



Regulación del aporte vascular en el Sarcoma de Ewing: Papel de la Caveolina-1

Miguel Guillermo Sáinz Jaspeado

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesis adscrita a la Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Programa de Doctorado en Biomedicina

Regulación del aporte vascular en el Sarcoma de Ewing: papel de la Caveolina-1

Miguel Guillermo Sáinz Jaspeado

Barcelona, 2012

Tesis adscrita a la Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona

Programa de Doctorado en Biomedicina

Regulación del aporte vascular en el Sarcoma de Ewing: papel de la Caveolina-1

Memoria presentada por Miguel Guillermo Sáinz Jaspeado para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Òscar Martínez Tirado en el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge

Òscar Martínez Tirado

Director

Miguel Guillermo Sáinz Jaspeado

Doctorando

ÍNDICE

Introducción

1. El Sarcoma de Ewing	7
1.1. Aspectos históricos	7
1.2. Epidemiología	8
1.3. Diagnóstico clínico	10
1.4. Tratamiento	11
1.5. Histología	12
1.6. Aspectos genéticos	13
1.7. Dianas transcripcionales	15
2. Caveolina-1	16
2.1. Las caveolas	17
2.2. El gen <i>CAV1</i>	18
2.3. La proteína CAV1	19
2.4. CAV1 y el Sarcoma de Ewing	22
3. El aporte vascular	22
3.1. Angiogénesis	25
3.2. Mimetismo Vascular	28
3.3. El aporte vascular en el Sarcoma de Ewing	29

Materiales y Métodos

1. Recursos generales y materiales	33
a. Equipos	33
b. Materiales	33
c. Kits	34
d. Reactivos	34
2. Líneas celulares	37
a. Cultivo	37
b. Revestimiento de placas	37
c. Contaje	38
d. Crio-conservación de líneas celulares	38
3. Recuperación y aislamiento de plásmidos	38
4. Transfecciones estables y selección de clones	39
5. Ensayo de estimulación con EfnA1	39
6. Ensayo de inhibición con inhibidores de AKT	40

7. Análisis de expresión proteica	40
a. Obtención de extractos proteicos totales	40
b. Medición de la concentración proteica	40
c. Análisis de expresión por Western blot	41
8. Ensayo de inmunoprecipitación	42
a. Obtención de extractos proteicos totales	42
b. Inmunoprecipitación	43
9. Ensayo de migración en Transwells	43
10. Ensayo de Formación Tubular en Matrigel	44
11. Ensayos <i>In vivo</i>	45
a. Mantenimiento de animales	45
b. Desarrollo de xenoinjertos	45
12. Análisis histológico	46
a. Tinción por Hematoxilina/Eosina	46
b. Análisis por Inmunohistoquímica	46
13. Inmunofluorescencia analizada por microscopía confocal	47
14. Análisis de expresión por RT-PCR	49
15. Análisis de muestras humanas	50
16. Análisis estadístico	50

Objetivos	53
------------------	----

Resultados

1. Confirmar que CAV1 es necesaria para la vascularización tumoral <i>in vivo</i> en el sarcoma de Ewing	57
1.1. Comparar la vasculatura entre tumores inducidos en ratones inmuno-deprimidos utilizando células de sarcoma de Ewing que presentan niveles altos de CAV1 con sus respectivos modelos de baja expresión desarrollados en el laboratorio	57
1.1.1 Desarrollo de modelos <i>in vitro</i> de baja expresión de CAV1 en líneas celulares de sarcoma de Ewing	57
1.1.2 Desarrollo de modelos <i>in vivo</i> de baja expresión de CAV1 (formación y análisis de xenoinjertos)	58
1.1.3 Análisis de la formación de vasos en los xenoinjertos de los modelos de baja expresión de CAV1	61

2.	Determinar el mecanismo a través del cual CAV1 regula la angiogénesis en el sarcoma de Ewing	67
2.1.	Comparar la capacidad de proliferación y migración de células endoteliales utilizando medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1	67
2.1.1	Determinación de la capacidad de proliferación de las células endoteliales a partir de medios condicionados de los modelos RDES y SKES1 de baja expresión de CAV1	67
2.1.2	Determinación del efecto migratorio de los medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1 sobre las células endoteliales	68
2.1.3	Determinación de la vía activada en las células endoteliales tras el estímulo con medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1	70
2.2.	Analizar el patrón de expresión de diferentes factores pro-angiogénicos secretados al medio por las células de sarcoma de Ewing	72
2.2.1	Análisis de los factores de crecimiento producidos y secretados por las células de sarcoma de Ewing	72
2.3.	Comparar los patrones de expresión en los modelos de baja expresión de CAV1	73
2.3.1	Comparación de los patrones de expresión de diferentes factores pro-angiogénicos en los modelos de baja expresión de CAV1	73
3.	Determinar el mecanismo molecular a través del cual CAV1 regula la angiogénesis en el sarcoma de Ewing	79
3.1.	Analizar la posible interacción entre CAV1 y el receptor EphA2	79
3.1.1	Determinar la participación del receptor de membrana EphA2 en el sarcoma de Ewing	79
3.1.2	Determinar el patrón de expresión del receptor de membrana EphA2 en los modelos de baja expresión de CAV1	81
3.1.3	Determinar la interacción del receptor de membrana EphA2 con CAV1 en los modelos de baja expresión de CAV1	84
3.2.	Analizar los efectos en la señalización regulados por EphA2 inducidos por la falta de CAV1	87
3.2.1	Determinar el mecanismo de señalización regulado por la activación del receptor de membrana EphA2	87
3.2.2	Determinar la importancia de la actividad quinasa del receptor EphA2 en el mecanismo de señalización en el sarcoma de Ewing	90
4.	Determinar la implicación de CAV1 y EphA2 en el mimetismo vascular (VM) en el sarcoma de Ewing	97

4.1 Comparación de la vasculatura entre tumores inducidos en ratones inmuno-deprimidos para identificar los vasos angiogénicos y los vasos miméticos en los modelos de baja expresión de CAV1	97
4.2 Análisis del efecto de la actividad quinasa-dependiente e -independiente de EphA2 en el proceso de mimetismo vascular	100
Discusión	105
Conclusiones	117
Bibliografía	121
ANEXOS	137

INTRODUCCIÓN

1. El Sarcoma de Ewing

El Sarcoma de Ewing es un tipo raro de cáncer con muy mal pronóstico. Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas las técnicas de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad han mejorado considerablemente. Esto ha significado una mejora en el pronóstico de los pacientes con enfermedad localizada. Desafortunadamente los índices de reincidencia de la enfermedad y la presencia de metástasis al diagnóstico hacen que su pronóstico sea aún muy desalentador [Leavey *et al.*, 2008].

1.1. Aspectos históricos

El sarcoma de Ewing fue descrito por primera vez en 1866 y 1890 por los cirujanos Lücke y Hildebrand [Hildebrand, 1890; Lücke, 1866]. Posteriormente, en 1918 el Dr. Stout lo describió como un tumor localizado en el nervio cubital y cuyas características coincidían con las de los sarcomas a pesar de estar compuesto por células redondas pequeñas y dispuestas en forma de roseta [Stout, 1918]. Sin embargo, no fue hasta 1921 cuando el patólogo norteamericano James Ewing los describe por primera vez publicando una caracterización elaborada de la enfermedad y describiéndolo como un endotelioma difuso y como un mieloma endotelial. Esta aproximación establecía su diferencia de otros tumores como el linfoma, así como de otros tipos de cáncer [Ewing, 1921].

El sarcoma de Ewing es un tipo de sarcoma perteneciente a la Familia de Tumores del Sarcoma de Ewing (ESFT por sus siglas en inglés – Ewing Sarcoma Family of Tumors). Los ESFT conforman un grupo de tumores de células redondas pequeñas (SRCT – Small Round-Cell Tumor) al cual también pertenecen otros tumores derivados de la cresta neural, como lo son el tumor de Askin y el tumor extra-esquelético neuroectodermal primitivo (PNET – Primitive Neuroectodermal Tumor) [Iwamoto Y., 2007; Machado I. *et al.*, 2009; Windsor R *et al.*, 2009]. Este grupo se caracteriza por tratarse de tumores óseos muy agresivos que pueden desarrollarse en tejidos blandos [Mackintosh C. *et al.*, 2012; Subbiah y Kurzrock, 2012].

En 1983, tanto Aurias como Turc-Carel detectaron la presencia de la translocación cromosómica t(11; 22) (q24; q12) en líneas celulares de sarcoma de Ewing establecidas a partir de diferentes muestras humanas [Aurias A. *et al.*, 1983; Turc-Carel C. *et al.*, 1983]. Dicha translocación consiste en la fusión del gen *EWS* (22q12) y el gen *FLII* (11q24) [Delattre *et al.* 1992]. La asociación específica de la translocación permitió un mejor diagnóstico y a la vez abrió una puerta a tratamientos consistentes en terapias dirigidas.

1.2. Epidemiología

El sarcoma de Ewing es el segundo tumor óseo maligno más común en jóvenes después del osteosarcoma. A pesar de que puede presentarse en cualquier etapa de la vida, más de la mitad de los pacientes diagnosticados son adolescentes con una edad media de 15 años [Karski *et al.*, 2012; Pizzo y Poplack, 2011]. En cuanto a su aparición, es más frecuente en varones caucásicos, presentando una incidencia de un 0.155% de la población total [Jawad M.U. *et al.*, 2009]. Estas tendencias demuestran la importancia de las variaciones de edad, sexo y raza en la aparición del sarcoma de Ewing, pudiéndose considerar su incidencia como dependiente de la población (Tabla 1) [Beck R. *et al.*, 2012; Jawad M.U., *et al.*, 2009].

Variable	No. De Pacientes	Validez% del Total
No. Total	1631	100
Edad (años)		
0-24	1244	76,3
25-59	357	21,9
>60	0	1,8
Sexo		
Hombres	983	60,3
Mujeres	648	39,7
Raza		
Blancos	1488	91,6
Negros	35	2,2
Otros	101	6,2
Etnia		
Hispánicos	222	13,7
No Hispánicos	1393	86,3
Estadio		
Local	409	28
Regional	587	40,2
Distante	464	31,8
Tamaño		
≤ 8	347	43,9
≥ 8	443	56,1
Localización		
Extra esquelético	290	18,4
Apendicular	591	37,5
Axial	694	44,1
Cirugía		
Sí	875	55,6
No	700	44,4
Radiación		
Sí	864	54,8
No	712	45,2
Año de diagnóstico		
1973 - 1975	72	4,4
1976 - 1985	327	20
1986 - 1995	373	22,9
1996 - 2005	859	52,9

Tabla 1. Características clínicas y demográficas del sarcoma de Ewing. Cohorte de 1631 pacientes de la base de datos del programa SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) del NCI (National Cancer Institute). **Modificado de Jawad M.U. et al., 2009**

Actualmente, gracias a la mejora en las estrategias de diagnóstico y cirugía, así como a tratamientos más intensivos, los pacientes con sarcoma de Ewing tienen mayores posibilidades de supervivencia. A pesar de todo, la carga tumoral sistémica lleva a los pacientes a morir dentro de los primeros 2 años de diagnóstico,

especialmente si ya ha sido detectado cualquier inicio de metástasis [Applebaum M.A. *et al.*, 2012]. Sin embargo, la localización del tumor primario también influye en el desarrollo de la enfermedad. El sarcoma de Ewing es un tipo de cáncer que puede afectar a cualquier hueso, siendo los más frecuentes la pelvis, el fémur, la caja torácica y la tibia (Figura 3), teniendo especial incidencia en las regiones diafisarias [Bernstein M. *et al.*, 2006]. A pesar de esto, el sarcoma de Ewing primario también puede presentarse en una variedad de sitios extra-óseos, incluyendo tejido blando paravertebral y torácico, tejidos proximales de las extremidades, riñones, vesícula, pulmones, próstata y meninges. Este comportamiento hace del sarcoma de Ewing un tumor muy agresivo y considerablemente metastásico [Riggi y Stamenkovic, 2007].

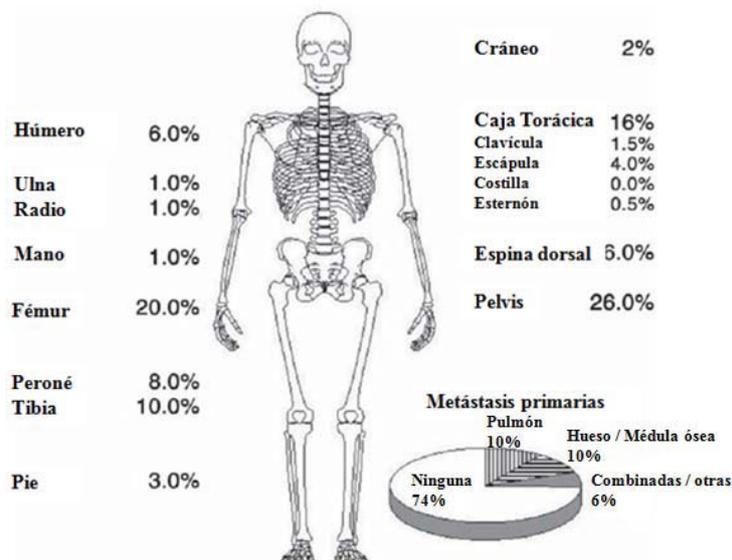


Figura 3. Sitios de desarrollo del tumor primario en el sarcoma de Ewing. Datos basados en 1426 pacientes de los ensayos de la European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. Modificado de Bernstein M. *et al.*, 2006

1.3. Diagnóstico clínico

Por lo general, los pacientes con sarcoma de Ewing, presentan un dolor difuso que normalmente es confundido con el dolor provocado por un trauma. Sin embargo, no existe ninguna correlación entre el sarcoma de Ewing y los traumas. Normalmente, el dolor aumenta con la actividad física y llega a persistir durante los periodos de reposo.

El dolor tiende a incrementar debido a la expansión del periostio causada por la formación de hueso nuevo, que a su vez conlleva la hinchazón de la zona afectada. Esta hinchazón es frecuentemente mal interpretada como inflamación. Otros síntomas característicos de la enfermedad incluyen el incremento de la temperatura corporal así como déficits neurológicos (dependiendo de la localización y tamaño del tumor). Cabe resaltar, que estos síntomas son más comunes en estadios más avanzados de la enfermedad y su diagnóstico puede implicar un valor pronóstico indirecto [Bernstein M. *et al.*, 2006; Widhe y Widhe, 2000].

Para detectar la enfermedad, la primera herramienta utilizada es el diagnóstico por imágenes. Cuando se sospecha de una lesión ósea, frecuentemente se utiliza la radiografía de dos planos para intentar detectar la osteolisis, el desprendimiento del periostio (triángulos de Codman), así como la formación de hueso nuevo a manera de capas (espículas óseas). Para evaluar con mayor precisión el tamaño y extensión de la lesión, así como su ubicación con relación a los vasos sanguíneos y nervios, se lleva a cabo la imagen por resonancia magnética [Bernstein M. *et al.*, 2006]. Otras estrategias de imagen incluyen la tomografía por emisión de positrones a partir de (^{18}F) fluorodeoxiglucosa, la imagen por resonancia magnética parcial o total, así como la tomografía computarizada [Balamuth y Womer, 2010].

De la misma manera que en otros tipos de enfermedades, el diagnóstico definitivo es la biopsia. A partir de ésta, es posible diferenciar esta entidad de otros tipos de tumores de células redondas pequeñas. Para esto se utilizan diferentes técnicas como la RT-PCR (transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa) o el FISH (hibridación fluorescente *in situ*). Ambas técnicas permiten la identificación de la translocación característica de la enfermedad. [Machado I. *et al.*, 2009; Subbiah y Kurzrock, 2012].

1.4. Tratamiento

Actualmente, el tratamiento estándar para los pacientes diagnosticados con sarcoma de Ewing consiste principalmente en la quimioterapia citotóxica con vincristina, adriamicina y ciclofosfamida, alternando con ifosfamida y etopósido. La cirugía se

utiliza como control local, y la radiación se aplica solo en algunos pacientes [Subbiah y Kurzrock, 2012]. De manera adicional, la mejora en los tratamientos de continuidad ha permitido el uso de combinaciones como temozolomida/irinotecan, topotecan/ciclofosfamida y gemcitabina/docetaxel. Estos tratamientos han permitido prolongar la supervivencia de los pacientes a pesar de que aún son necesarias nuevas aproximaciones [Subbiah V. *et al.*, 2009; Subbiah y Kurzrock, 2012].

Además de los tratamientos mencionados anteriormente, nuevos tratamientos contra nuevas dianas terapéuticas han surgido y muchas de ellas aún se encuentran en ensayos clínicos. Algunas de estas dianas implican la inhibición del receptor 1 del factor de crecimiento de insulina (IGF1R), la inhibición combinada del IGF1R junto con la vía del *mammalian target of rapamycin* (mTOR), así como agentes directos contra la proteína de fusión originada por la translocación. [Grohar P.J. *et al.* 2011; Malempati S. *et al.*, 2012; Naing A. *et al.*, 2012; Subbiah y Kurzrock, 2012].

1.5. Histología

Morfológicamente, el sarcoma de Ewing es un tumor compuesto por células redondas pequeñas con un núcleo de gran tamaño. Por lo general, se clasifica patológicamente dentro del grupo de tumores de células redondas pequeñas y azules que incluyen tumores como el neuroblastoma, el rhabdomyosarcoma alveolar y el linfoma linfoblástico. Las células por lo general presentan un citoplasma escaso y un núcleo redondeado, con una cromatina usualmente uniforme y una actividad mitótica escasa [Riggi y Stamenkovic, 2007].

Analizadas por inmunohistoquímica, las células de sarcoma de Ewing son positivas para el marcador CD99 comúnmente asociado con células linfoides y considerado como un marcador específico inmunofenotípico [Riggi y Stamenkovic, 2007; Subbiah y Kurzrock, 2012]. Dependiendo del nivel de diferenciación neuroectodermal, las células de sarcoma de Ewing también pueden presentar marcadores de células neurales incluyendo la enolasa neuro-específica (NSE), la S-100, la sinaptofisina y el CD57. Sin embargo, las células del linfoma linfoblástico y las de rhabdomyosarcoma también son

positivas para CD99, mientras que las células de neuroblastoma son positivas para NSE y S-100 [Riggi y Stamenkovic, 2007]. Es por la falta de especificidad de estos marcadores que actualmente los marcadores moleculares son necesarios para la detección específica de la enfermedad.

1.6. Aspectos genéticos

Basados en las mutaciones genéticas asociadas con su desarrollo, los sarcomas se encuentran divididos en dos grupos. El primero está compuesto por tumores cuyas anomalías cariotípicas no tienen ningún patrón particular. El segundo, que incluye al sarcoma de Ewing, se encuentra compuesto por tumores asociados con una única translocación cromosómica que da origen a una fusión específica de genes [Riggi y Stamenkovic, 2007].

La familia de tumores del sarcoma de Ewing se encuentra caracterizada molecularmente por translocaciones cromosómicas que dan origen a reorganizaciones génicas. El descubrimiento de la reorganización cromosómica t(11;22) permite un diagnóstico del sarcoma de Ewing más específico [Arvand y Denny, 2001]. Esta reorganización es originada por el gen *EWS* (codificante para una proteína de unión a ARN) y un miembro de la familia de factores de transcripción ETS que contiene un dominio de unión a ADN, dando lugar a una proteína de fusión con actividad pro-oncogénica [May W.A. *et al.*, 1993]. La translocación t(11;22)(q24;q12) da origen al gen aberrante *EWS/FLII*, que es el más importante para determinar la patobiología de la familia de tumores del sarcoma de Ewing, expresándose en más de un 85-90% de los tumores [Delattre O. *et al.*, 1994; Ordoñez J.L. *et al.*, 2009].

En esta translocación, el extremo 5' del gen *EWS* codificado en el cromosoma 22, contiene un dominio amino-terminal así como una serie de dominios carboxi-terminales que pueden funcionar como regiones de unión a ARN. El extremo 3' del gen *FLII* codificado en el cromosoma 11, contiene un dominio de activación transcripcional débil en su región amino-terminal, así como un dominio de unión a ADN en su fragmento carboxi-terminal. La translocación t(11;22)(q24;q12) codifica para la proteína de fusión

EWS/FLI1, que contiene el fragmento amino terminal del gen *EWS*, fusionado con el fragmento carboxi-terminal del gen *FLI1*. El fragmento amino terminal del gen *EWS* actúa como un dominio de activación transcripcional fuerte, mientras que el fragmento del gen *FLI1* contribuye con el dominio de unión a ADN. (Figura 4) [Riggi y Stamenkovic, 2007].

