bocsi J, Brockhoff G.** (2006). Cytomics - importance of multimodal analysis of cell function and proliferation in oncology. *Cell Prolif*; 39: 495-505.
- Thibault A, Samid D, Tompkins AC, Figg WD, Cooper MR, Hohl RJ, Trepel J, Liang B, Patronas N, Venzon DJ, Reed E, Myers CE.** (1996). Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer Res*; 2:483-91.
- Thompson CB.** (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*; 267: 1456-62
- Thurnher M, Nussbaumer O, Gruenbacher G.** (2012). Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. *Clin Cancer Res*; 18: 3524-31.

- Tzortzidis F, Elahi F, Wright DC, Temkin N, Natarajan SK, Sekhar LN.** (2006). Patient outcome at long-term follow-up after aggressive microsurgical resection of cranial base chondrosarcomas. *Neurosurgery*; 58:1090–1097.
- Unni KK** (1998). Chondrosarcoma. En: *Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 11 087 cases*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Raven Publishers; pp. 71–108.
- van Aelst L, D'Souza-Schorey C** (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*; 11:2295-322.
- van Besien H, Sassano A, Altman JK, Platanias LC.** (2013). Anti-leukemic properties of 3-hydroxy3methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitors. *Leuk Lymphoma*; 54:2601-5.
- Varma DG, Ayala AG, Carrasco CH, Guo SQ, Kumar R, Edeiken J** (1992). Chondrosarcoma: MR Imaging with pathologic correlation. *Radiographics*; 12: 687-704.
- Vincent L, Chen W, Hong L, Mirshahi F, Mishal Z, MirshahiKhorassani T, Vannier JP, Soria J, Soria C.** (2001). Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMGCoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect. *FEBS Lett*; 495:159-66.
- Wennerberg K, Der CJ** (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*; 117:1301-12.
- Werner N, Nickenig G, Laufs U** (2002). Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol*; 97:105-16.
- Wolfowitz E** (2005). The pleiotropic effects of statins. *Harefuah.*; 144:577-82, 597.

- Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ.** (2002). HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*; 16: 508-19.
- Wood KA, Youle RJ.** (1994). Apoptosis and free radicals. *Ann N Y Acad Sci*; 738:400-7.
- Wyllie AH.** *Nature* (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation; 284: 555-6.
- Xia Z, Tan MM, Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ.** (2001). Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin- induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*; 15: 1398-1407.
- Yeganeh B, Wiechec E, Ande SR, Sharma P, Moghadam AR, Post M, Freed DH, Hashemi M, Shojaei S, Zeki AA, Ghavami S.** (2014). Targeting the mevalonate cascade as a new therapeutic approach in heart disease, cancer and pulmonary disease. *Pharmacol Ther.* Jul; 143: 87-110.
- Zeichner S, Mihos CG, Santana O.** (2012). The pleiotropic effects and therapeutic potential of the hydroxymethylglutaryl CoA reductase inhibitors in malignancies: a comprehensive review. *J Cancer Res Ther*; 8: 176-83.