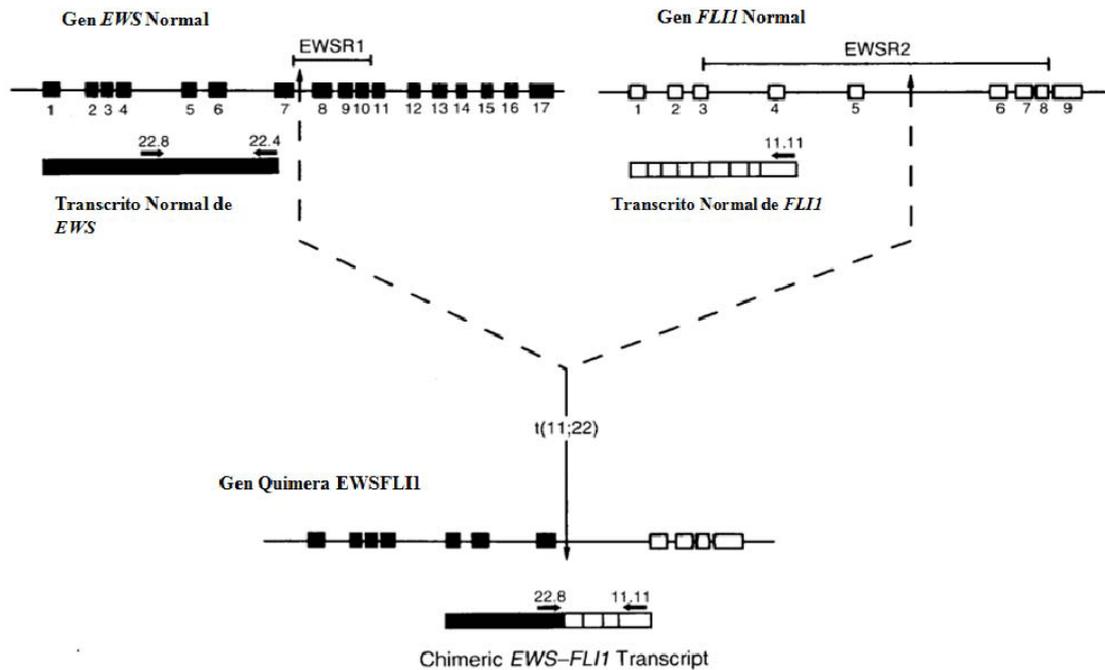


Figura 4. Representación esquemática de la fusión EWS/FLI1 resultante de la translocación t(22;11). Modificado de Delattre O. *et al.*, 1994

El gen aberrante resultado de la fusión actúa como un factor de transcripción pro-oncogénico capaz de modificar el funcionamiento normal de la célula donde se expresa [Uren y Toretsky, 2005]. Además de la fusión *EWS/FLI1*, el sarcoma de Ewing puede presentar otras translocaciones donde EWS puede fusionarse con otros miembros de la familia ETS, tales como ERG, expresándose aproximadamente en un 5-15% de los casos (Tabla 2) [Arvand y Denny, 2001; Machado I. *et al.*, 2009; Riggi y Stamenkovic, 2007; Nilsson G. *et al.*, 1999; Subbiah y Kurzrock, 2012; Windsor R. *et al.*, 2009]. Esto hace que dichas translocaciones puedan ser consideradas como marcadores moleculares para la detección de la enfermedad que conllevan [Gangwal K. *et al.*, 2008; Potikyan G. *et al.*, 2008].

Posibles Translocaciones del Sarcoma de Ewing		
Miembro EWS	Miembro ETS	Frecuencia (%)
EWS	FLI1	85
EWS	ERG	10
EWS	ETV1	<1
EWS	ETV4	<1
EWS	FEV	<1
TLS	ERG	<1

Tabla 2. Posibles fusiones y frecuencias en el sarcoma de Ewing. Riggi y Stamenkovic, 2007

1.7. Dianas transcripcionales de EWS/FLI1

A lo largo de los últimos años, se han descrito diferentes dianas del oncogén *EWS/FLI1*, relacionadas con la proliferación celular, la progresión tumoral y la metástasis [Iwamoto Y., 2007; Owen y Lessnick, 2006]. Actualmente, se mantiene que *EWS/FLI1*, así como otras proteínas de fusión *EWS/ETS* actúan como factores de transcripción aberrantes. Muchas de las dianas sobre las que actúa *EWS/FLI1* se ven envueltas principalmente en el proceso de tumorigénesis del sarcoma de Ewing. Estudios desarrollados en diferentes modelos experimentales han demostrado tanto la inducción como la inhibición de genes por parte de *EWS/FLI1*. Algunos de los genes inducidos directamente por *EWS/FLI1* son: *EAT-2* (un dominio SH-2 que contiene una proteína participante en la regulación inmune), *mE2-C* (una ligasa de ubiquitina ciclina-selectiva) y *MFNG* (que codifica para una glicosiltransferasa que participa en el desarrollo somático en un modelo murino). Otros genes inducidos parecen estar relacionados con la transformación y progresión tumoral, incluyendo a *MYC*, *ID2*, *CCND1* y *PDGFC*. Por otra parte, algunos de los genes que se ven inhibidos codifican para proteínas como p21, p57kip, TGF-βRII e IGFBP-3. De los genes antes mencionados, únicamente se ha demostrado que *TGFBRII* e *IGFBP3* son dianas directas de *EWS/FLI1*. Mientras que la inhibición de *TGFBRII* se encuentra relacionada con la proliferación celular en el sarcoma de Ewing, la supresión de *IGFBP3* se encuentra relacionada con la supervivencia de la célula tumoral. [Lessnick y Ladanyi, 2012; Janknecht R. 2005; Nilsson G. *et al.*, 1999; Subbiah y Kurzrock, 2012]. Además de estos genes, existen otros genes inducidos por la translocación como lo son: *CD99*,

COL11A2, *PIM3* y *DAX1 (NR0B1)*. Estos genes presentan diferentes funciones relacionadas con la progresión tumoral, como es el caso de *DAX1*. *DAX1* es un gen que codifica para un receptor nuclear inusual, relacionado con el desarrollo gonadal, la determinación del sexo y la esteroidogénesis [Mendiola M. *et al.*, 2006]. Sin embargo, en el sarcoma de Ewing el papel de *DAX1* no se encuentra relacionado con el control hormonal, sino que ha sido relacionado con el desarrollo tumorogénico de la enfermedad, estableciendo una conexión directa con la proliferación celular [García-Aragoncillo E. *et al.*, 2008].

Para poder llegar a conocer las diferentes dianas y sus papeles, se han utilizado diferentes técnicas, como el análisis de perfiles de expresión y el desarrollo de modelos experimentales. Estos perfiles de expresión genética permiten identificar genes activados e inhibidos y así desarrollar un pronóstico más acertado para la enfermedad. Es a partir de los análisis de las dianas transcripcionales y de los perfiles genéticos que se describió *caveolina-1 (CAVI)* como una diana transcripcional directa de la translocación *EWS/FLI1* [Tirado O.M. *et al.*, 2006]. A esta proteína se le ha otorgado un papel pro-metastásico, una de las características principales del sarcoma de Ewing (gran capacidad de metastatizar). De hecho, un 30% de los pacientes con un diagnóstico positivo para la enfermedad presentan metástasis pulmonar y pocos consiguen sobrevivir a pesar de los tratamientos [Barker L.M. *et al.*, 2005]. Así pues, los genes diana de *EWS/FLI1* relacionados con el proceso metastásico y tumorogénico del sarcoma de Ewing son de importancia en la búsqueda de dianas terapéuticas para combatir la enfermedad.

2. Caveolina-1

CAVI es una de las dianas transcripcionales de *EWS/FLI1*. Este gen es uno de los determinantes del fenotipo tumorogénico del sarcoma de Ewing [Tirado O.M. *et al.*, 2006] además de ser uno de los genes relacionados directamente con el proceso de metástasis.

2.1. Las caveolas

Las caveolas son invaginaciones de la membrana plasmática que pueden ser encontradas en diferentes células diferenciadas, siendo más abundantes en adipocitos, células endoteliales, pneumocitos, fibroblastos, y células musculares lisas y estriadas (Figura 5). Las caveolas son consideradas como un subconjunto de balsas lipídicas (*lipid rafts*) con microdominios de lípidos específicos [Sotgia F. *et al.*, 2012].

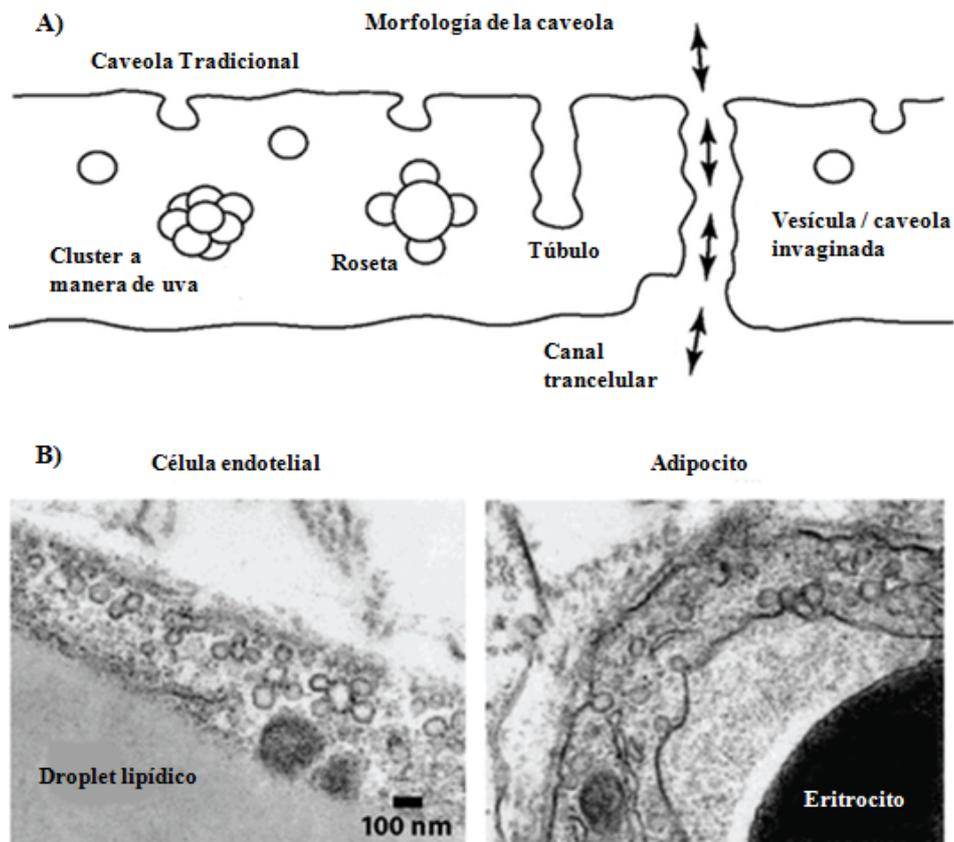


Figura 5. Morfología de la caveola. A) Las caveolas son estructuras vesiculares que participan en el transporte de membrana y en la transducción de señales. Pueden aparecer en clusters a manera de uva o en forma de rosetas e incluso fusionarse para formar canales trancelulares. Frecuentemente, aparecen sólo como invaginaciones de la membrana plasmática. B) Las caveolas son particularmente abundantes en adipocitos y células endoteliales, sin embargo también se encuentra en otras células del estroma, como fibroblastos y células lisas musculares. Imágenes de microscopía electrónica. Sotgia F. *et al.*, 2012

A diferencia de las balsas lipídicas, las caveolas son estructuras morfológicamente discretas y cubiertas por una familia de proteínas llamadas caveolinas. Las caveolinas son capaces de oligomerizarse para producir una variedad de complejos que permiten la

formación de la caveola [Sotgia F. *et al.*, 2012]. Estudios recientes han demostrado que existe además otra familia de proteínas, denominadas cavins, que son capaces de regular la expresión de caveolinas y la formación de caveolas [Liu L. *et al.*, 2008; Sotgia F. *et al.*, 2012]. Las caveolas se consideran implicadas en el proceso de transcitosis (transporte vesicular de macromoléculas a través de la célula), potocitosis y pinocitosis (endocitosis de pequeñas moléculas o iones hacia el citosol). Además se ha demostrado su participación en la homeostasis del colesterol y la regulación de señales celulares [Sotgia F. *et al.*, 2012].

2.2. El gen *CAVI*

CAVI pertenece a una familia de genes altamente conservada y junto con *CAV2* se expresa en células y tejidos de origen mesenquimal, endotelial, epitelial, neuronal y glial. El gen de *CAVI* se encuentra compuesto por tres exones (Figura 6) traducidos en una isoforma α (178 aminoácidos) y una isoforma β (146 aminoácidos) [Burgermeister E. *et al.*, 2008]. Tanto *CAVI* como *CAV2* se encuentran muy cercanos el uno del otro (19 Kb aproximadamente) en el cromosoma 7q31.1, mientras que *CAV3* se encuentra localizado en otro cromosoma (3p25) [Williams y Lisanti, 2004].

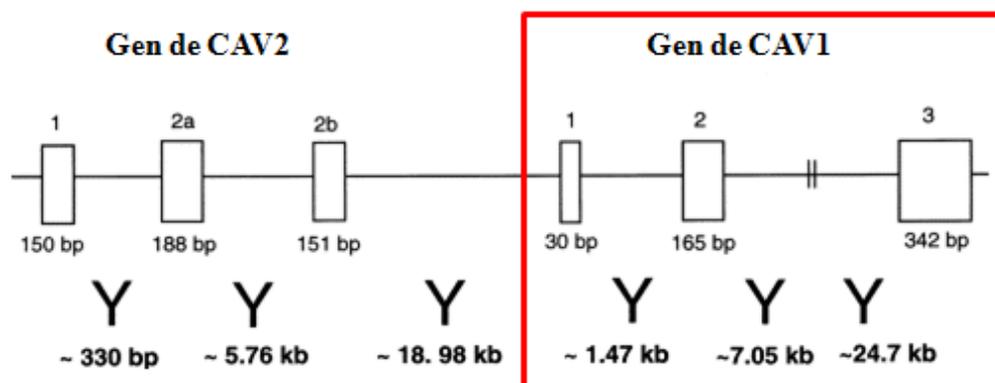


Figura 6. Organización de los genes CAV1 y CAV2. La imagen muestra el tamaño de los exones y distancia entre ellos. Smart E.J. *et al.*, 1999

El gen *CAVI* ha sido descrito como implicado en el desarrollo tumoral de diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de pulmón [Song Y. *et al.*, 2012] y el de mama

[Williams y Lisanti, 2005]. En este modelo se ha demostrado que la modificación de ambos alelos de *CAVI* tiene como resultado el desarrollo prematuro del compartimiento lóbulo-alveolar durante el embarazo [Park D.S. *et al.*, 2002]. Por otra parte, la ausencia de *CAVI* ha demostrado acelerar a aparición de displasias en el epitelio mamario [Williams T.M. *et al.*, 2004].

2.3. La proteína CAV1

Caveolina-1 pertenece a una familia de proteínas llamada caveolinas. Esta familia se encuentra compuesta por 3 miembros: CAV1, CAV2 y CAV3. Mientras que CAV1 y CAV2 se encuentran co-expresadas en diferentes tejidos, CAV3 sólo se encuentra expresada en músculo. [Burgermeister E. *et al.*, 2008; Sotgia F. *et al.*, 2012].

CAV1 es una proteína de unión de aproximadamente 21-24 kDa. Ésta es esencial para la formación de las caveolas donde actúa uniéndose al colesterol y esfingolípidos dentro de las balsas lipídicas. Una vez fuera del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, los monómeros de CAV1 se unen a homo- y hetero-oligómeros de alto peso molecular para formar la estructura caveolar [Burgermeister E. *et al.*, 2008]. En la estructura de CAV1, ambos dominios, tanto el carboxi- como el amino-terminal, se encuentran de cara al citoplasma. De la estructura de CAV1 se han descrito diferentes dominios de actividad (Figura 7) entre los cuales destacan: dos sitios de anclaje en la membrana (residuos 82-101 y 135-150), un dominio de oligomerización (residuos 61-101) y un dominio de anclaje a caveolina (*caveolin-scaffolding domain*) – CSD – (residuos 82-101). Éste último, es un dominio capaz de mediar la interacción proteína-proteína regulando la actividad de moléculas de señalización. Las proteínas que interactúan con CAV1 a través del CSD contienen el dominio de unión a caveolina-1 o *caveolin-1 binding domain*, $\phi x \phi x x x \phi$ o $\phi x x x x \phi x x \phi$ (ϕ = Trp, Phe or Tyr), donde ϕ es un aminoácido aromático [Cai Q.C. *et al.*, 2003; Sotgia F. *et al.*, 2012].

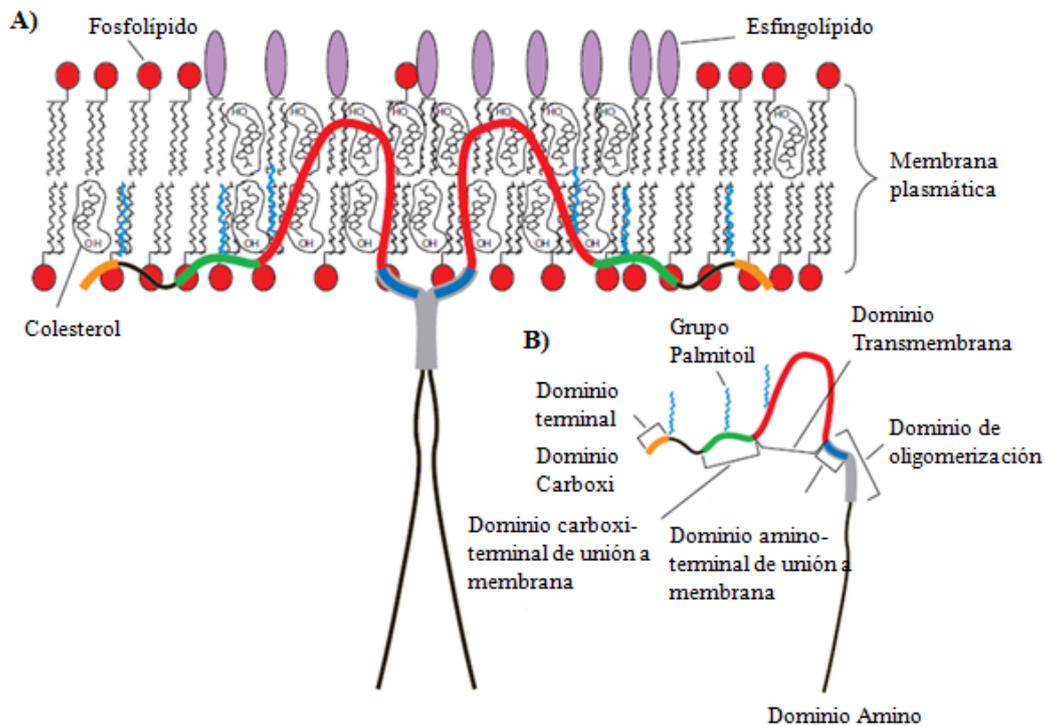


Figura 7. Estructura y topología de CAV1. A) Topología de CAV1. Dos monómeros de CAV1 se muestran formando un dímero a lo largo de la membrana plasmática. B) Estructura de CAV1. Se muestran los dominios presentes en CAV1. El dominio amino-terminal de unión a membrana también es llamado dominio de anclaje a caveolina. **Williams y Lisanti, 2004**

CAV1 ha sido descrita como una proteína versátil que además de estar presente en las caveolas, se puede encontrar en los caveosomas, en el aparato de Golgi, en las balsas lipídicas, citoplasmáticas e incluso en el núcleo [Burgermeister E. *et al.*, 2008; Sanna E. *et al.*, 2007]. Actualmente se conoce que la actividad de CAV1 consiste principalmente en establecer microdominios en la membrana plasmática imprescindibles para la formación de las caveolas. Además, juega un papel importante en la transmisión de señales de transducción, homeostasis de colesterol y transporte de moléculas [Burgermeister E. *et al.*, 2008; Sotgia F. *et al.*, 2012].

Hoy en día se sabe que tanto la pérdida como la sobreexpresión de CAV1 se encuentra relacionada con el desarrollo tumoral y la actividad metastásica, ya sea jugando un papel supresor (tumores de colon, mama, ovario y pulmón) o un papel promotor (esófago, próstata y vesícula) [Le Lan C. *et al.*, 2010; Williams T.M. *et al.*, 2004]. En cuanto a su papel como supresor tumoral, CAV1 ha sido descrita como una proteína que aumenta su expresión durante la diferenciación celular. Una vez

diferenciada la célula, los niveles de CAV1 así como de las caveolas, se ven reducidos por la actividad de diferentes oncoproteínas. En los modelos de cáncer de mama y de pulmón, se ha demostrado que CAV1 se encuentra reprimida por la oncoproteína c-Myc [Goetz J.G. *et al.*, 2008]. Sin embargo, el papel de CAV1 en el cáncer de mama también ha sido descrito como un inhibidor de la anoikis y como un promotor de supervivencia de la célula tumoral [Ravid D. *et al.*, 2006]. Así pues, caracterizar el papel de CAV1 como un marcador para el pronóstico del cáncer, ha sido de importancia en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico (Tabla 3) [Burgermeister E. *et al.*, 2008].

Correlación entre la expresión de CAV1 y el pronóstico clínico (PC)		
Tejido	Tipo Tumoral	CAV1
<i>Correlación de CAV1 con pobre PC</i>		
Esófago	Carcinoma espinocelular (cavidad oral)	↑ P
Estómago	Metástasis de ganglios linfáticos por adenocarcinoma gástrico	↓ P ↑ M
Páncreas	Adenocarcinoma ductal	↑ P
	Tumor intraductal papilar-mucoso	↑ P
Colon	Adenocarcinoma	↑ P
Hígado	Carcinoma hepatocelular de hígado cirrótico	↑ P
Riñón	Carcinoma renal de células claras	↑ P
Vejiga	Carcinoma urotelial	↑ P
	Carcinoma espinocelular	↑ P
Próstata	Adenocarcinoma andrógeno sensible	↑ P
Pecho	Carcinoma basal	↑ P
	Carcinoma ductal	↑ P
Pulmón	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	↑ P
	Carcinoma pleomórfico	↑ P
	Carcinoma espinocelular	↑ P
	Adenocarcinoma	↑ P
Tiroides	Carcinoma papilar	↑ P
Cerebro	Meningioma	↑ P
	Glioma	↑ P
Mesénquima	Sarcoma de Ewing	↑ P
<i>Correlación de CAV1 con PC favorable</i>		
Ducto biliar	Carcinoma del ducto biliar extra-hepático	↑ P
Glándula salival	Carcinoma mucoepidermoide	↑ P

Tabla 3. Correlación entre la expresión de CAV1 y el pronóstico clínico. M = metástasis distal, P = tumor primario, ↑ proteína elevada, ↓ = proteína reducida **Burgermeister E. *et al.*, 2008**

2.4. CAV1 y el Sarcoma de Ewing

CAV1 es una proteína que se encuentra sobre-expresada en el sarcoma de Ewing, tanto en líneas celulares como en muestras tumorales, y ha sido descrita como necesaria para el proceso tumorigénico [Tirado O.M. *et al.*, 2006]. En los experimentos realizados, la inhibición de CAV1 conllevaba la regulación de Snail y la pérdida de expresión de caderina E. Estas modificaciones implicaron la reducción en el crecimiento tumoral de los xenoinjertos desarrollados en ratones atímicos, indicando que CAV1 promueve el fenotipo maligno en la carcinogénesis del sarcoma de Ewing [Tirado O.M. *et al.*, 2006]. Además, también se ha demostrado que los niveles de expresión de CAV1 en el sarcoma de Ewing pueden determinar la sensibilidad de las células ante agentes quimioterapéuticos [Tirado O.M. *et al.*, 2010].

Asimismo, se ha demostrado que CAV1 es capaz de controlar la migración e invasión de las células tumorales de sarcoma de Ewing. En experimentos *in vitro*, se han descrito los mecanismos que conllevan la producción y activación de metaloproteinasas, así como la regulación de los niveles de SPARC y su papel en la colonización pulmonar en ratones atímicos. Estos datos, muestran la relevancia del papel de CAV1 en la biología del sarcoma de Ewing [Sáinz-Jaspeado M. *et al.*, 2010].

Estudios recientes sugieren la participación de CAV1 en el aporte vascular de diferentes tumores. Basándose en modelos *in vitro* e *in vivo* Tahir S.A. *et al.*, han demostrado el papel pro-angiogénico de CAV1 en el desarrollo y progresión del cáncer pancreático [Tahir S.A. *et al.*, 2008].

3. El aporte vascular

El aporte vascular es esencial en la embriogénesis, en el desarrollo y homeostasis de los tejidos en adultos, además de estar relacionado con una gran variedad de eventos patológicos como la cicatrización, las enfermedades metabólicas y la progresión tumoral. En el sistema vascular las células endoteliales, los pericitos y las células del músculo liso vascular son los principales componentes de los vasos sanguíneos. Las

células endoteliales y sus células precursoras pueden diferenciarse en pericitos u otras células mesenquimales y *vice versa*. Además, los vasos sanguíneos pueden actuar como la primera etapa de la extravasación de los leucocitos, el intercambio de diversas sustancias bioquímicas y dar inicio a la síntesis de moléculas vaso activas [Furuya M. *et al.*, 2009]. Los vasos sanguíneos aportan oxígeno y nutrientes a todas las partes del cuerpo. Otras actividades de los vasos sanguíneos consisten en promover una vigilancia inmunológica, permitir el desecho de residuos celulares así como producir señales para la organogénesis. A pesar de ser beneficiosos para el desarrollo de los tejidos y la regeneración, los vasos sanguíneos pueden alimentar enfermedades inflamatorias y malignas como el cáncer. Este suministro de nutrientes, permite a las células tumorales crecer y metastatizar [Carmeliet y Jain, 2011]. Debido a la importancia e impacto de los vasos sanguíneos en el organismo, la actividad anormal de los vasos contribuye de manera directa a múltiples enfermedades como son los infartos cerebrales, infartos al miocardio, desórdenes ulcerativos y neurodegeneración, desórdenes inflamatorios, hipertensión pulmonar, etc. [Carmeliet y Jain, 2011].

Hasta la fecha, se han descrito diferentes tipos de formación de vasos sanguíneos (Figura 8). En el desarrollo embrionario de los mamíferos, los angioblastos se diferencian en células endoteliales capaces de formar una estructura vascular (vasculogénesis). A partir de distintas señales específicas se forman venas y arterias. Posteriormente, los brotes que surgen aseguran la expansión de la red vascular por todo el cuerpo (angiogénesis). Una vez expandida la red de vasos sanguíneos, tiene lugar la arteriogénesis en donde los canales de células endoteliales son cubiertos por pericitos o por células del músculo liso vascular que otorgan estabilidad y control de la perfusión [Carmeliet y Jain, 2011].

Otros mecanismos menos estudiados que utilizan los tejidos para irrigarse son el de angiogénesis por partición o *Intussusception* (un vaso sanguíneo se divide en dos vasos), la co-opción de vaso o *vessel co-option* (las células tumorales secuestran la vasculatura existente), el mimetismo vascular (las células tumorales forman los vasos sanguíneos) y la formación de un vaso sanguíneo cuyas células endoteliales se derivan de las células madre de cáncer [Carmeliet y Jain, 2011].

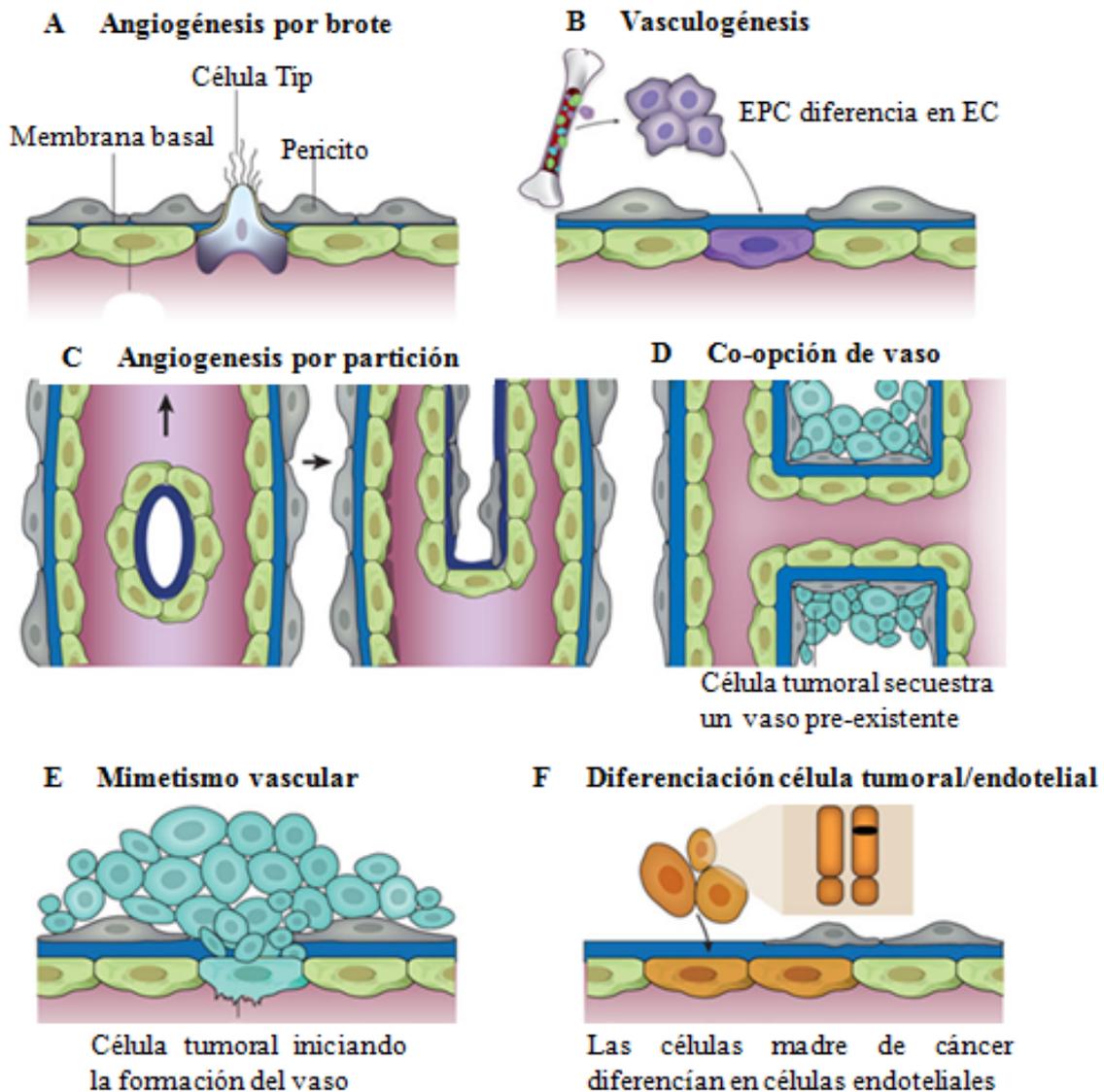


Figura 8. Modelos de formación de vasos sanguíneos. Formación de vasos sanguíneos sólo a partir de células endoteliales (EC) A-C. A) Angiogénesis por brote, B) Vasculogénesis o formación de vasos a partir de células endoteliales progenitoras (EPC), C) Angiogénesis por partición. Formación de vasos sanguíneos con la participación de células tumorales D-F. D) Co-opción de vaso, las células tumorales secuestran un vaso existente, E) Mimetismo vascular, F) Diferenciación de célula madre tumoral a endotelial. **Carmeliet y Jain, 2011**

Actualmente se conoce que la formación de vasos sanguíneos es necesaria para que un tumor pueda crecer más de 1-2 mm³. Los tumores estimulan la formación de vasos sanguíneos a partir de la secreción de sustancias estimulantes de vasos o bien, activando compuestos angiogénicos en la matriz extracelular. Normalmente los tumores son irrigados por vasos nuevos derivados de vasos preexistentes (angiogénesis). Sin

embargo, los tumores muy agresivos son capaces de obtener sangre y nutrientes a partir de los vasos formados por ellos mismos (mimetismo vascular) [Ahmadi S. A. *et al.*, 2010].

3.1. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso fisiológico en el cual nuevos capilares o vasos sanguíneos son formados a partir de vasos preexistentes. La angiogénesis es un fenómeno esencial para una variedad de procesos como lo son el desarrollo embrionario, la cicatrización, la regeneración, etc. Sin embargo, existen condiciones particulares del proceso angiogénico no controlado, que permiten el mantenimiento y soporte de diferentes enfermedades tales como la retinopatía diabética, psoriasis y la artritis reumatoide entre otras [Vihanto M.M. *et al.*, 2006].

La tendencia a la formación de vasos sanguíneos en el desarrollo tumoral es un proceso de suma importancia para el proceso tumorogénico. Este proceso se puede ver favorecido por la secreción de factores de crecimiento, como por ejemplo el factor endotelial (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF: basic Fibroblast Growth Factor) [Goh P.P. *et al.*, 2007; Potente M. *et al.*, 2011]. Los factores secretados activan a las células endoteliales que dan inicio al proceso de angiogénesis. Estas células comienzan una cascada de señales para activar y producir las proteasas que degradarán la membrana basal y la matriz extracelular para dar inicio a la proliferación y migración de las células endoteliales (Figura 9). Una vez que las células endoteliales han llegado al tumor, la estructura vascular pierde su normalidad y regularidad. Debido a esta desorganización, el suplemento de oxígeno dentro del tumor no es homogéneo por lo que la estimulación angiogénica es continua [Kleibeuker E.A. *et al.*, 2012; Potente M. *et al.*, 2011].

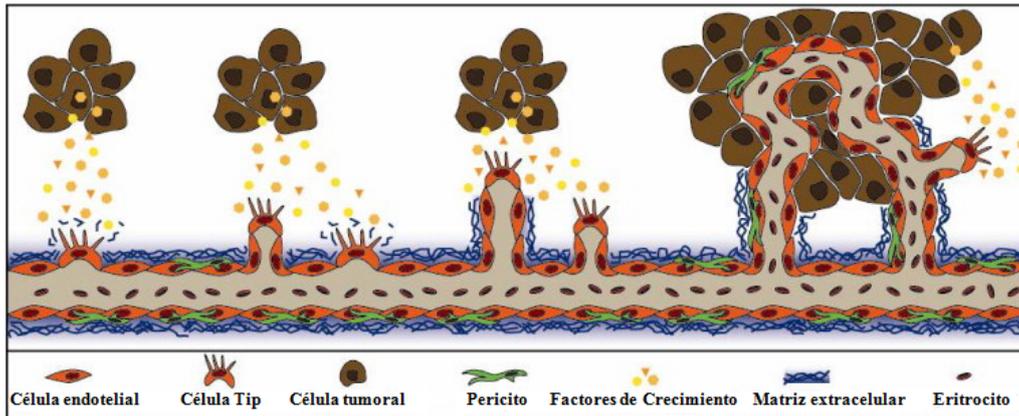


Figura 9. Angiogénesis tumoral. Representación esquemática del proceso angiogénico en el tumor. Bajo condiciones hipóxicas, las células tumorales comienzan a secretar factores de crecimiento pro-angiogénicos. Estos factores activan a las células endoteliales de los capilares cercanos que comienzan a degradar la matriz extracelular. A continuación, las células endoteliales con filopodios (células Tip) comienzan a dirigir la proliferación y migración de las células endoteliales hacia el gradiente de los factores de crecimiento. Finalmente, las células tip se conectan dando inicio a la formación de una red vascular que permite la irrigación y oxigenación del tejido. El crecimiento constante de las células tumorales induce la formación de nuevos vasos sanguíneos de manera continua. **Kleibeuker E.A. *et al.*, 2012**

De este modo, la angiogénesis puede describirse en 4 fases [Bussolino F. *et al.*, 1997]:

- a) La fase inicial, caracterizada por un incremento en la permeabilidad de la célula ante proteínas y vasodilatación.
- b) La fase de progresión, donde se produce la degradación y remodelación de la matriz extracelular por acción de las células endoteliales durante su migración y proliferación.
- c) La fase de diferenciación, que comprende los cambios morfológicos de las células endoteliales, permitiéndoles desarrollar una estructura tubular o luminal.
- d) La fase de estabilización y maduración, caracterizada por el reclutamiento de pericitos, células musculares lisas y el depósito de nuevas proteínas de la matriz.

Durante el desarrollo angiogénico, el proceso de migración endotelial envuelve 3 mecanismos importantes: quimiotaxis (migración dirigida hacia la fuente de los quimioatrayentes), haptotaxis (la migración dirigida hacia el gradiente de ligandos) y la mecanotaxis (la migración generada por fuerzas motrices de la célula) [Li S. *et al.*,

2005]. De estos tres mecanismos, frecuentemente la quimiotaxis endotelial se encuentra dirigida por los factores de crecimiento (VEGF, bFGF) y la haptotaxis está asociada a la respuesta endotelial tras la unión de integrinas a la matriz extracelular. [Lamalice L. *et al.*, 2007]. Sin embargo, el proceso angiogénico no solo implica la migración endotelial, sino también la modificación y alteración de mecanismos moleculares. En una persona adulta, las células endoteliales se encuentran protegidas en contra de la acción autocrina de diferentes señales producidas por VEGF, NOTCH, la angiopoyetina-1 (ANG-1) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs). Puesto que los vasos sanguíneos aportan oxígeno, las células endoteliales poseen sensores y factores que inducen hipoxia (dominio 2 prolyl hidroxilasa – PHD2 – y el factor inductor de hipoxia 2α – HIF- 2α –), los cuales permiten al vaso reajustar su estructura para optimizar el flujo sanguíneo. No obstante, estas no son las únicas señales que pueden alterar el desarrollo vascular. También están presentes señales inducidas por la familia PDGF, TGF- β , TIE, WNT, diferentes integrinas y proteasas, así como moléculas de unión, quimioquinas y receptores pareados de proteína G, además de otras rutas de señalización que permiten a las células “Tip” activar guías de navegación durante la migración, como es el caso de Box2 y Box3 [Carmeliet y Jain, 2011].

En los sarcomas, el desarrollo angiogénico presenta un reto durante la terapia. Actualmente, las terapias anti-angiogénicas han generado un número significativo de avances que incluyen la disminución de la resistencia a los tratamientos, menores efectos colaterales y un amplio espectro de actividad. Debido a que los sarcomas expresan un gran número de factores pro-angiogénicos que pueden convertirse en dianas terapéuticas, el uso de inhibidores de estos factores ha demostrado la eficiencia de los tratamientos anti-angiogénicos. El desarrollo de modelos animales así como los ensayos clínicos aún se encuentran en pleno desarrollo, sin embargo, su continuidad puede llegar a permitir el uso de tratamientos anti-angiogénicos en combinación con agentes citotóxicos, llegando así a terapias más eficientes y menos agresivas [Bid y Houghton, 2011; Heymach, 2001].

3.2. Mimetismo vascular

El mimetismo vascular es el proceso de formación de vasos sanguíneos o canales sanguíneos a partir de células tumorales. Se le llama mimetismo vascular porque se trata de canales miméticos que son capaces de funcionar como vasos sanguíneos. Estos canales además de otorgar una vía de perfusión independiente de la angiogénesis [Folberg y Maniotis, 2004], también permiten establecer una relación entre la agresividad del tumor y el pronóstico de la enfermedad [Ahmadi S. A. *et al.*, 2010].

En el mimetismo vascular, las células tumorales son capaces de expresar marcadores endoteliales y relacionados con la vasculogénesis embrionaria como son la VE-caderina, CD34 y CD105 [Furuya M. *et al.*, 2009]. El reconocimiento de los vasos miméticos sin embargo, puede establecerse gracias a la asociación entre la detección histológica de diferentes patrones de composición. En estos patrones, la matriz extracelular es positiva para la tinción por ácido periódico – tinción de Schiff (*periodic acid-Schiff* – PAS –). Los diferentes patrones pueden ser ricos en laminina, colágeno tipo IV, colágeno tipo VI y glicosaminoglicanos, especialmente el sulfato heparan proteoglicano (HSPG). Estos patrones pueden presentar una morfología diferente entre sí, pudiendo ser arcos sin ramificaciones, bucles, redes y depósitos lineares [Folberg y Maniotis, 2004]. Esta capacidad de las células de formar estructuras similares a los vasos sanguíneos ha sido explicada en función del grado de plasticidad celular que presentan. La plasticidad celular es indicativa de un fenotipo multipotente asociado con células madre embrionarias. Estudios genéticos del mimetismo vascular han revelado la regulación de diferentes genes asociados con progenitores embrionarios, células endoteliales, formación de vasos, modulación de la matriz e inhibidores de coagulación entre otros [Seftor R.E.B. *et al.*, 2012].

Actualmente se ha demostrado que el micro-ambiente del tumor puede actuar como un componente elemental para la célula tumoral, donde los cambios pueden alterar o modificar los procesos celulares y las respuestas de la célula a diferentes estímulos. Esta reciprocidad y dependencia entre la célula tumoral y el medio que le rodea son indispensables para el mimetismo vascular [Seftor R.E.B. *et al.*, 2012].

3.3. El aporte vascular en el Sarcoma de Ewing

Como todos los tumores sólidos, el sarcoma de Ewing requiere de un aporte vascular que permita el crecimiento de las células tumorales. A día de hoy, se han descrito 3 estrategias a través de las cuales el sarcoma de Ewing es capaz de mantener el aporte vascular necesario para la progresión tumoral: la angiogénesis, la vasculogénesis y el mimetismo vascular [DuBois S.G. *et al.*, 2010].

Estudios previos en el sarcoma de Ewing han demostrado que las células endoteliales asociadas al tumor tienen niveles de proliferación muy elevados. Esto indica un proceso angiogénico activo en este tipo de tumores [DuBois S.G. *et al.*, 2010]. Sin embargo, también está presente el proceso de vasculogénesis, donde las células de sarcoma de Ewing son capaces de reclutar células derivadas de la médula ósea para dar inicio a la formación de vasos sanguíneos [DuBois S.G. *et al.*, 2010, Reddy K. *et al.*, 2008]. Por otra parte, el sarcoma de Ewing es capaz de formar vasos miméticos para mantener el aporte vascular. Esto ha sido explicado a partir de la plasticidad que presentan las células tumorales para permitir la diferenciación de las mismas a un fenotipo más parecido al de una célula madre, que resulta en la adquisición de características de una célula endotelial [Hillen F. *et al.*, 2008; van der Schaft d.W. *et al.*, 2005].

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recursos generales y materiales

En esta sección quedan mencionados todos los equipos, materiales, kits y reactivos utilizados para el desarrollo de esta tesis

a. Equipos

Campana de Flujo Laminar CV-100 (Telstar)
Incubador HERAcell 150 (Thermo Scientific)
Centrífuga 5804 (Eppendorf)
ND-100 Espectrofotómetro (Nanodrop)
Microcentrífuga Modelo CT15E/CT15RE (VWR)
Agitador para tubos de ensayo ECN444-1378 (VWR)
Minicentrífuga Galaxy MiniStar (VWR)
Termobloc Analógico (VWR)
Agitador Titramax 100/101/1000 (Heidolph)
Microscopio Confocal Invertido DMI6000 (Leica TCS SP5)
Máquina de revelado Curix60 (AGFA-Healthcare)
Microscopio Invertido Eclipse 80i (Nikon)
Microscopio Invertido universal IX70 (Olympus)
Termociclador 2720 (Applied Biosystem)

b. Materiales

Placa de cultivo celular no pirogénica estéril 100 mm (Corning)
Flascon de cultivo de 75 cm² con filtro (TPP)
Slides Millicell® EZ 4 pocillos (Millipore)
Criotubos de 1.6 ml (Sartstedt)
Tubos de polipropileno de 15 ml y 50 ml (Sarstedt)
Jeringuillas de insulina de 1 ml, 25 GA 5/8 pulgadas, 0.5x16 mm
Tubos Eppendorf para microcentrífuga 1.5 ml (Daslab)
Placas de 96 pocillos (Kima)

Glass Plates, Mini PROTEAN 1-1.5 mm (Bio-Rad)

Cubeta de electroforesis Mini Protean (Bio-Rad)

Hypercassette™ (Amersham Biosciences)

Amersham Hyperfilm™ ECL, High performance chemiluminiscence film (GE Healthcare)

PureProteome™ Protein A and Protein G Magnetic Beads (Millipore)

Transwell® Permeable Supports (Corning)

Placas de 24 pocillos para cultivo celular (Falcon)

Placas de 12 pocillos para cultivo celular (Corning)

Portaobjetos SuperFrost®Plus (VWR International)

c. Kits

NucleoSpin® Plasmid – Plasmid DNA Purification – (Macherey-Nagel)

EndoFree® Plasmid Maxi Kit – EndoFree Plasmid Purification – (Qiagen)

BCA™ Protein Assay Kit (Pierce)

Total RNA Isolation - Nucleospin® RNA II – (Macherey-Nagel)

Kit Dako para Inmunohistoquímica (Dako)

- Dako Pen (bolígrafo hidrofóbico)
- Diluyente del anticuerpo
- LSAB (Labeled Streptavidin-biotin) + Sistema HRP (Horseradish Peroxidase)
- Diaminobencidina líquida + sustrato

d. Reactivos

Medio RPMI 1640 (Invitrogen)

Suero Fetal Bovino (Invitrogen)

Mitógeno Endotelial Bovino (Biomedical Technologies Inc.)

DMSO – Dimethyl sulfóxido – (Sigma)

Gelatina de piel bovina, tipo B (Sigma)

S.O.C. – Serum optimal broth with catabolite repression – (Invitrogen)

LB – Lennox L Broth – (Acumedia)

Agar – Bacto Agar – (BD Biosciences)
0.05% Tripsina – EDTA 1x (Invitrogen)
Solución de disociación celular no enzimática (Sigma)
PBS Dulbecco 10x sin Ca ni Mg (PAA The cell culture company)
Penicilina/Streptomycin (Invitrogen)
Colagenasa tipo II (Sigma)
FuGENE® 6 Transfection Reagent (Roche)
Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)
Geneticina G-418 Sulfato – Neomicina – (Invitrogen)
Anti-CAV1 (SuperArray Biosciences Corp.)
Vector Control pShC (SuperArray Biosciences Corp.)
Recombinante humano EphrinA1/Fc Chimera (R&D Systems)
Recombinante humano IgG1 Fc (R&D Systems)
IgG Anti-humano de Cabra, Fragmento Específico de Fc (Jackson Immuno Research, Laboratories, Inc)
InSolution™ AKT Inhibitor IV (Calbiochem EMD Millipore)
RIPA Buffer (Pierce)
Inhibidor de Proteasas – Complete Mini – (Roche)
Inhibidor de Fosfatasas – PhosSTOP – (Roche)
30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1 -3.3%C- (Bio-Rad)
Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethane) Ultrapure, MB Grade (USB Corporation)
20% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) Solution, Ultrapure MB Grade (USB Corporation)
APS (Ammonium Persulfate) Ultrapure, ACS Reagent Grade (USB Corporation)
TEMED (Tetramethylethylenediamine) Approx. 99% (Sigma)
Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)
2-Mercaptoethanol, electrophoresis purity reagent (Bio-Rad)
Marcador de Peso Molecular Preteñido Precision Plus Protein Standards, All Blue (Bio-Rad)
Running Buffer (10x TGS – Tris/Glicine/SDS Buffer, 10x) 1x Solution: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3 (Bio-Rad)
Nitrocellulose Membrane, 0.2 µm (Bio-Rad)

Transference Buffer (10x TG – Tris/Glycine Buffer, 10x) 1x Solution: 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3 Towbin Buffer: mix 100 ml 10xTG, 200 ml methanol. 700 ml ddH₂O (Bio-Rad)

Tween® 20, BioXtra (Sigma-Aldrich)

Leche en Polvo Desnatada (ASTURIANA)

Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)

Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)

IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich)

Etanol absoluto para análisis (MERCK)

Metanol (Panreac)

2-propanol (Panreac)

Cristal Violeta (Sigma)

Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Biosciences)

Formaldehido en Solución 4% (MERCK)

Solución de Hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich)

Solución Acuosa de Eosina (Sigma-Aldrich)

Xilol (VWR-Prolabo)

Ácido cítrico monohidratado (MERCK)

Citrato sódico tribásico (Sigma-Aldrich)

DPX, medio de montaje (VWR-BDH)

Suero de cabra, NGS – Normal Goat Serum – (Sigma)

ProLong® Gold antifade reagent with DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole – (Invitrogen)

SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

Oligo(dT) Primer (Invitrogen)

10 mM dNTP Mix (Invitrogen)

Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

100 bp DNA Ladder (Invitrogen)

2. Líneas celulares

a. Cultivo

Las líneas celulares A673, TC252 y STAET1 (cedidas por el Dr. Heinrich Kovar, del Children's Cancer Research Institute, Kinderspitalgasse, Vienna, Austria); RH1 (cedida por el Dr. Peter Houghton, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, EUA); RDES, TC71 y SKES1 (compradas a DSMZ, Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania); y A4573 (cedida por el Dr. Santiago Ramón y Cajal, Departament d'Anatomia Patològica, Hospital Universitari Vall d'Hebron-Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente inactivado a 55°C. Las células PAEC – Células Endoteliales de Aorta de Cerdo – (cedidas por la Dra. Cristina Costa, del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino previamente inactivado a 55°C y con mitógeno endotelial a una concentración de 50 mg/l. Todas las células fueron cultivadas en un incubador humidificado a 37°C de temperatura y en presencia del 5% de CO₂ en el aire. Para todos los experimentos se utilizaron células en desarrollo exponencial sin llegar a la saturación dentro de un margen de 6 pases como máximo.

b. Revestimiento de Placas de cultivo

Para facilitar la adherencia de las células en algunos tipos de superficies, las placas o los portaobjetos fueron tratadas con gelatina al 2% durante 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de esterilidad. Una vez tratadas, fueron lavadas con PBS 1x estéril y utilizadas de manera normal para el cultivo celular.

c. Contaje

El contaje de células para determinar el número a sembrar para cada experimento, fue llevado a cabo en una cámara de Neubauer considerando únicamente las células dentro del área de contaje.

d. Crio-conservación de líneas celulares

Las células se mantuvieron crio-conservadas a pases cortos recogiénolas de manera normal con tripsina y bloqueando la actividad de esta con medio RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino y 1% de antibiótico. Una vez recogidas, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm y el pellet se resuspendió en medio de congelación: medio RPMI 1640 suplementado con 50% de suero fetal bovino, 10% de DMSO y 1% de antibiótico.

3. Recuperación y aislamiento de plásmidos

Los plásmidos cedidos amablemente por la Dra. Paola Chiarugi (Departamento de Ciencias Bioquímicas y el Centro de Investigación, Transferencia y Educación Superior, Universidad de L'Aquila, L'Aquila, Italia) fueron recuperados hidratando el trozo de filtro en 100µl de H₂O destilada, exponiendo 5 minutos en hielo y centrifugando 5 minutos a 3000 rpm. El sobrenadante fue recuperado y cuantificado en el Nanodrop para utilizarlo posteriormente en la transformación de células competentes DH5α. Para la transformación se utilizaron 0.5 µl de cada vector que se pusieron en contacto con 50 µl de células y se dejaron en hielo durante 30 minutos. Después se llevó a cabo un shock térmico de 45 segundos en un baño a 42°C y posteriormente se pasó a hielo durante 2 minutos. A la mezcla se le añadieron 250 µl de medio S.O.C. y se dejó 1 hora en agitación a 37°C a una velocidad de 225 rpm. La mezcla fue sembrada en una placa de LB/Agar con ampicilina (50µg/ml) y una vez crecidas las colonias se picó 1 colonia para crecerla en 2 ml de LB. El tubo fue puesto en un agitador a 37°C durante un tiempo aproximado de 8 horas, procurando llegar a la saturación. Cuando se tuvieron

suficientes bacterias, se llevaron a cabo las Minipreps y las Maxipreps utilizando los kits NucleoSpin y EndroFree respectivamente y siguiendo los protocolos del fabricante.

4. Transfecciones estables y selección de clones

Las transfecciones estables fueron llevadas a cabo utilizando Lipofectamina como agente de transfección. Para tratar las células, se siguió el protocolo del fabricante y la confluencia utilizada fue del 80% de saturación en placas de 12 pocillos. Una vez transcurridas 24 horas, las células fueron pasadas a una placa de 150mm para poder aislar las colonias. Las células transfectadas fueron seleccionadas utilizando neomicina a diferentes concentraciones dependiendo de la línea celular transfectada. Para las líneas A673 y RDES se utilizó una concentración de 0.4 mg/ml, mientras que para las líneas SKES1 y TC71 se utilizó una concentración de 0.8 mg/ml. La selección tuvo lugar durante 14 días. Pasado este tiempo, los pools y colonias del shRNA anti-CAV1, el vector control pShC, así como los vectores EphA2Kd y EphA2ΔCyto resistentes al antibiótico, fueron seleccionados. La eficiencia de la transfección se estableció mediante un análisis de expresión proteica en un western blot o mediante inmunoprecipitación.

5. Ensayo de estimulación con EfnA1

Para demostrar la activación del receptor de membrana EphA2, las células RDES y TC71 fueron estimuladas con la proteína recombinante efrina A1 (EfnA1). Tras 8 horas de crecimiento en medio RPMI 1640 sin suero, las células fueron recogidas con la solución de disociación celular, centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos y lavadas en PBS 1x. Posteriormente fueron resuspendidas en 475 µl de medio RPMI 1640 y estimuladas con 5 µg/ml del recombinante de EfnA1/Fc o de la IgG/Fc en presencia de un anticuerpo IgG Anti-humano de Cabra para el Fragmento Fc. Las células fueron incubadas durante 15 minutos a 37°C en agitación moderada y transcurrido el tiempo, se obtuvo el pellet para el análisis por inmunoprecipitación.

6. Ensayo de inhibición con inhibidores de AKT

La inhibición de AKT en las células RDES, TC71 y A673 fue llevada a cabo utilizando un inhibidor de AKT tipo IV. Este inhibidor impide la fosforilación de AKT sin alterar la actividad de la quinasa PI3K. El inhibidor se utilizó a una concentración de 5 μ M con células cultivadas en medio RPMI 1640 con 10% de suero para demostrar su eficiencia y en medio RPMI 1640 sin suero para demostrar la inhibición de la vía tras el estímulo con EfnA1.

7. Análisis de expresión proteica

a. Obtención de extractos proteicos totales

Los extractos proteicos se obtuvieron por lisis celular utilizando un tampón comercial (RIPA) al que se le añadieron inhibidores de proteasas y de fosfatasas en el momento de la extracción siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células fueron resuspendidas en un volumen entre 40-150 μ l (dependiendo del volumen de células a lisar) e incubadas 30 minutos en hielo (para evitar la degradación de las proteínas). Las muestras fueron centrifugadas 20 minutos a 4°C y a 13000 rpm. El sobrenadante conteniendo el extracto proteico total fue alicuotado en tubos eppendorf de 1.5 ml y guardado a -80°C.

b. Medición de la concentración proteica

La concentración proteica de los extractos se determinó mediante colorimetría utilizando el BCA™ Protein Assay Kit. Para llevar a cabo el ensayo, se siguieron las instrucciones del fabricante. La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 595nm. La curva de calibración se hizo con diluciones seriadas de albúmina.

c. Análisis de expresión por Western Blot

40 µg de extracto proteico total fueron fraccionados en geles de acrilamida-SDS (SDS-PAGE). Los geles de acrilamida se prepararon a un porcentaje adecuado al tamaño de las proteínas analizadas (8-15%) en los cristales adecuados para las cargas utilizadas (1-1.5mm). Una vez preparados y colocados el separador y el concentrador, se colocaron los peines correspondientes y se dejaron polimerizar los geles durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se dispusieron a la misma concentración y volumen del tampón de carga (Laemmli Buffer) y se desnaturalizaron durante 10 minutos a 100°C, tras lo cual fueron cargadas en el gel. Se cargaron también 8µl de marcador de peso molecular preteñido.

La electroforesis fue llevada a cabo a 120V constantes durante 90 minutos en tampón de electroforesis (Running Buffer 1x). Una vez separadas por tamaño durante la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm. La transferencia se realizó en una cubeta de electroforesis durante 70 minutos a 400 mA constantes en tampón de transferencia (Transfer Buffer). Una vez finalizada la transferencia, las membranas pasaron por 2 lavados de 5 minutos con PBS/Tween 0.1% y posteriormente fueron bloqueadas 1 hora en leche al 5% en PBS/Tween 0.1%. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario a una dilución adecuada en leche al 5% en PBS/Tween 0.1%. Tras la incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces durante 5 minutos en PBS/Tween 0.1% e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa. El anticuerpo secundario fue diluido en leche al 5% en PBS/Tween 0.1%. Finalizada la incubación, se llevaron a cabo 3 lavados de 10 minutos con PBS/Tween 0.1%.

Para la detección de las proteínas marcadas con los anticuerpos, se utilizaron los sistemas de quimioluminiscencia ECL® y ECL™ Prime siguiendo las indicaciones de los fabricantes y se expusieron a películas fotosensibles de autoradiografía. El revelado se llevó a cabo con los líquidos habituales de revelado y fijación fotográfica.

La relación de anticuerpos primarios y secundarios, así como las concentraciones utilizadas se detallan a continuación:

Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Dilución	Anticuerpo Secundario
β -Actina AC-15	abcam	(1:10000)	Mouse 1:10000
AKT	Cell Signaling	(1:2000)	Rabbit 1:5000
Phospho-AKT (Thr308)	Cell Signaling	(1:500)	Rabbit 1:2000
Phospho-AKT (Ser473) D9E	Cell Signaling	(1:2000)	Rabbit 1:2000
Phospho Caveolin-1	BD Transduction Laboratories	(1:1000)	Mouse 1:2000
Caveolin-1	BD Transduction Laboratories	(1:10000)	Rabbit 1:10000
p44/42 MAPK (Erk 1/2) (137F5)	Cell Signaling	(1:1000)	Rabbit 1:5000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling	(1:1000)	Rabbit 1:2000
Anti-FGF-2/basic FGF, clone bFM-2	Millipore	(1:500)	Mouse 1:4000
Anti-Eck/EphA2, clone D7	Millipore	(1:1000)	Mouse 1:5000
Alpha Tubulin	abcam	(1:10000)	Mouse 1:10000
Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10	Millipore	(1:1000)	Mouse 1:2000

Anticuerpo Secundario	Casa Comercial
HRP-Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) HRP conjugate	Invitrogen

8. Ensayo de inmunoprecipitación

a. Obtención de extractos proteicos totales

Los extractos proteicos totales se obtuvieron por lisis celular utilizando un tampón de inmunoprecipitación elaborado en el laboratorio. El tampón estaba compuesto por: Tris 50 mM, NaCl 150 mM, e Igepal CA-630 1% con un pH 8. A la mezcla se le añadieron inhibidores de proteasas y de fosfatasa en el momento de la extracción siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células se resuspendieron en 300 μ l del tampón y tras pasar 3 veces por una jeringuilla de insulina e incubar 30 minutos en hielo para evitar la degradación de las proteínas, las muestras fueron centrifugadas 30 minutos a 4°C y a 14000 rpm. El sobrenadante conteniendo el extracto proteico total fue alicuotado en tubos eppendorf de 1.5 ml y guardado a -80°C.

b. Inmunoprecipitación

Los ensayos de inmunoprecipitación fueron llevados a cabo utilizando 500 µg de proteína diluida en 500 µl de tampón de inmunoprecipitación. A la dilución se le añadió la IgG control o el anticuerpo correspondiente a la concentración deseada.

Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Dilución	Concentración
Caveolin-1	BD Transduction Laboratories	(1:100)	1 mg/ml
Anti-Eck/EphA2, clone D7	Millipore	(1:250)	250µg/ml
Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10	Millipore	(1:250)	1 mg/ml
Normal Rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology	(1:200)	50 µg/µl
Normal Mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology	(1:200)	50 µg/µl

Una vez se aplicó el anticuerpo correspondiente, la mezcla del extracto proteico y el tampón fue incubada durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras la incubación, se preparó la proteína G, utilizando *beads* magnéticas de proteína G por presentar mayor afinidad hacia los anticuerpos utilizados. Las *beads* de proteína G fueron utilizadas siguiendo las indicaciones del fabricante y aplicando 50 µl de beads a cada muestra. Finalizada la inmunoprecipitación, las *beads* fueron resuspendidas en 25 µl de tampón de carga (Laemmli Buffer) y se desnaturalizaron durante 10 minutos a 100°C. Finalmente, el tampón fue separado de las *beads* por centrifugación (10 segundos a 3000 rpm) para posteriormente analizar por western blot.

9. Ensayo de migración en Transwells

Para llevar a cabo los ensayos de migración, las células fueron lavadas 2 veces con medio RPMI 1640 sin suero, centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos y sembradas en medio RPMI 1640 sin suero con el 1% de antibiótico. Pasadas 24 horas, las células fueron recogidas con tripsina y bloqueando la actividad de esta con medio RPMI 1640 suplementado con 10% suero fetal bovino y 1% de antibiótico. Una vez contadas en una cámara de Neubauer, las células fueron sembradas a bajas concentraciones (20000-50000 células) en medio RPMI 1640 sin suero y con 1% de antibiótico. Las células fueron sembradas en la parte superior del Transwell dejando en contacto la parte

inferior con el quimio-atrayente (500 μ l). El quimio-atrayente actúa a través de la membrana de policarbonato, pasando por los poros de 8 μ m.

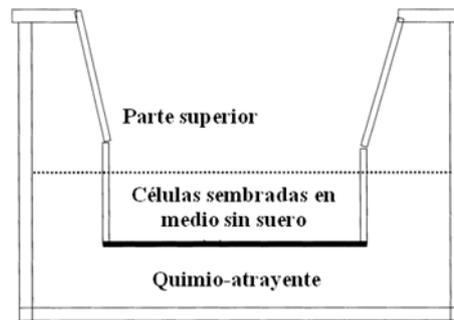


Figura 1. Diagrama representativo de un Transwell. **Modificado de Amore A. *et al.*, 2003**

Pasado el tiempo determinado para cada experimento (24-48 horas), los Transwells fueron recogidos y se llevaron a cabo 2 lavados con PBS 1x pasando el Transwell de un pozo a otro en una placa de 24 pocillos. Tras los lavados, el interior del Transwell se limpió con un bastoncillo de algodón procurando no romper la membrana y dejando así solo aquellas células migradas. Posteriormente, las membranas fueron fijadas durante 30 minutos en etanol al 70% y teñidas 20 minutos con Cristal Violeta al 2%. Pasado el tiempo de la tinción, los Transwells fueron lavados con PBS 1x para eliminar el exceso de cristal violeta y se procedió a separar las membranas del Transwell para montarlas en un portaobjetos. Las membranas fueron montadas en H₂O destilada, cubiertas con un cubre-objetos y selladas con barniz de uñas para evitar que se secaran. Las membranas se analizaron en el microscopio para ver las células migradas y cuantificarlas.

10. Ensayo de Formación Tubular en Matrigel

Para el ensayo de formación tubular en matrigel, primero se prepararon las placas de 12 pocillos con una capa de matrigel de aproximadamente 1 mm de grosor. El matrigel se trabajó en hielo para evitar su gelificación. Una vez formada la capa de matrigel, la placa se dejó 30 minutos dentro del incubador a 37°C permitiendo así su gelificación. Pasado este tiempo, se sembraron 200,000 células en medio RPMI 1640 con 10% de suero y 1% de antibiótico y se dejaron las placas a 37°C dentro del incubador. La

formación tubular se fue revisando constantemente y se fueron tomando fotografías para apreciar las diferencias entre las células sembradas.

11. Ensayos *in vivo*

a. Mantenimiento de animales

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones Nu/Nu atómicos de la casa Harlan, los cuales eran SPF (animales libres de patógenos). Todos los animales eran hembras de 6 semanas de edad y con un peso medio aproximado de 24 g. Los animales estaban estabulados en jaulas apiladas en un rack individual ventilado tipo IIL (IVC) de la casa Allentown que cumple con la normativa vigente. Los ratones se encontraban con una alimentación y bebida *ad libitum* basada en pienso Teckland irradiado de la casa Harlan y agua filtrada y clorada distribuida de manera automática. El espacio en el que se encontraban los animales presentaba una temperatura de 18-22°C, con una humedad relativa del 60-70% y con ciclos de luz de 12 horas con un cambio gradual de 30 minutos.

La limpieza de las jaulas así como la revisión veterinaria se realizó de manera semanal y cumpliendo la normativa establecida por la AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International). Los procedimientos utilizados se encuentran descritos dentro del protocolo de trabajo del Dr. Martínez Tirado (Procedimiento 5768) autorizado por la DAAM (Departamento de Agricultura, Ganadería, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente) de la Generalitat de Cataluña.

b. Desarrollo de xenoinjertos

A cada ratón se le inyectaron de manera subcutánea 4 millones de células previamente cultivadas bajo las condiciones mencionadas con anterioridad. Las células fueron crecidas en medio RPMI 1640 con 10% de suero y sin antibiótico. Para el desarrollo de los xenoinjertos se utilizaron los modelos RDES, SKES1 y TC71 de

CAV1 así como los modelos RDES y TC71 de EphA2Kd. Cada animal recibió dos inyecciones subcutáneas: en el flanco posterior izquierdo se aplicaron los controles (células parentales o transfectadas con el vector vacío) y en el flanco posterior derecho los clones seleccionados con para el Sh de CAV1 y EphA2Kd. En cada inyección se aplicaron de 3 a 5 millones de células resuspendidas en 100 μ l de medio RPMI 1640. La primera medición del desarrollo de los tumores fue llevada a cabo a los 10 días de la aplicación y su evolución fue valorada cada 3 días. Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño deseado, se practicó la eutanasia mediante dislocación cervical (siguiendo las directrices éticas de la institución). Posteriormente a la eutanasia, se extrajeron los tumores para su análisis histológico (guardando una parte del tumor en paraformaldehído al 4%) y para hacer extracción de proteínas y de ARN (guardando el resto de la muestra a -80°C).

12. Análisis histológico

a. Tinción por Hematoxilina/Eosina

Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y embebidas en parafina. Una vez listo el bloque de parafina, se hicieron cortes en el micrótopo con un grosor de 3 μ m. Para el análisis morfológico de los xenoinjertos se hizo una tinción por Hematoxilina/Eosina a partir de la cual se apreciaron las diferencias en la vasculatura y el desarrollo tumoral, así también la presencia de lagos necróticos.

b. Análisis por Inmunohistoquímica

Los cortes de 4 μ m de grosor fueron incubados durante toda la noche a 60°C para facilitar la eliminación de parafina. Posteriormente se procedió a pasar las muestras por la batería de desparafinado e hidratación, pasando las muestras por 3 lavados de 10 minutos en Xilol, Etanol 100%, Etanol al 96%, un lavado de 5 minutos en Etanol al 70% y finalmente H_2O . A continuación de desenmascararon los epítomos utilizando un tampón citrato ph 6 preparado *in situ* (ácido cítrico 0.38 g, citrato sódico 2.41 g y H_2O 1 lt.) e hirviendo las muestras durante 7 minutos a máxima temperatura (240°C)

en una olla a presión. Cuando se atemperaron las muestras se llevaron a cabo dos lavados de 5 minutos con PBS 1x para después exponerlas durante 15 minutos a una solución al 10% de Peróxido de Hidrógeno y 90% de Metanol para eliminar la actividad de las peroxidasas endógenas. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron durante 5 minutos en H₂O corriente y 5 minutos en PBS 1x.

Los análisis por inmunohistoquímica fueron llevados a cabo utilizando el kit de Dako y siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras bloquear 1 hora con el diluyente del anticuerpo, se procedió a poner el anticuerpo primario a la concentración señalada a continuación.

Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Dilución
CD31	abcam	(1:500)
EphA2	Bethyl Laboratories. Inc.	(1:200)
Caveolin-1	BD Transduction Laboratories	(1:1000)

El anticuerpo fue incubado durante toda la noche a 4°C para continuar con la aplicación del anticuerpo biotinilado y la HRP (30 minutos cada uno con un lavado de PBS 1x de por medio). Pasadas las incubaciones, se procedió al revelado con diaminobencidina exponiendo un tiempo máximo de 10 minutos. Terminado el revelado y bloqueado el efecto de la diaminobencidina con H₂O₂, las muestras fueron contrateñidas con Hematoxilina y deshidratadas pasando por una batería de deshidratación. Las muestras fueron pasadas por un lavado de Etanol al 70% y 3 lavados de 5 minutos en Etanol al 96%, Etanol 100% y Xilol para finalmente montar las muestras utilizando medio de montaje DPX. Las muestras fueron analizadas al microscopio invertido.

13. Inmunofluorescencia analizada por microscopia confocal

Los análisis por microscopia confocal fueron llevados a cabo tanto en células como en tejido. Las células fueron sembradas en portaobjetos de 4 pocillos preparados para cultivo y se siguieron las indicaciones del fabricante. Para favorecer la adhesión de las células a los pocillos se utilizó gelatina al 2%. En cada pocillo se sembraron entre

50000 y 100000 células para lograr una confluencia aproximada de un 60-70% pasadas las 24 horas.



Figura 2. Esquema representativo de un portaobjetos de 8 pocillos. **Merck Millipore**

Cuando las células llegaron a la confluencia necesaria, se retiró el medio y se hicieron 3 lavados con PBS 1x para fijar posteriormente las células con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Pasado este tiempo se lavaron las células 3 veces con PBS 1x y se bloquearon durante 1 hora con PBS 1x y 10% de suero normal de cabra a temperatura ambiente en una cámara húmeda e incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente.

Las muestras de tejido de 4 μm de grosor fueron incubadas durante toda la noche a 60°C para facilitar la eliminación de parafina. Posteriormente se procedió a pasar las muestras por la batería de desparafinado e hidratación, pasando las muestras por 3 lavados de 10 minutos en Xilol, Etanol 100%, Etanol al 96%, un lavado de 5 minutos en Etanol al 70% y finalmente H₂Odd. A continuación se desenmascararon los epítomos utilizando un tampón citrato a pH 6 preparado *in situ* (ácido cítrico 0.38 g, citrato sódico 2.41 g y H₂Odd 1lt.) e hirviendo las muestras durante 7 minutos a máxima temperatura (240°C) en una olla a presión. Cuando se atemperaron las muestras se llevaron a cabo dos lavados de 5 minutos con PBS 1x y se bloquearon durante 1 hora con PBS 1x y 10% de suero normal de cabra temperatura ambiente en una cámara húmeda para dejar durante toda la noche con el anticuerpo primario a la dilución correspondiente.

Pasado este tiempo, se siguió con el protocolo establecido tanto para células como para tejido. Se hicieron 3 lavados en PBS 1x y se puso el anticuerpo secundario durante

1 hora a la dilución correspondiente en PBS 1x y 10% de suero normal de cabra a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Finalizado este tiempo se llevaron a cabo 2 lavados con PBS 1x y dos lavados con H₂Odd. Las muestras fueron montadas utilizando medio de montaje ProLong con DAPI.

Anticuerpo Primario	Casa Comercial	Dilución	Anticuerpo Secundario
Caveolin-1	BD Transduction Laboratories	(1:1000)	594 Rabbit 1:1000
Anti-Eck/EphA2, clone D7	Millipore	(1:200)	488 Mouse 1:150
Phospho-FAK (Tyr397)	Cell Signaling	(1:50)	594 Rabbit 1:1000

14. Análisis de expresión por RT-PCR

El ARN se obtuvo utilizando el kit para extracción Nucleospin® RNA II siguiendo las indicaciones del fabricante. Cuando se obtuvieron los extractos, se cuantificaron las concentraciones utilizando un Nanodrop. Para llevar a cabo los análisis por RT-PCR se retrotranscribieron 2 µg de ARN total para la síntesis de ADN monocatenario utilizando la enzima SuperScript. Los cebadores (Invitrogen) utilizados se mencionan a continuación:

Tamaño	Cebador	Dirección	Secuencia	Temperatura de hibridación
354	bFGF	<i>Forward</i>	GGCTTCTTCCTGCGCATCCA	60°C
		<i>Reverse</i>	GCTCTTAGCAGACATTGGAAGA	
237	PDGF-A	<i>Forward</i>	CCCCTGCCCATTCGGAGGAAGAG	62°C
		<i>Reverse</i>	TTGGCCACCTTGACGCTGCGGTG	
435	PDGF-B	<i>Forward</i>	GATCCGCTCCTTTGATGATC	60°C
		<i>Reverse</i>	GTCTCACACTTGCATGCCAG	
450	MK	<i>Forward</i>	ATGCAGCACCGAGGCTTCCT	58°C
		<i>Reverse</i>	ATCCAGGCTTGCGTCTAGT	
183	TGFB1	<i>Forward</i>	TGCTGCCGCTGCTGCTAC	59°C
		<i>Reverse</i>	GCACCTCCCCCTGGCTC	
100/230 /300	VEGF (121/165/ 189)	<i>Forward</i>	CACATAGGAGAGATGAGCTTC	59°C
		<i>Reverse</i>	CCGCCTCGGCTTGTCACAT	
326	EfnA1	<i>Forward</i>	CGGAATGAGGACTACACCATACATGTGCAGC	58°C
		<i>Reverse</i>	AAGCAGCGGTCTTCATGCTGGTGGATGGGTT	
432	Actina	<i>Forward</i>	CGGGACCTGACTGACTACCTC	59.5°C
		<i>Reverse</i>	CTTCATTGTGCTGGGTGC	

Para llevar a cabo las amplificaciones se utilizaron cebadores específicos. Para cada pareja de cebadores se ajustaron los números de ciclos obteniendo un valor estimado semicuantitativo de la abundancia de ARN mensajero relativo. Las RT-PCRs fueron repetidas 2 veces como mínimo.

15. Análisis de muestras humanas

Las muestras humanas recibidas por parte de los clínicos fueron biopsias frescas así como bloques de parafina o portaobjetos con arrays de tejido. Para el análisis histológico de las muestras tumorales, fueron cedidas 28 muestras de pacientes: 13 del Banco de Tumores del Hospital Sant Joan de Déu (Barcelona) y 15 del Centro de Investigación del Cáncer – IBMCC (Barcelona). Todas las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, embebidas en parafina y ninguna pasó por el proceso de descalcificación. En cuanto a la información clínica de las muestras, solo se tuvo acceso a los datos del Hospital Sant Joan de Déu.

16. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos por duplicado o triplicado, llevando a cabo el análisis de datos mediante el ANOVA y el T-Test (GraphPad Software) para determinar las diferencias significativas. Se consideró significativo aquel p-valor menor o igual a 0.05.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Demostrar que CAV1 juega un papel importante en el desarrollo vascular del sarcoma de Ewing.

Objetivos Particulares

1. Confirmar que CAV1 es necesaria para la vascularización tumoral *in vivo* en el sarcoma de Ewing.
 - 1.1. Comparar la vasculatura entre tumores inducidos en ratones inmuno-deprimidos utilizando células de sarcoma de Ewing que presentan niveles altos de CAV1 con sus respectivos modelos de baja expresión desarrollados en el laboratorio.
2. Determinar el mecanismo a través del cual CAV1 regula la angiogénesis en el sarcoma de Ewing.
 - 2.1. Comparar la capacidad de proliferación y migración de células endoteliales utilizando medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1.
 - 2.2. Analizar el patrón de expresión de diferentes factores pro-angiogénicos secretados al medio por las células de sarcoma de Ewing.
 - 2.3. Comparar los patrones de expresión en los modelos de baja expresión de CAV1.
3. Determinar el mecanismo molecular a través del cual CAV1 regula la angiogénesis en el sarcoma de Ewing.
 - 3.1. Analizar la posible interacción entre CAV1 y el receptor EphA2
 - 3.2. Analizar los efectos en la señalización regulada por EphA2 producidos por la falta de CAV1.

4. Determinar la implicación de CAV1 y EphA2 en el mimetismo vascular en el sarcoma de Ewing.
 - 4.1. Comparar la vasculatura entre tumores inducidos en ratones inmuno-deprimidos utilizando células de sarcoma de Ewing e identificar vasos angiogénicos y miméticos.
 - 4.2. Analizar los efectos de CAV1 en el proceso de mimetismo vascular en el sarcoma de Ewing.
 - 4.3. Analizar el efecto de la actividad quinasa-dependiente e -independiente de EphA2 en el proceso de mimetismo vascular.

RESULTADOS

1. Confirmar que CAV1 es necesaria para la vascularización tumoral *in vivo* en el sarcoma de Ewing.

1.1. Comparar la vasculatura entre tumores inducidos en ratones inmunodeprimidos utilizando células de sarcoma de Ewing que presentan niveles altos de CAV1 con sus respectivos modelos de baja expresión desarrollados en el laboratorio.

1.1.1 Desarrollo de modelos *in vitro* de baja expresión de CAV1 en líneas celulares de sarcoma de Ewing

Trabajos previos han descrito a *CAV1* como un gen asociado a metástasis que es una diana transcripcional directa de EWS/FLI1, así como un determinante del fenotipo oncogénico y tumorigénico del sarcoma de Ewing [Tirado O.M. *et al.*, 2006].

A partir de las líneas celulares de sarcoma de Ewing RDES, SKES1 y TC71 se desarrollaron modelos de baja expresión de CAV1. Las tres líneas seleccionadas poseen la translocación *EWS/FLI1*. Para conseguir la disminución en la expresión de CAV1, se llevó a cabo una transfección estable en la que se utilizó un shRNA anti *CAV1* y un shRNA con una secuencia aleatoria, *pShC*, que no reconoce ninguna secuencia en particular como control. Tras permitir el desarrollo de las colonias en medio de selección, algunas fueron seleccionadas de manera independiente mientras que con el resto de las colonias se llevaron a cabo *pools*. Una vez crecidas las colonias aisladas, para determinar la eficiencia de la transfección estas fueron analizadas por western blot (Figura 10).

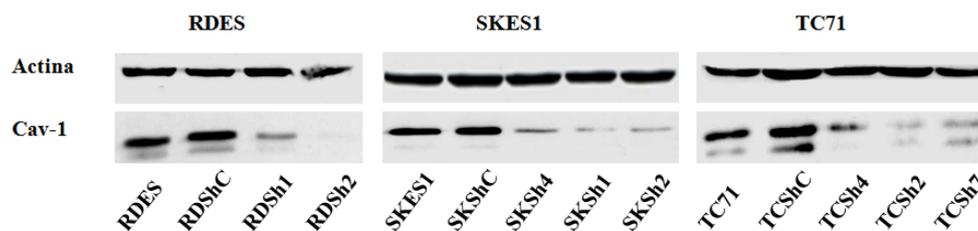


Figura 10. Análisis por western blot de los modelos establecidos con líneas celulares de sarcoma de Ewing para ver la reducción en la expresión de CAV1 en las colonias seleccionadas tras la transfección estable.

El análisis por western blot permitió confirmar la reducción en la expresión de CAV1 en las colonias seleccionadas (denominadas a partir de ahora como clones). También fue posible demostrar una disminución significativa en los *pools* de las líneas celulares TC71 y SKES1, confirmando así la eficiencia de la transfección en la mayoría de las células. En el modelo RDES, por el contrario, el *pool* de las colonias restantes no se mantuvo debido a que la expresión de CAV1 no se redujo de manera significativa. Por otra parte, aquellas células en las que se transfectó el vector control mantuvieron la expresión de CAV1 de manera similar a la de las células no transfectadas. Los resultados obtenidos demuestran la especificidad de los shRNAs utilizados. Este análisis llevó al establecimiento de un modelo *in vitro* de baja expresión de CAV1 y dio margen a la continuación de los experimentos para el desarrollo del modelo *in vivo*.

1.1.2 Desarrollo de modelos *in vivo* de baja expresión de CAV1 (formación y análisis de xenoinjertos)

Basándonos en los resultados obtenidos a partir de los análisis por western blot de los modelos de baja expresión de CAV1, se llevó a cabo el desarrollo de xenoinjertos en ratones atímicos. El análisis de los datos fue efectuado de manera independiente en cada uno de los modelos. Los resultados mostraron una tendencia constante a la disminución en el tamaño de los tumores inducidos por los clones (shCAV1) y a un aumento en el tamaño de aquellos xenoinjertos inducidos por los controles (células no transfectadas y células transfectadas con el shRNA control). Los valores obtenidos demuestran la reproducibilidad de los experimentos (Figura 11).

La gráfica correspondiente al modelo RDES muestra una diferencia significativa en el desarrollo tumoral al comparar los controles y los clones (Figura 11A). En la imagen se puede apreciar que los valores de los controles cuadriplican aquellos valores obtenidos por los clones shCAV1, correlacionándose además con las características físicas (donde los controles son más sanguinolentos que los clones) y la incidencia de los tumores (Figuras 11B y 11C). En el modelo TC71, se muestran diferencias menos marcadas tanto en el desarrollo como en la incidencia tumoral (Figuras 11D y 11E). Sin embargo, la irrigación es mucho más clara. Mientras que los controles presentan una irrigación más homogénea, los shCAV1 presentan un color blanquecino relacionado con poca irrigación (Figura 11F). Por otra parte, en el modelo SKES1, aunque las diferencias físicas no son tan relevantes (Figura 11I), en la tabla de incidencia es posible apreciar que los controles duplican los valores de desarrollo tumoral obtenidos por los shCAV1 (Figura 11H). Es importante resaltar que, aunque las diferencias físicas son menos evidentes en cuanto al tamaño, es posible apreciar una variación significativa en los valores de los volúmenes (Figura 11G).

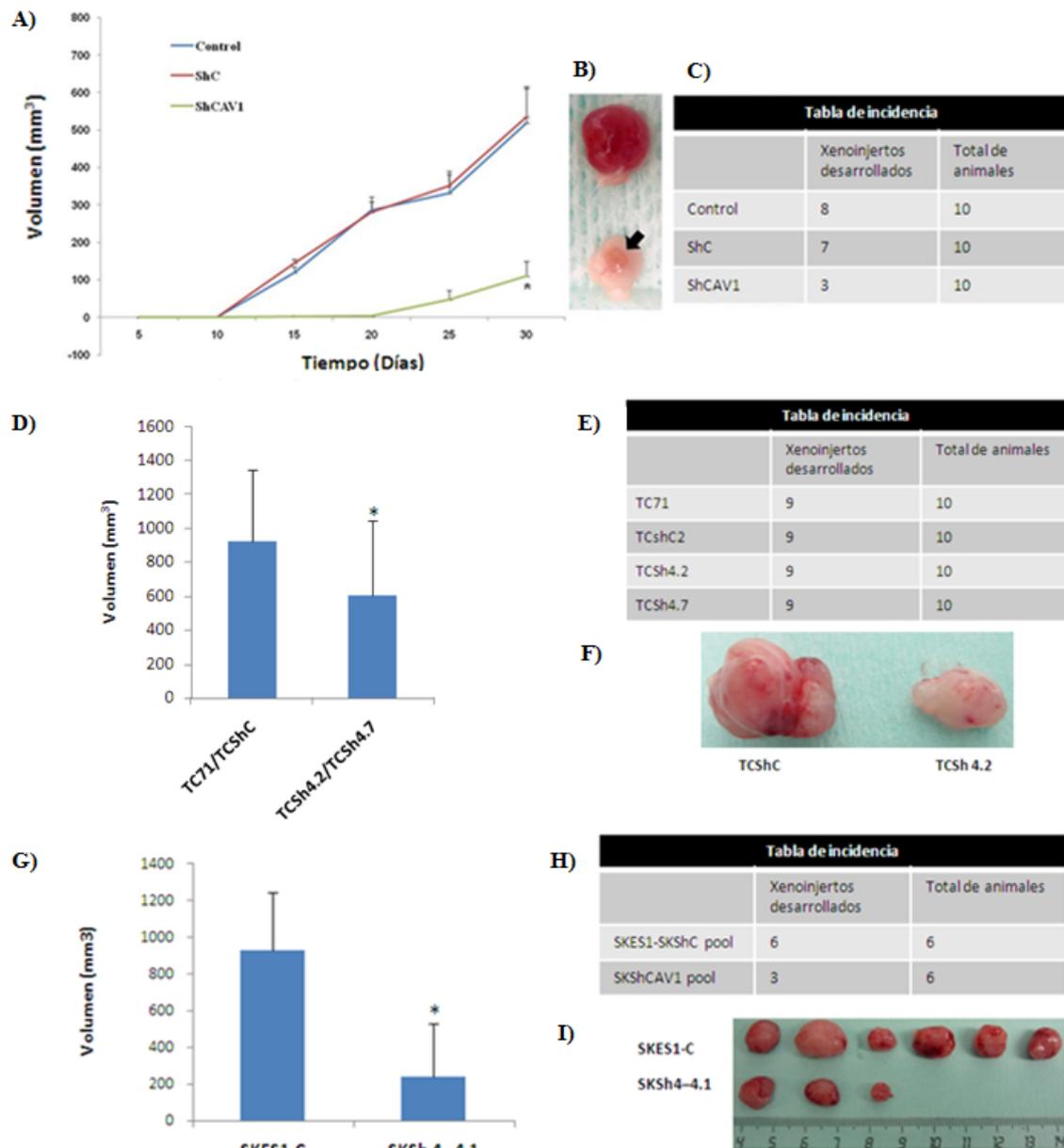


Figura 11. Representación de los modelos *in vivo* de RDES, SKES1 y TC71. **A-C** Modelo de RDES, **A)** Evolución tumoral de los controles (parental y shRNA control) y los clones de baja expresión de CAV1 (* $P < 0.0001$). **B)** Xenoinjertos representativos de los controles (arriba) y de los clones (abajo). La flecha señala el tumor, mientras que el tejido circundante es tejido adiposo. **C)** Tabla de incidencia tumoral del modelo. **D-F** Modelo TC71, **D)** Media de los valores totales de desarrollo tumoral de los controles y los clones (* $P = 0.0281$). **E)** Tabla de incidencia tumoral del modelo. **F)** Xenoinjertos representativos de los controles (izquierda) y de los clones (derecha). **G-I** Modelo SKES1, **G)** Media de los valores totales de desarrollo tumoral de los controles y los clones (* $P = 0.015$). **H)** Tabla de incidencia tumoral del modelo. **I)** Xenoinjertos representativos de los controles (arriba) y los clones (abajo).

El análisis de los resultados obtenidos permite apreciar que en los modelos las diferencias son significativas: RDES ($P < 0.0001$), TC71 ($P = 0.015$) y SKES1 ($P = 0.0281$). Estos datos se correlacionan con las características físicas de los tumores. Mientras que los tumores de los controles presentan un aspecto más sanguinolento y son de mayor tamaño (mayor irrigación), los tumores de los clones presentan un color más blanquecino y un tamaño más reducido (menor irrigación). La comparación de los resultados muestra una reducción significativa en los tres modelos (Figura 12), donde el modelo RDES presenta más de un 50% de reducción en el volumen tumoral de los clones, mientras que los modelos TC71 y SKES1 presentan un 50% aproximadamente, considerando sus desviaciones estándar.

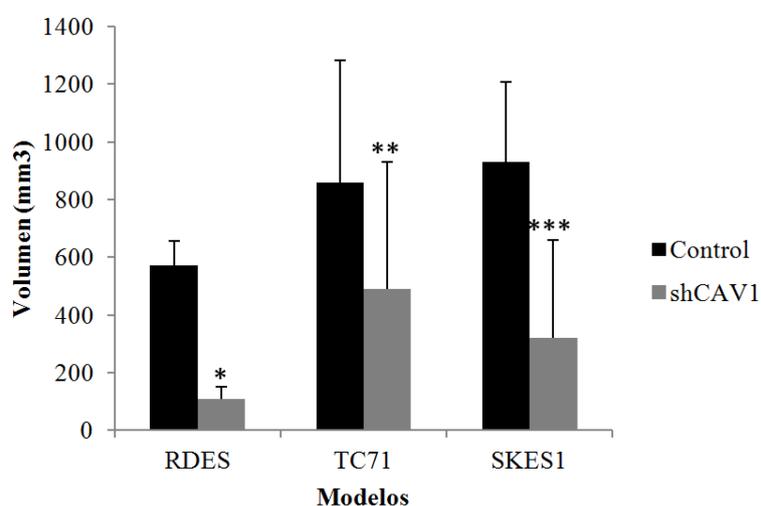


Figura12. Gráfica comparativa de los volúmenes tumorales. El volumen tumoral de los controles y el de los shCAV1. (* $P < 0.0001$), (** $P = 0.015$), (***) $P = 0.0281$)

1.1.3 Análisis de la formación de vasos en los xenoinjertos de los modelos de baja expresión de CAV1

Una vez analizadas las características físicas de los tumores y considerada la reproducibilidad del modelo *in vivo*, se dio paso al análisis de los xenoinjertos. Los cortes, con un grosor de 3 μm fueron analizados morfológicamente mediante una tinción con Hematoxilina/Eosina. La tinción permitió apreciar las diferencias a nivel estructural en cada modelo (Figura 13).

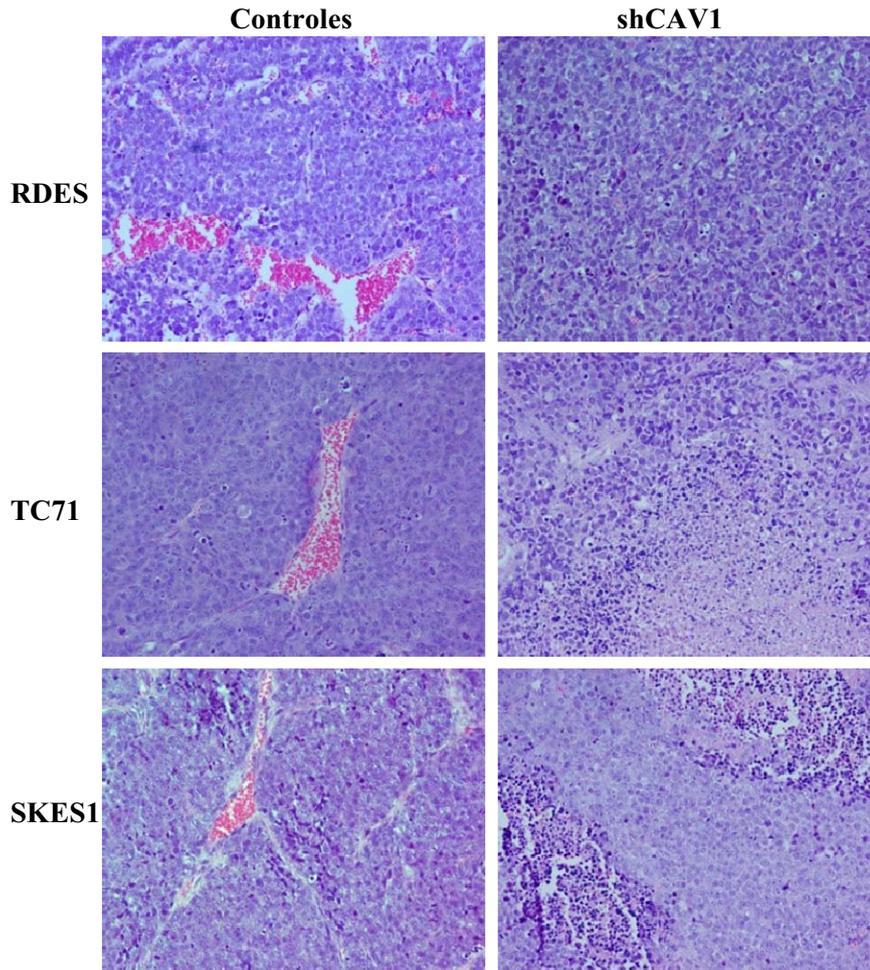


Figura 13. Tinción con Hematoxilina/Eosina. El panel muestra la diferencia en la vasculatura entre los tumores de los controles y los tumores de los shCAV1 en los tres modelos (x200).

En el modelo RDES es posible apreciar la gran formación de vasos presentes en los controles al compararlos con los shCAV1, donde los vasos son mucho más pequeños y no se aprecian del todo. En el modelo TC71 es posible observar la formación de vasos de gran tamaño en los controles de la misma manera que en el modelo SKES1, sin embargo, en este último los vasos se encuentran rodeados por una gran cantidad de estroma. Al analizar los shCAV1 en ambos modelos (TC71 y SKES1), es posible apreciar la formación de vasos de menor tamaño, incapaces de irrigar todo el tumor. Ha de considerarse que la falta de vasos sanguíneos conlleva la aparición de lagunas necróticas a lo largo del tumor. Estas lagunas necróticas se relacionan con el color

blanquecino de los tumores de los shCAV1. Los resultados obtenidos sugieren que existe una relación directa entre la expresión de CAV1 y el desarrollo vascular tumoral.

Para confirmar la presencia de vasos sanguíneos y confirmar lo observado en la tinción con Hematoxilina/Eosina, se realizó una inmunohistoquímica para CD31 (proteína de transmembrana presente en las células endoteliales). Este análisis permitió apreciar cuales eran los vasos sanguíneos formados por células endoteliales y diferenciarlos así de otras estructuras vasculares. Aquellos vasos positivos para CD31 sugieren su formación por angiogénesis (Figura 14).

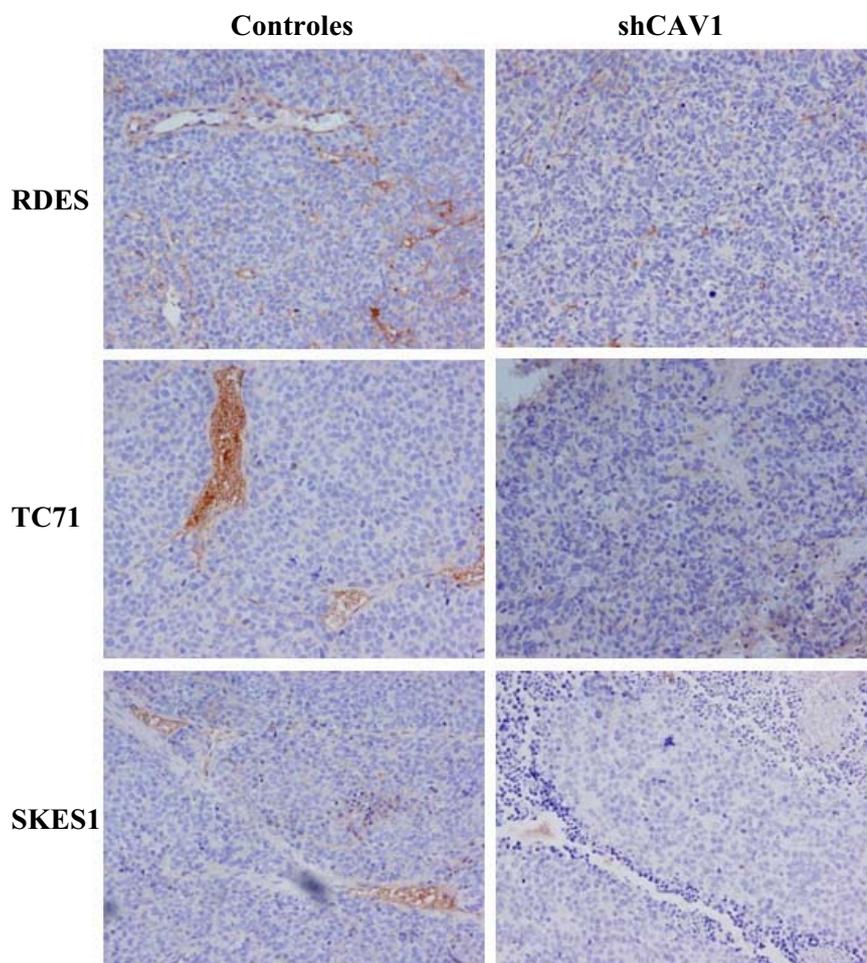


Figura 14. Inmunohistoquímica para CD31. El panel muestra la diferencia en la vasculatura entre los tumores de los controles y los tumores de los shCAV1 en los tres modelos (x200).

El análisis de los datos obtenidos permitió apreciar la diferencia entre la vasculatura de los controles al compararlos con los shCAV1. En los tres modelos es posible apreciar

la formación de vasos sanguíneos formados por células endoteliales. Los resultados de la inmunohistoquímica mostraron además una clara diferencia entre la vasculatura de los controles al compararlos con los shCAV1 confirmando también los resultados obtenidos tras la tinción con Hematoxilina/Eosina. En el modelo RDES es posible apreciar que los vasos sanguíneos de los clones son mucho más pequeños al compararlos con los controles, mientras que en los modelos TC71 y SKES1 los clones prácticamente no presentan vasos sanguíneos. Al contrario, los clones de los modelos TC71 y SKES1 presentan mayor número de sitios necróticos. Para validar estos resultados fue llevado a cabo un análisis de la densidad micro-vascular, donde se consideraron únicamente los vasos sanguíneos positivos para CD31 (Figura 15).

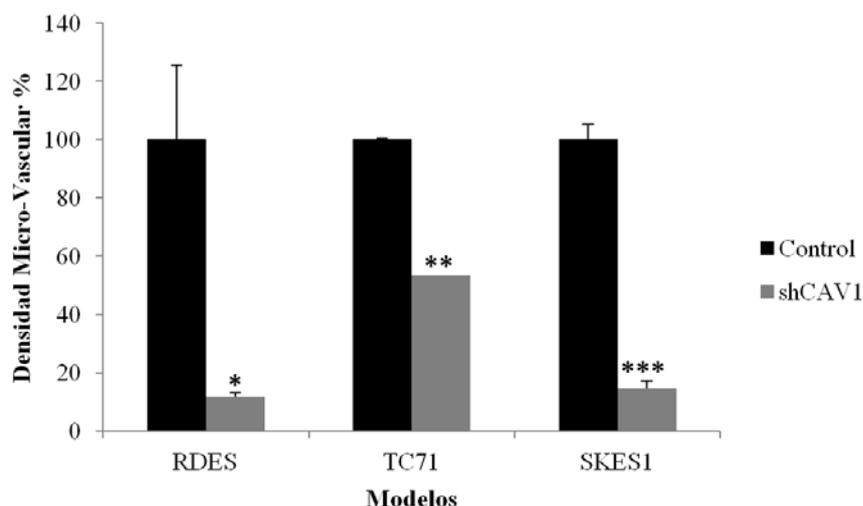


Figura 15. Gráfica comparativa de la densidad micro-vascular entre los 3 modelos. En todos ellos se aprecia que la reducción de la densidad vascular al comparar los controles con los shCAV1 es significativa. (* $P < 0.0458$), (** $P = 0.0148$), (***) $P = 0.0178$)

En la gráfica se muestran los valores obtenidos tras el análisis de la densidad micro-vascular. Los resultados muestran diferencias significativas apreciables en cualquiera de los modelos: RDES ($P < 0.0458$), TC71 ($P = 0.0148$) y SKES1 ($P = 0.0178$). Cada uno de los modelos fue analizado de manera individual estableciendo el número de vasos de los controles como un 100%. Como se puede apreciar, el modelo RDES es el que marca más la diferencia en cuanto al número de vasos sanguíneos al comparar los clones con los controles sin llegar a un 20% en la formación de vasos sanguíneos positivos para CD31. En el modelo TC71 los clones presentaban un número reducido de vasos

sanguíneos en comparación con los controles. Sin embargo, el modelo presentaba aproximadamente un 50% de diferencia en su densidad micro-vascular, además de un número de islas necróticas mucho más elevado. En el modelo SKES1 a pesar de las islas necróticas y el estroma, los vasos sanguíneos se encontraban reducidos casi a los mismos niveles del modelo RDES. Estos datos se correlacionan con las características físicas y morfológicas de los tumores obtenidos a partir de los modelos de baja expresión de CAV1.

2. Determinar el mecanismo a través del cual CAV1 regula la angiogénesis en el sarcoma de Ewing.

2.1. Comparar la capacidad de proliferación y migración de células endoteliales utilizando medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1.

2.1.1 Determinación de la capacidad de proliferación de las células endoteliales a partir de medios condicionados de los modelos RDES y SKES1 de baja expresión de CAV1

La influencia de CAV1 en el desarrollo vascular ha sido sugerida previamente en otros modelos de sarcoma de Ewing [Tirado O.M. *et al.*, 2006] así como en modelos de líneas de adenocarcinoma, carcinoma escamoso y cáncer de próstata [Phillips y Birnby, 2004; Thompson T.C. *et al.*, 2010.]. Teniendo en cuenta estos estudios, los resultados obtenidos en los experimentos anteriores y observando el efecto de la supresión de CAV1 en el desarrollo vascular, se decidió analizar el efecto que tenían las células tumorales de sarcoma de Ewing sobre las células endoteliales.

Considerando la secreción de diferentes factores de crecimiento por parte de la célula tumoral, se obtuvieron medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1 (RDES y SKES1). Estos medios fueron utilizados para cultivar células endoteliales (PAEC –*Porcine Aortic Endothelial Cells* o células endoteliales de aorta de cerdo) y ver así efectos en la capacidad de proliferación de las células (Figura 16).

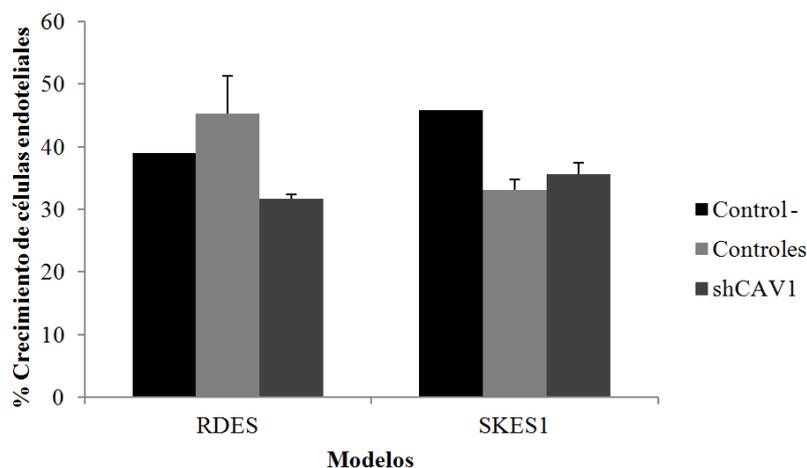


Figura 16. Gráfica de proliferación de células endoteliales. Cuantificación de células endoteliales creciendo en medios condicionados de los modelos RDES y SKES1 de baja expresión de CAV1 comparando el crecimiento en medio sin suero como control negativo (Control-). El porcentaje hace referencia al número de células crecidas basándose en un control positivo de células crecidas en medio con suero.

Los resultados mostraron que no hay efectos apreciables en la diferencia de crecimiento de las células endoteliales. Cuando se compara su proliferación en medio sin suero con su proliferación en medios condicionados es posible ver que únicamente en el modelo RDES existe una ligera diferencia no significativa, mientras que en el modelo SKES1 la diferencia es prácticamente inexistente. Estos resultados sugieren que los factores de crecimiento secretados por las células tumorales del sarcoma de Ewing no activan señales de proliferación en las células endoteliales, o bien, que los factores secretados no son suficientes para promover la proliferación de las células endoteliales.

2.1.2 Determinación del efecto migratorio de los medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1 sobre las células endoteliales

Teniendo en cuenta que los medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1 no fueron capaces de inducir proliferación en las células endoteliales, se procedió a analizar el efecto pro-migratorio de los mismos. Mediante el uso de Transwells, se estudió el efecto migratorio de los medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1 en las células endoteliales PAEC. Utilizando los medios condicionados concentrados como quimio-atrayentes se pudo determinar si éstos eran

capaces de inducir la migración de células endoteliales a través de los poros de los Transwell (Figura 17).

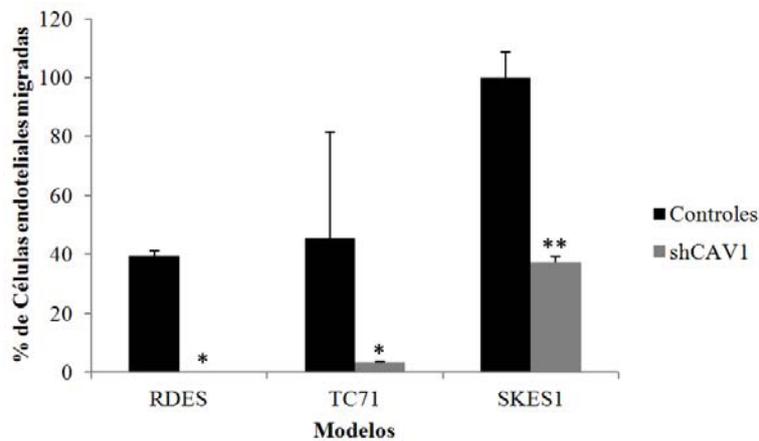


Figura 17. Ensayo de migración de células endoteliales. Cuantificación de células endoteliales migradas en transwells utilizando medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1. (* $P \leq 0.008$; ** $P = 0.01$)

Los resultados mostraron el efecto atrayente de los medios condicionados de los controles sobre las células endoteliales, siendo en los tres casos considerablemente significativos: RDES y TC71 ($P \leq 0.008$), SKES1 ($P = 0.01$). Del mismo modo que el experimento de proliferación, los modelos fueron analizados por separado, considerando el número de células endoteliales migradas. Las diferencias en el número de células migradas en los controles, sugieren que el modelo SKES1 es capaz de inducir mucha más migración que el modelo TC71 y éste a su vez inducir más migración que el modelo RDES. Estos datos pueden entenderse de esta manera, puesto que el número de células PAEC utilizadas, así como el tiempo de exposición al quimio-atrayente fue el mismo en los tres modelos. Estos resultados sugieren la activación de la migración en las células endoteliales es estimulada por factores secretados por las células tumorales del sarcoma de Ewing.

2.1.3 Determinación de la vía activada en las células endoteliales tras el estímulo con medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1

La migración de las células endoteliales es esencial para el proceso angiogénico. Este proceso necesita la regulación de los estadios contráctiles y no contráctiles de la célula. Para esto, es indispensable la integración de diferentes señales y estímulos que involucran la activación de pequeñas GTPasas de la familia RHO, PI3K y eNOS, SAPK2/p38 y la fosforilación de FAK (Quinasa de Adhesiones Focales o *Focal Adhesion Kinase*) [Lamalice L. *et al.*, 2007]. FAK es una quinasa que contribuye a la formación de las fibras de estrés en las células endoteliales. Estas estructuras generan la fuerza contráctil requerida para mover y dirigir a la célula endotelial en una migración dirigida. Además, juega un papel importante en la adhesión, extensión (*spreading*), movilidad y proliferación celular, invasión, angiogénesis y supervivencia [Lamalice L. *et al.*, 2007]. Basándonos en los resultados previos, decidimos llevar a cabo una inmunofluorescencia para analizar la fosforilación de FAK en las células endoteliales PAEC. Para ello, el medio condicionado del modelo TC71 de baja expresión de CAV1 fue obtenido y utilizado como medio de cultivo de las células endoteliales (Figura 18).

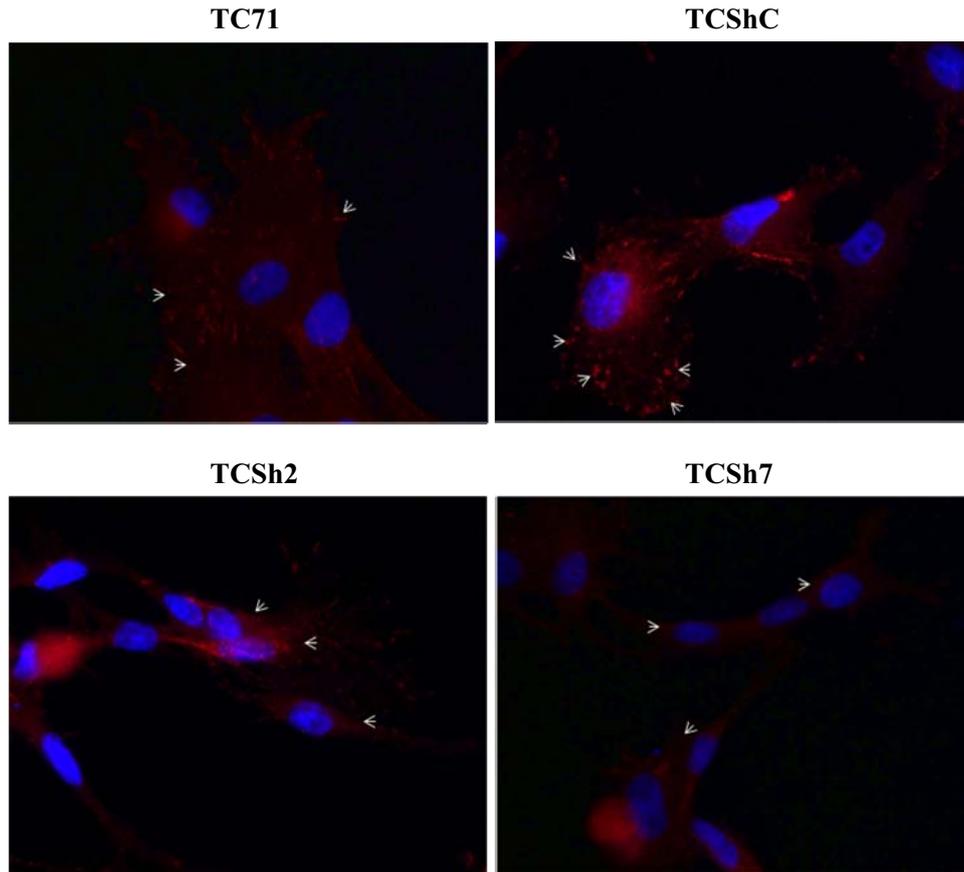


Figura 18. Inmunofluorescencia para fosfo-FAK. Células endoteliales cultivadas con medios condicionados del modelo TC71 de baja expresión de CAV1, muestran una reducción de las puntas (*sprouts*) de fosfo-FAK (x400).

Los resultados permitieron observar que las células endoteliales PAEC cultivadas con el medio condicionado de las células de baja expresión de CAV1 mostraron una reducción en la activación de FAK así como una localización perinuclear de la proteína. Por el contrario, las células endoteliales cultivadas con el medio condicionado de los controles presentaron una mayor activación de FAK, especialmente en las puntas (*sprouts*) de las células (Figura 18). Estos resultados sugieren la producción de un factor de crecimiento secretado por las células tumorales del sarcoma de Ewing, capaz de inducir la migración de las células endoteliales hacia el tumor.

2.2. Analizar el patrón de expresión de diferentes factores pro-angiogénicos secretados al medio por las células de sarcoma de Ewing.

2.2.1 Análisis de los factores de crecimiento producidos y secretados por las células de sarcoma de Ewing

Para determinar la relación entre la activación de FAK en las células endoteliales por un factor de crecimiento secretado por las células tumorales de sarcoma de Ewing, decidimos analizar diferentes factores descritos en la literatura: PDGF-A (*Platelet-derived growth factor subunit A*), PDGF-B (*Platelet-derived growth factor subunit B*), MK (*Midkine* o también *neurite growth-promoting factor 2*), TGFB1 (*Transforming Growth Factor Beta 1*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y bFGF (*Basic fibroblast growth factor*) (Figura 19). Estos factores se encuentran relacionados con el proceso angiogénico en diferentes modelos tumorales.

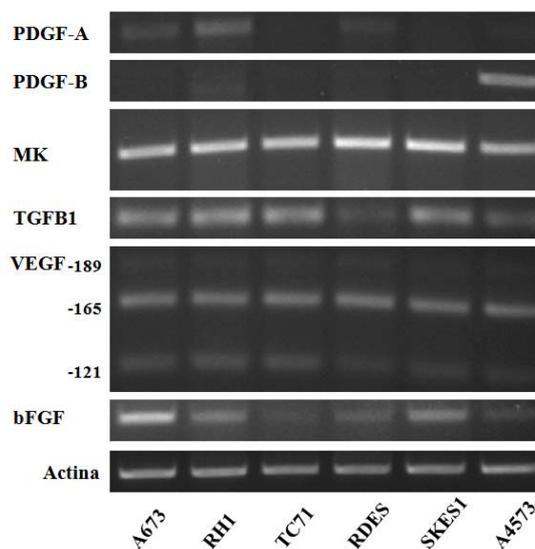


Figura 19. Expresión de factores pro-angiogénicos en líneas de sarcoma de Ewing. Análisis por RT-PCR.

El análisis por RT-PCR de los diversos factores en diferentes líneas de sarcoma de Ewing, permitió seleccionar a aquellos que se encontraban expresados de manera constante. Como lo muestra la figura, para PDGF-A, la expresión de los diferentes

factores no es homogénea en todas las líneas celulares, encontrándose ausente o poco expresada en las líneas TC71, SKES1 y A4573. PDGF-B no se encuentra expresado tampoco en todas las líneas celulares analizadas o bien sus niveles de expresión son mucho más bajos (A673, TC71, RDES y SKES1). Los resultados para MK y VEGF muestran que se encuentran expresados a los mismos niveles en todas las líneas celulares, mientras que bFGF y TGFB1 presentan una ligera reducción en su expresión en algunas de las líneas (TC71-RDES-A4573 y RDES respectivamente). Es importante mencionar que en VEGF podemos ver las tres isoformas posibles: -189, -165 y -121. La función de estas tres isoformas ha sido descrita al participar en procesos de vascularización, cicatrización y particularmente en la angiogénesis patológica, participando directamente en la proliferación celular endotelial [Van Bergen T. *et al.*, 2011]. Sin embargo, la expresión de los factores de crecimiento tenía que encontrarse relacionada con la expresión de CAV1. Debido a esto, se procedió a analizar los factores expresados de manera constante en todas las líneas celulares analizadas pero esta vez sobre los modelos de baja expresión de CAV1.

2.3. Comparar los patrones de expresión en los modelos de baja expresión de CAV1.

2.3.1 Comparación de los patrones de expresión de diferentes factores pro-angiogénicos en los modelos de baja expresión de CAV1

Para poder establecer la conexión entre la expresión de CAV1 y la expresión de los factores de crecimiento, los mismos factores analizados en las líneas de sarcoma de Ewing fueron analizados en 3 modelos de baja expresión de CAV1 (Figura 20). De estos tres modelos, el modelo A673 (desarrollado previamente por el grupo [Sáinz-Jaspeado m. *et al.*, 2010]) decidió incluirse para sustituir a RDES. Este cambio fue llevado a cabo debido a la facilidad que presentaba trabajar con el modelo A673 y a que los niveles de expresión de CAV1 eran similares a los de los otros modelos.

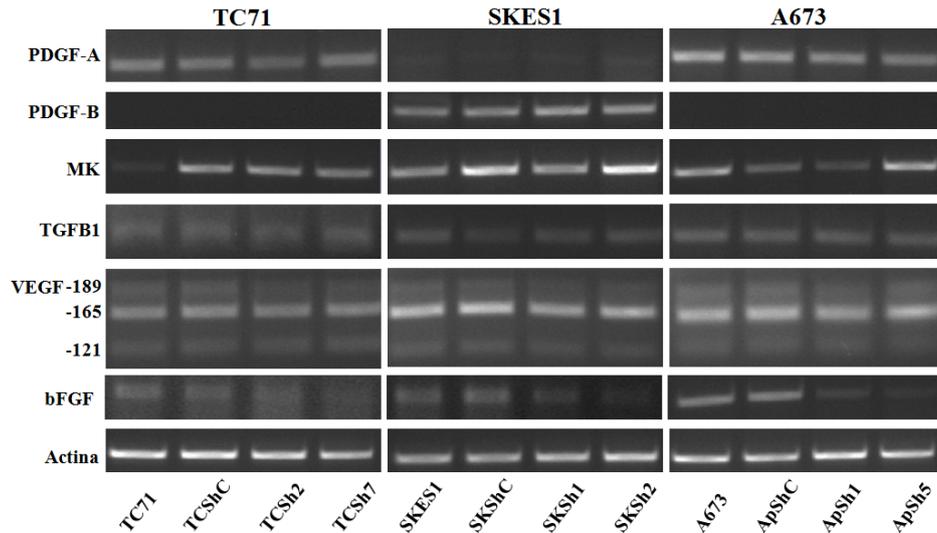


Figura 20. Expresión de los diferentes factores de crecimiento en modelos de baja expresión de CAV1. Análisis por RT-PCR.

Los resultados obtenidos permitieron conocer cuáles eran aquellos factores cuya expresión se veía afectada por la falta de CAV1. En la figura anterior es posible observar que ninguno de los factores analizados en los 3 modelos de baja expresión de CAV1 presentaba modificaciones significativas y constantes al compararlos. PDGF-A se encontró reducido en el modelo SKES1, pero no presentó diferencias entre las células transfectadas y las no transfectadas. PDGF-B apareció ausente en los modelos TC71 y A673. MK presentó unos niveles de expresión variables que no mostraban relación alguna con la pérdida de CAV1, mientras que TGFB1 no presentó ningún tipo de alteración como consecuencia de la pérdida de CAV1 del mismo modo que VEGF en cualquiera de sus isoformas. Esta falta de modificaciones en la expresión de VEGF puede sugerir una posible respuesta a la falta de proliferación de las células endoteliales PAEC al estar en contacto con el medio condicionado de los modelos de baja expresión de CAV1. Sin embargo, el factor de crecimiento que se vio afectado de la misma manera en los tres modelos fue bFGF (Figura 21).

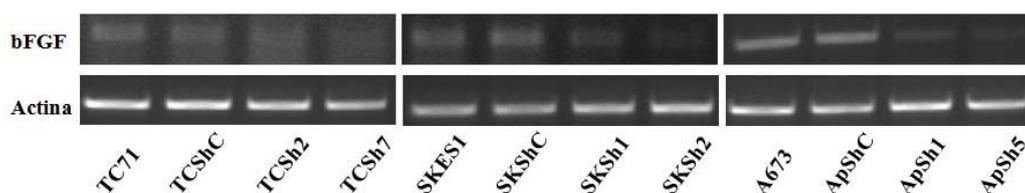


Figura 21. Expresión de bFGF en modelos de baja expresión de CAV1. Análisis por RT-PCR.

La Figura 21 permite observar una reducción en la expresión de bFGF en los clones de los 3 modelos, mientras que los niveles de expresión se mantienen constantes en los controles. Para dar mayor validez a este resultado, la cuantificación de 3 experimentos fue realizada (Figura 22).

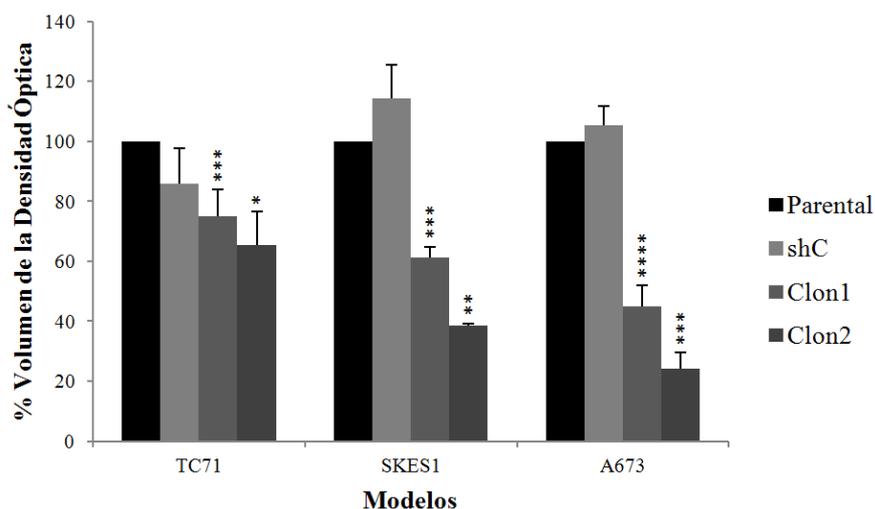


Figura 22. Cuantificación del porcentaje de volumen de la densidad óptica del análisis por RT-PCR. La gráfica muestra la reducción significativa en bFGF en los clones. (* $P \leq 0.0001$; ** $P = 0.0009$; *** $P \leq 0.0042$; **** $P = 0.0082$; $n=3$)

La gráfica permitió observar que la reducción en los niveles de expresión de bFGF es constante y estadísticamente significativa en los tres modelos analizados: * $P \leq 0.0001$; ** $P = 0.0009$; *** $P \leq 0.0042$; **** $P = 0.0082$. Si bien el porcentaje de volumen de las bandas presenta algunas diferencias, los tres modelos presentan las mismas tendencias de reducción en la intensidad de las bandas. Los resultados obtenidos sugieren la participación de bFGF secretado por las células tumorales en la

migración endotelial hacia el tumor. Con el fin de confirmar este resultado, se analizó por western blot la expresión de bFGF en el modelo TC71 (Figura 23).

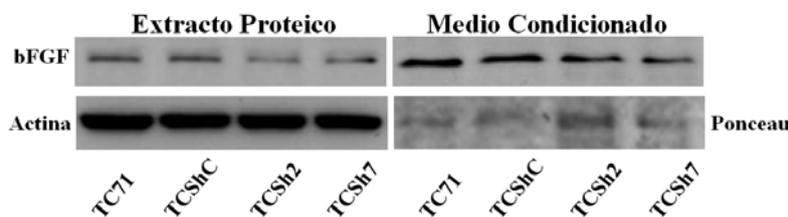


Figura 23. Western blot de bFGF. Reducción de la expresión de bFGF en el modelo TC71 tanto en extracto proteico total como en medio condicionado.

El análisis por western blot demostró la presencia de bFGF tanto en extracto proteico total como en medio condicionado concentrado. En ambos casos fue posible apreciar la reducción en la expresión de bFGF en los carriles correspondientes a los clones, mientras que los controles mantuvieron sus niveles de manera similar.

A continuación, decidimos confirmar la implicación y participación de bFGF en el proceso migratorio de las células endoteliales. Para llevar a cabo el experimento se utilizaron, un anticuerpo neutralizante para bFGF en el medio condicionado de las células control así como una proteína recombinante de bFGF en el medio condicionado de las células shCAV1. Tanto el anticuerpo neutralizante como la proteína recombinante fueron utilizados con medios condicionados del modelo TC71 para promover la migración de células endoteliales PAEC (Figura 24).

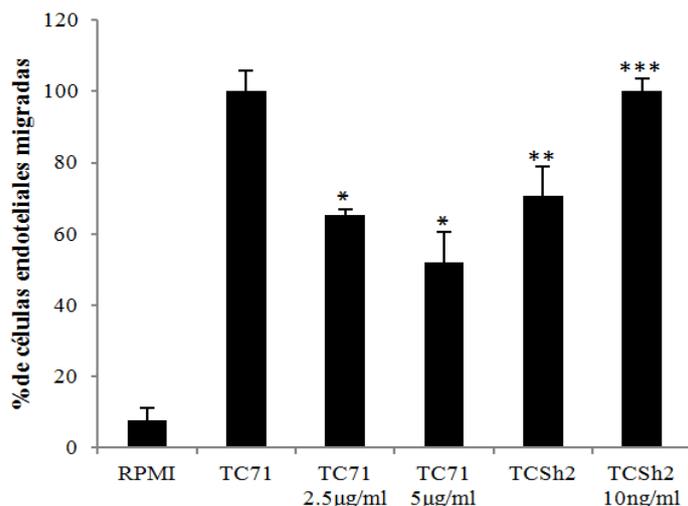


Figura 24. Ensayo de migración. La cuantificación de células endoteliales migradas en los Transwells utilizando medios condicionados control tratados con un anticuerpo neutralizante (2.5 µg/ml y 5 µg/ml) y medios condicionados shCAV1 tratados con una proteína recombinante (10 ng/ml). (*P < 0.0001; **P = 0.0012 comparando con la línea parental y ***P = 0.0005 comparando con el clon)

Tras analizar los resultados obtenidos, se puede apreciar que los medios condicionados control tratados con el anticuerpo neutralizante (2.5 µg/ml y 5 µg/ml) son capaces de reducir la migración de células endoteliales de manera significativa (P < 0.0001). Por su parte, el medio condicionado del shCAV1 tratado con la proteína recombinante fue capaz de recuperar la migración a los mismos niveles de la línea parental (P = 0.0005). Estos resultados demostraron que bFGF al ser secretado por las células del sarcoma de Ewing, es un factor importante para la migración de las células endoteliales hacia el tumor.

3. Determinar el mecanismo molecular a través del cual CAV1 regula la angiogénesis en el sarcoma de Ewing.

3.1. Analizar la posible interacción entre CAV1 y el receptor EphA2

3.1.1 Determinar la participación del receptor de membrana EphA2 en el sarcoma de Ewing

Basándonos en los resultados obtenidos anteriormente, decidimos analizar la posible participación de algún receptor de membrana implicado en el proceso angiogénico. De entre las diferentes familias de receptores a las cuales se les ha atribuido un papel en el proceso angiogénico, los receptores de la familia Eph nos parecieron de especial interés. Esto es porque: estos receptores son piezas clave en el desarrollo vascular, presentan propiedades particulares en sus rutas de señalización y activación, alguno de ellos se expresa abundantemente en el sarcoma de Ewing y se ha demostrado su interacción con CAV1 en otros modelos. Los receptores Eph y sus ligandos, las efrinas, participan en diversas funciones celulares, tales como la movilidad celular, repulsión, adhesión, contactos célula-célula y célula-matriz, migración, proliferación, diferenciación celular, angiogénesis y angiogénesis tumoral. Tanto los receptores Eph como las efrinas parecen jugar, además, un papel importante en el desarrollo de los límites vasculares así como en el aumento o disminución de la densidad vascular, el volumen tumoral, la proliferación celular y la progresión metastásica [Mosch B. *et al.*, 2010]. Además, uno de los miembros de esta familia (EphA2) juega un papel clave en el proceso angiogénico tumoral [Vihanto M. *et al.*, 2006, Wykosky y Debinski, 2008] y su interacción con CAV1 ha sido demostrada con anterioridad.

En un perfil de expresión comparando diferentes sarcomas, los receptores EphA2, EphB3 y EphB4 aparecieron con una expresión elevada en pacientes con sarcoma de Ewing [Khan J. *et al.*, 2001]. Por este motivo se analizó la presencia de estos 3

miembros (EphA2, EphB3 y EphB4) en diferentes líneas celulares representativas de sarcoma de Ewing (Figura 25).

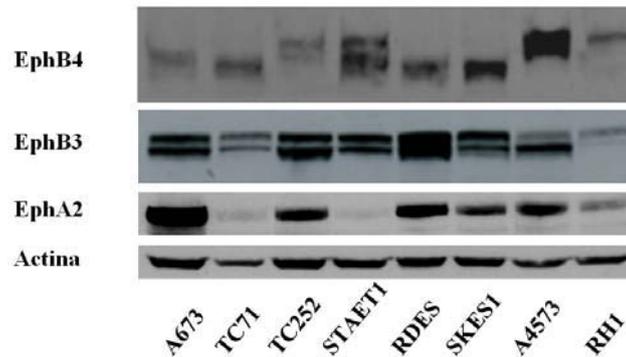


Figura 25. Panel de western blots de EphB4, EphB3 y EphA2 en diferentes líneas celulares de sarcoma de Ewing

Los resultados permitieron observar que los tres receptores se encuentran expresados en mayor o menor medida en las diferentes líneas celulares. Sin embargo, EphB4 presenta modificaciones en el patrón de sus bandas, posiblemente debidas a modificaciones post-transcripcionales presentes en cada línea celular. A continuación, se estudió la presencia de los receptores en muestras humanas. Mediante el análisis por inmunohistoquímica de los tres miembros de la familia mencionados anteriormente, se demostró la presencia de EphA2 y la ausencia de EphB3 y EphB4 en biopsias humanas (Figura 26). El análisis de las biopsias mostró la presencia de EphA2 en todas las muestras en un panel de 28 pacientes, mostrando altos niveles de expresión de la proteína.

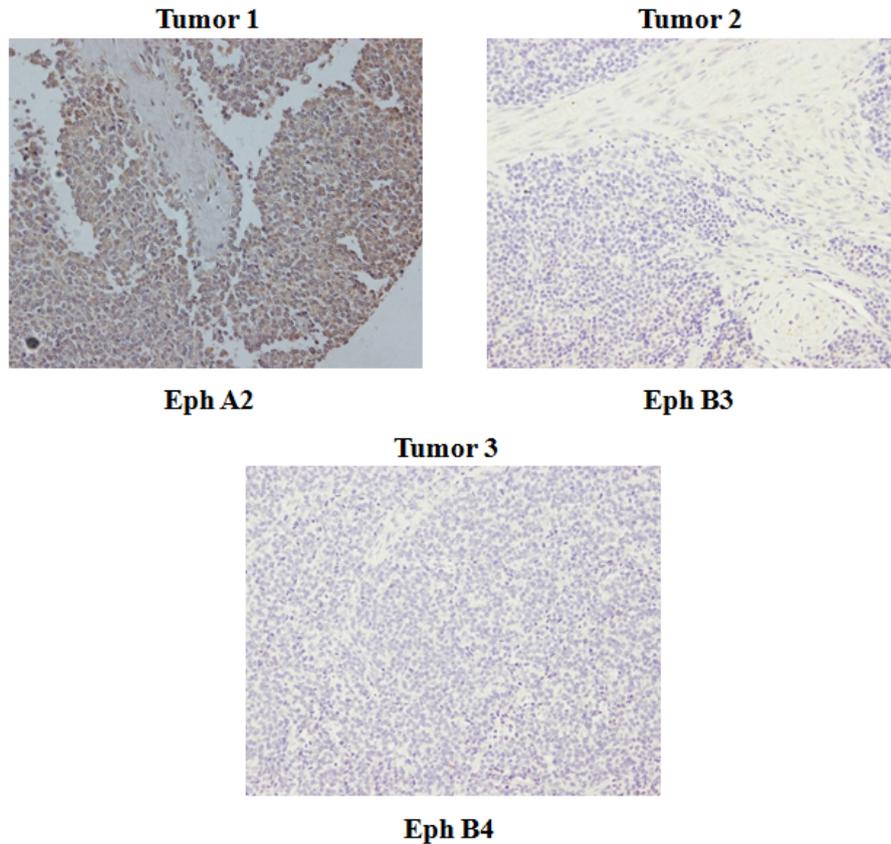


Figura 26. Expresión de EphA2 en biopsias humanas. Inmunohistoquímica demostrando la presencia de EphA2 y la ausencia de otros miembros de la familia (EphB3 y EphB4). La expresión de EphA2 fue positiva en todos los tumores analizados, y el patrón de expresión fue observado tanto en membrana como en citoplasma. (x200) (n = 28)

3.1.2 Determinar el patrón de expresión del receptor de membrana EphA2 en los modelos de baja expresión de CAV1

Una vez determinada la expresión del receptor de membrana EphA2 tanto en las muestras de los pacientes como en las líneas celulares de sarcoma de Ewing, decidimos analizar el patrón de expresión en los modelos de baja expresión de CAV1 (Figura 27).

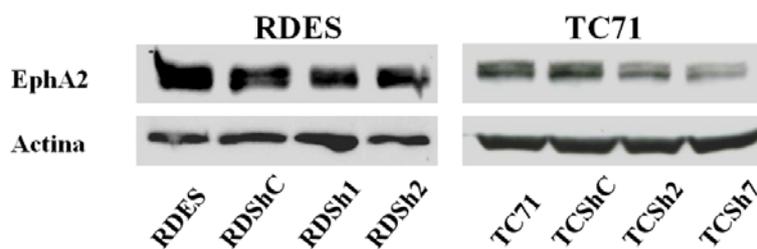


Figura 27. Wester Blot de EphA2 en los modelos de baja expresión de CAV1.

En la figura es posible apreciar la expresión de EphA2 en los modelos RDES y TC71. El resultado del western blot mostró una ligera reducción de EphA2 en los clones al ser comparados con los extractos de las células parentales y los controles.

Para analizar los posibles efectos de la ausencia de CAV1 en la activación del receptor EphA2 comparamos la fosforilación del receptor en los modelos RDES y TC71. Por western blot, utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina en muestras previamente inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-EphA2 fue posible apreciar, por un lado, la activación constitutiva del receptor en los controles y, por otro lado, la reducción significativa en la fosforilación como consecuencia de la pérdida de CAV1 (Figura 28).

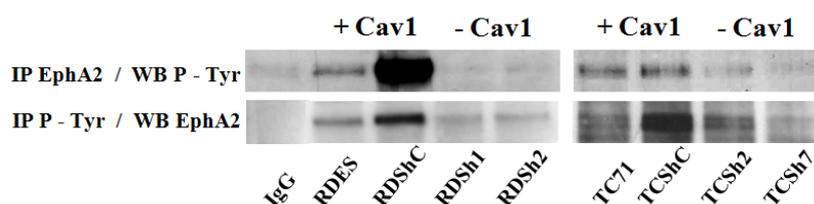


Figura 28. Inmunoprecipitación de EphA2 analizada por western blot con un anticuerpo anti-fosfotirosina, demostrando la activación constitutiva.

Este resultado sugería la posibilidad de que las células tumorales estuviesen expresando alguno de los ligandos efrina que activan a este receptor. Para confirmar este hecho, decidimos analizar la expresión del ligando más común de EphA2: efrina A1 o EfnA1 mediante RT-PCR (Figura 29).

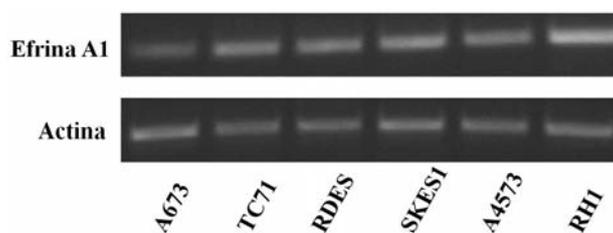


Figura 29. RT-PCR para EfnA1. La imagen muestra su expresión en todas las líneas de sarcoma de Ewing analizadas.

El resultado del análisis de diferentes líneas de sarcoma de Ewing mostró que EfnA1 se encontraba expresado de manera constante en todas ellas. Este resultado podría explicar así la fosforilación constitutiva del receptor EphA2 en los controles.

A continuación, mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal decidimos analizar si la localización de EphA2 se veía afectada por la pérdida de fosforilación en los modelos RDES, TC71 y A673 de baja expresión de CAV1 (Figura 30). Los resultados apreciados en el panel muestran la localización de EphA2 en la membrana celular en las células parentales y en los controles. Por el contrario, en los shCAV1, EphA2 presenta una redistribución a través del citoplasma celular, particularmente en los modelos RDES y A673. En el modelo TC71 se puede ver que la distribución de EphA2 en la línea parental y en el control no es tan marcada en la membrana como en las líneas RDES y A673. Sin embargo, en el clon TCSH2, EphA2 tiende a desaparecer, mientras que en el clon TCSH7 la redistribución de EphA2 no es tan evidente. La localización de EphA2 como puede observarse, es constante en los tres modelos y correlaciona con los niveles de expresión proteica vistos en la figura 27. Estos resultados sugieren una interacción entre CAV1 y EphA2.

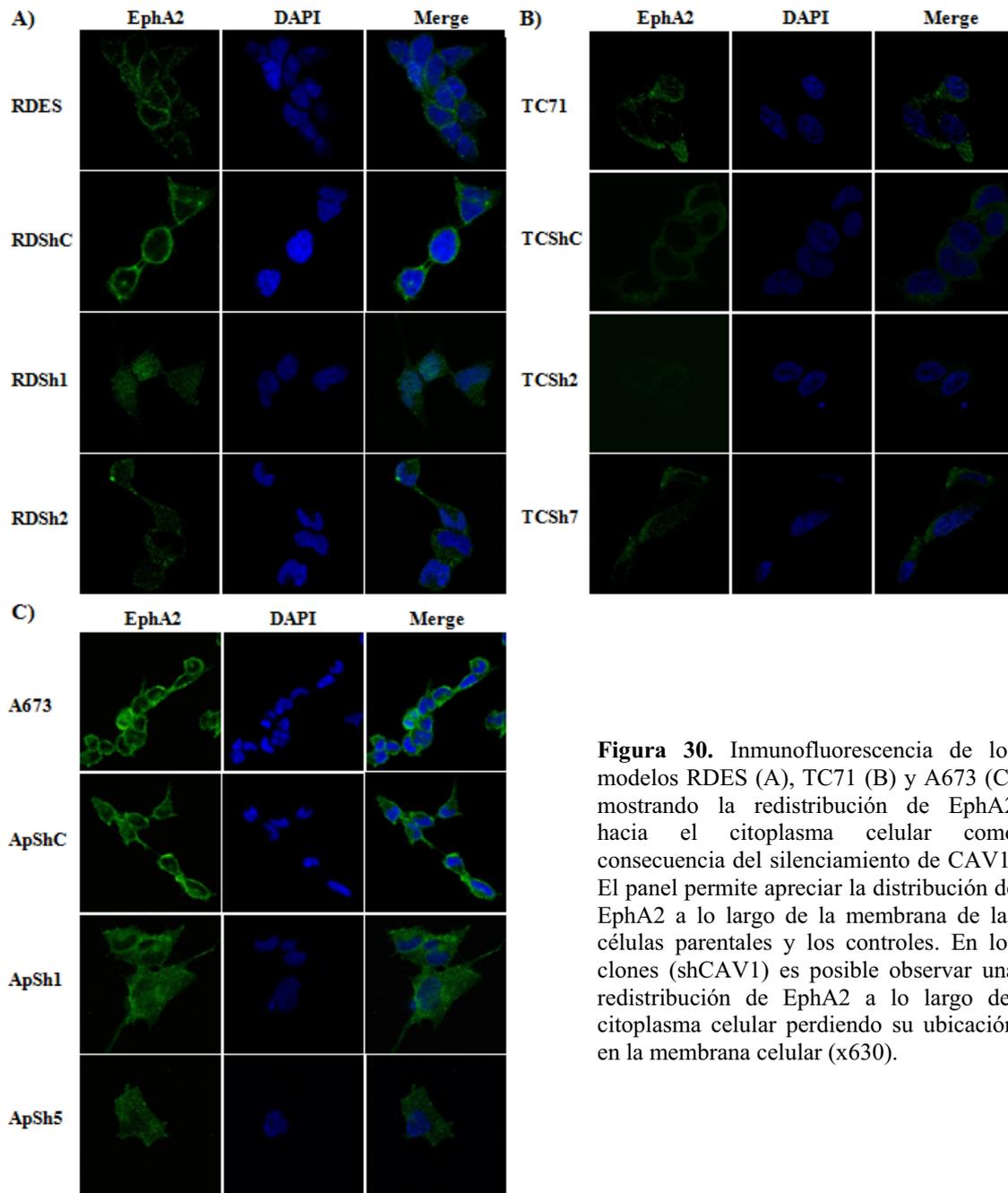


Figura 30. Inmunofluorescencia de los modelos RDES (A), TC71 (B) y A673 (C) mostrando la redistribución de EphA2 hacia el citoplasma celular como consecuencia del silenciamiento de CAV1. El panel permite apreciar la distribución de EphA2 a lo largo de la membrana de las células parentales y los controles. En los clones (shCAV1) es posible observar una redistribución de EphA2 a lo largo del citoplasma celular perdiendo su ubicación en la membrana celular (x630).

3.1.3 Determinar la interacción del receptor de membrana EphA2 con CAV1 en los modelos de baja expresión de CAV1.

Con el objetivo de demostrar la interacción directa entre EphA2 y CAV1 en células de sarcoma de Ewing, el lisado celular del modelo RDES de baja expresión de CAV1 fue sometido a una inmunoprecipitación utilizando anticuerpos específicos (Figura 31).

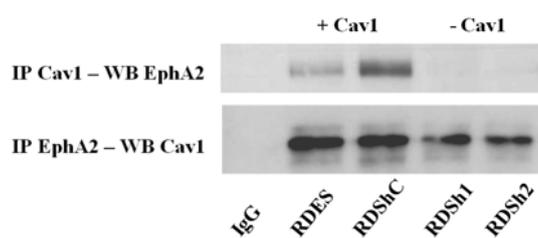


Figura 31. Co-Immunoprecipitación de CAV1 y EphA2 mostrando su interacción.

El resultado obtenido mediante esta técnica sugiere la interacción entre CAV1 y EphA2. Además, coincidiendo con la pérdida de fosforilación y la redistribución del receptor en los clones shCAV1, se observó una clara disminución de la interacción de ambas proteínas.

Para confirmar la interacción entre ambas proteínas, mediante una co-inmunofluorescencia, analizamos por microscopía confocal la posible co-localización de las proteínas en las células parentales RDES, TC71 y A673 (Figura 32). Los resultados mostraron la presencia de las proteínas a nivel de la membrana, así como su co-localización. En el panel se puede ver que tanto CAV1 como EphA2 se encuentran de manera mayoritaria en la membrana, mientras que también se observa una localización intracelular [posiblemente aparato de Golgi (CAV1)] o distribuida a lo largo del citoplasma (EphA2). A partir del coeficiente de correlación de Pearson se determinaron los valores de correlación, observando valores significativos en las 3 líneas analizadas ($P \geq 0.6190 \pm 0.028$) y los puntos de co-localización son apreciables en color magenta.

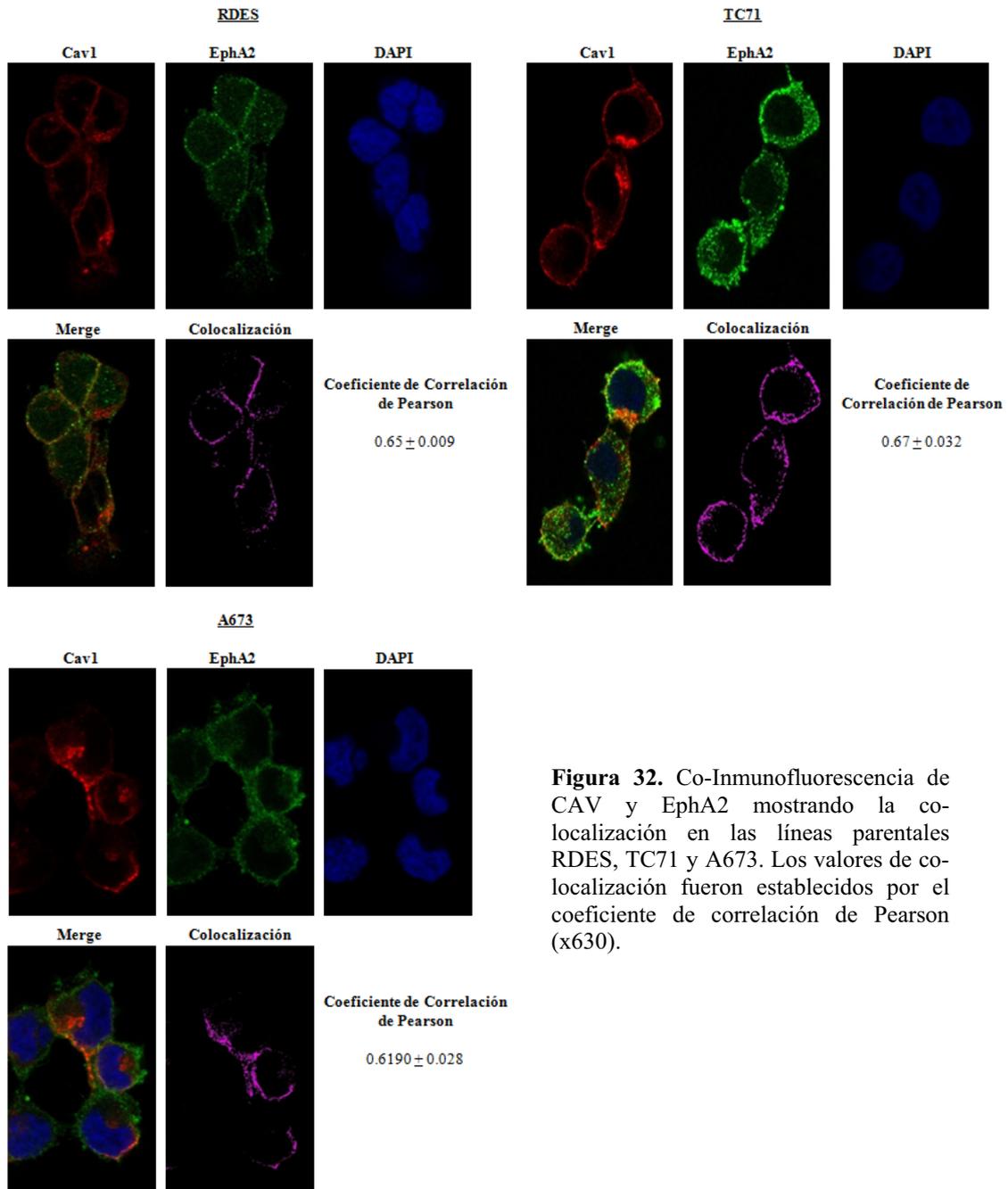


Figura 32. Co-Immunofluorescencia de CAV y EphA2 mostrando la co-localización en las líneas parentales RDES, TC71 y A673. Los valores de co-localización fueron establecidos por el coeficiente de correlación de Pearson (x630).

Esta co-localización también fue valorada en los xenoinjertos obtenidos a partir de las líneas celulares (Figura 33). En la figura es posible observar la distribución de CAV1 y de EphA2 a lo largo de las células del tejido, especialmente en la membrana celular. A partir del coeficiente de correlación de Pearson se determinaron los valores de co-localización (0.6955 ± 0.008) de las proteínas. Este valor es significativo y a su vez confirma la interacción de las proteínas en el modelo *in vivo*.

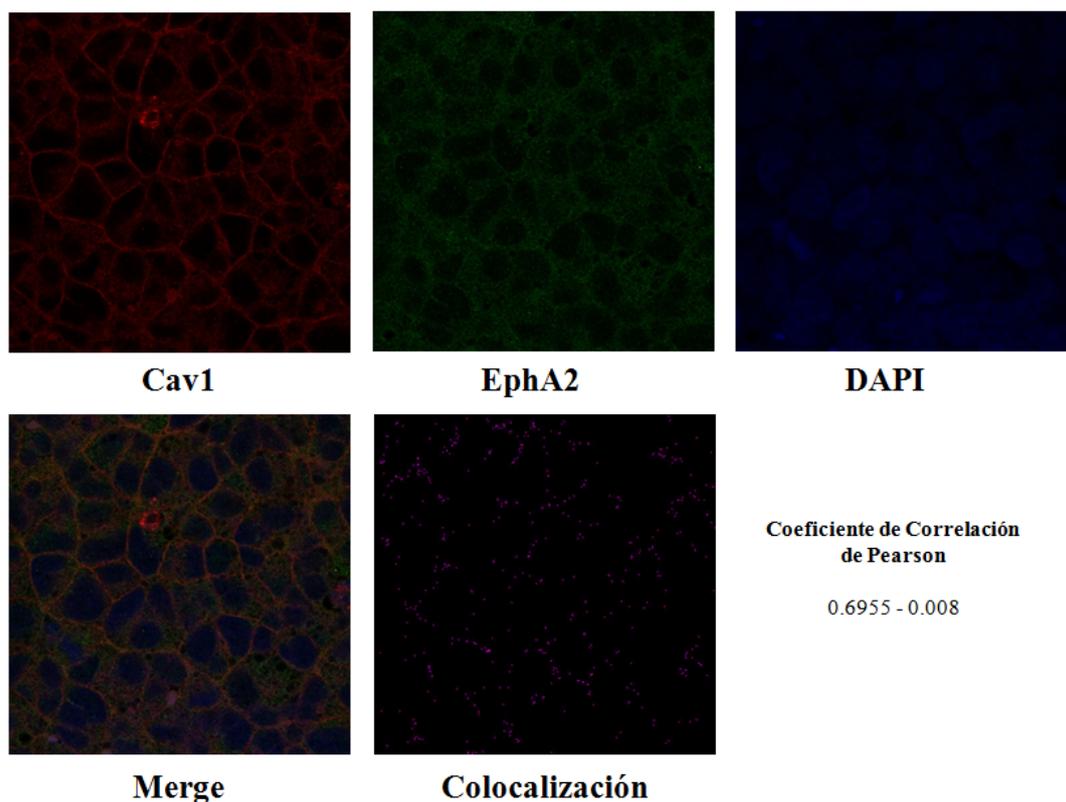


Figura 33. Expresión de CAV1 y EphA2 en cortes de xenoinjertos inducidos en ratones inmunodeprimidos. La co-inmunofluorescencia de CAV1 y EphA2 muestra la co-localización en la membrana celular. Coeficiente de correlación de Pearson de 0.6955 – 0.008 (x630).

3.2. Analizar los efectos en la señalización regulados por EphA2 inducidos por la falta de CAV1.

3.2.1 Determinar el mecanismo de señalización regulado por la activación del receptor de membrana EphA2

Con el fin de demostrar la implicación de CAV1 en la ruta de señalización de EphA2, las células de los modelos RDES y TC71 de baja expresión de CAV1 fueron estimulados con una forma soluble de EfnA1 (EfnA1-Fc) en ausencia de suero. Esta estimulación mostraba la activación del receptor EphA2 (Figura 34).

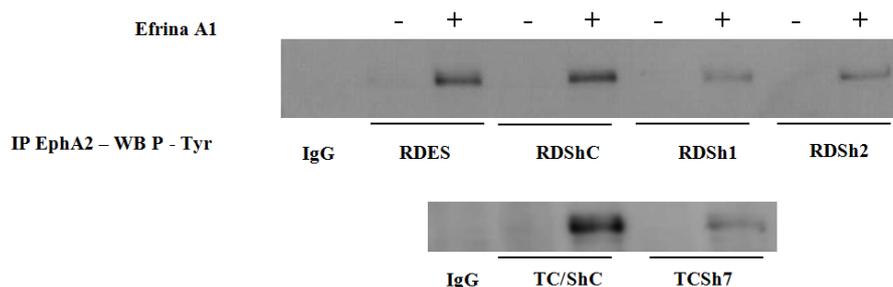


Figura 34. Inmunoprecipitación de EphA2 tras la estimulación con EfnA1. La imagen muestra mayor fosforilación de EphA2 tras la estimulación con EfnA1 en los extractos de los controles comparando con los shCAV1.

Los resultados del análisis de la inmunoprecipitación mostraron la activación de EphA2 inducida por la estimulación con EfnA1 en las células control. Por el contrario, en los shCAV1 la activación del receptor no fue tan elevada como en los controles. Para determinar la vía de señalización regulada por EphA2, se analizó la activación de dos rutas que podrían estar implicadas, MAPK/ERK y AKT, tras la estimulación con la proteína recombinante EfnA1-Fc (Figura 35). Los resultados mostraron un aumento en la fosforilación de la treonina 308 y un ligero incremento en la fosforilación de la serina 473 de AKT. Sin embargo, la fosforilación en ERK1/2 no se vio significativamente afectada. Paralelamente, el análisis por RT-PCR de las muestras estimuladas mostró un incremento en la transcripción de bFGF. Este resultado sugiere la implicación de la ruta de señalización mediada por AKT tras la estimulación de EphA2.

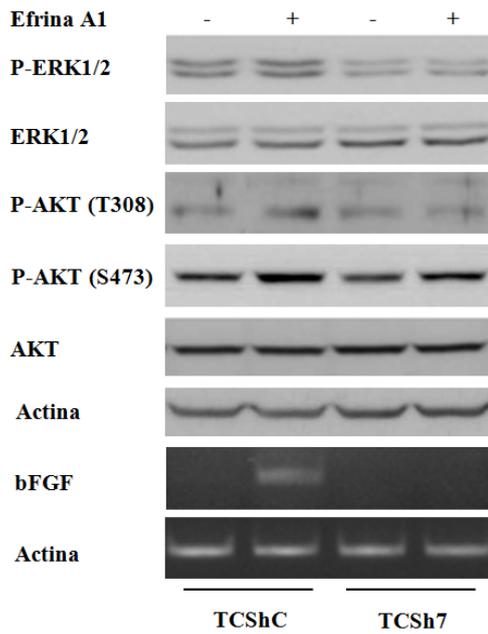


Figura 35. Western blot que muestra la activación de AKT y RT-PCR mostrando niveles elevados de bFGF transcrito tras la estimulación con EfnA1. En ERK1/2 no se aprecian cambios significativos en su activación.

Con el fin de confirmar la implicación de la vía de AKT en la ruta de señalización que promueve la expresión de bFGF, decidimos estimular a la línea celular TC71 con EfnA1-Fc en presencia de un inhibidor de AKT (Figura 36).

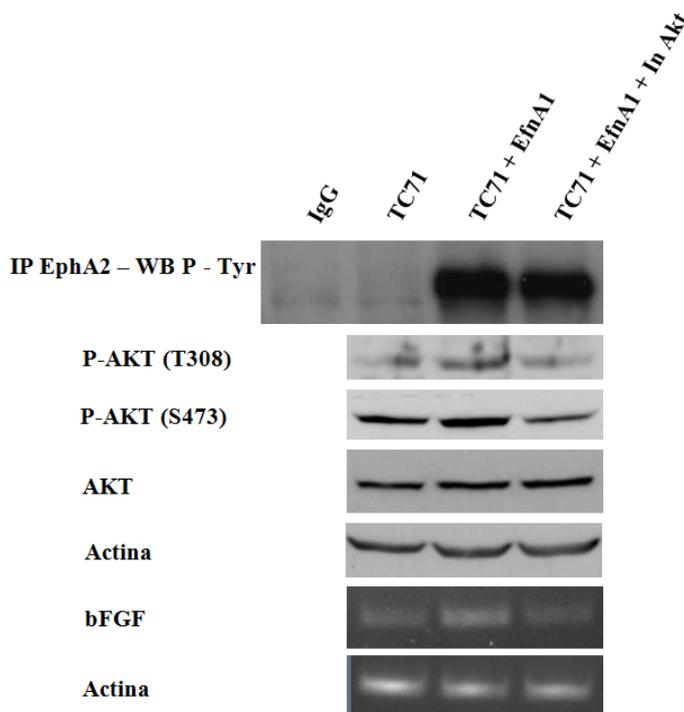


Figura 36. Western blot que muestra la inhibición de AKT en las células TC71 estimuladas con EfnA1 en presencia de un inhibidor de AKT. Los cambios en la transcripción de bFGF se muestran por RT-PCR.

Los resultados permitieron observar que las células tratadas con el inhibidor de AKT, aún mostrando la estimulación de EphA2, no fueron capaces de promover la transcripción de bFGF. Esto sugiere que la inducción de bFGF tras la estimulación con EfnA1 ocurre a través de la vía de señalización de AKT.

3.2.2 Determinar la importancia de la actividad quinasa del receptor EphA2 en el mecanismo de señalización en el sarcoma de Ewing

Para determinar la posible relación entre la actividad quinasa de EphA2 y la transcripción de bFGF, EphA2 fue bloqueado sin modificar la expresión de CAV1. En las líneas celulares RDES y TC71 transfectamos de manera estable un mutante K645R que implica el bloqueo de la actividad quinasa de EphA2 en el sitio de unión a ATP (EphA2-Kd) [Taddei M.L. *et al.*, 2009]). Este mutante actúa como un dominante negativo que tiene la habilidad de inhibir la fosforilación del EphA2 endógeno (actividad quinasa-dependiente). La valoración de la transfección fue llevada a cabo mediante una inmunoprecipitación. Una vez establecidos los modelos EphA2-Kd, decidimos analizar si los efectos de suprimir la actividad quinasa del receptor eran capaces de replicar o reproducir los efectos anti-angiogénicos derivados de el silenciamiento de CAV1.

Por una parte, al igual que los modelos de baja expresión de CAV1, los modelos EphA2-Kd presentaron una reducción en la fosforilación constitutiva del receptor (Figura 37). En la imagen es posible apreciar que los controles que presentan los valores activación más elevados de los clones EphA2-Kd.



Figura 37. Western blot de fosfotirosina. La imagen muestra el efecto dominante negativo del vector EphA2-Kd en las líneas celulares de sarcoma de Ewing TC71 y RDES.

Asimismo, un análisis por inmunofluorescencia del receptor EphA2 mostró la redistribución de la proteína en los modelos EphA2-Kd presentando un cambio en su localización: de la membrana celular hacia el citoesqueleto (Figura 38).

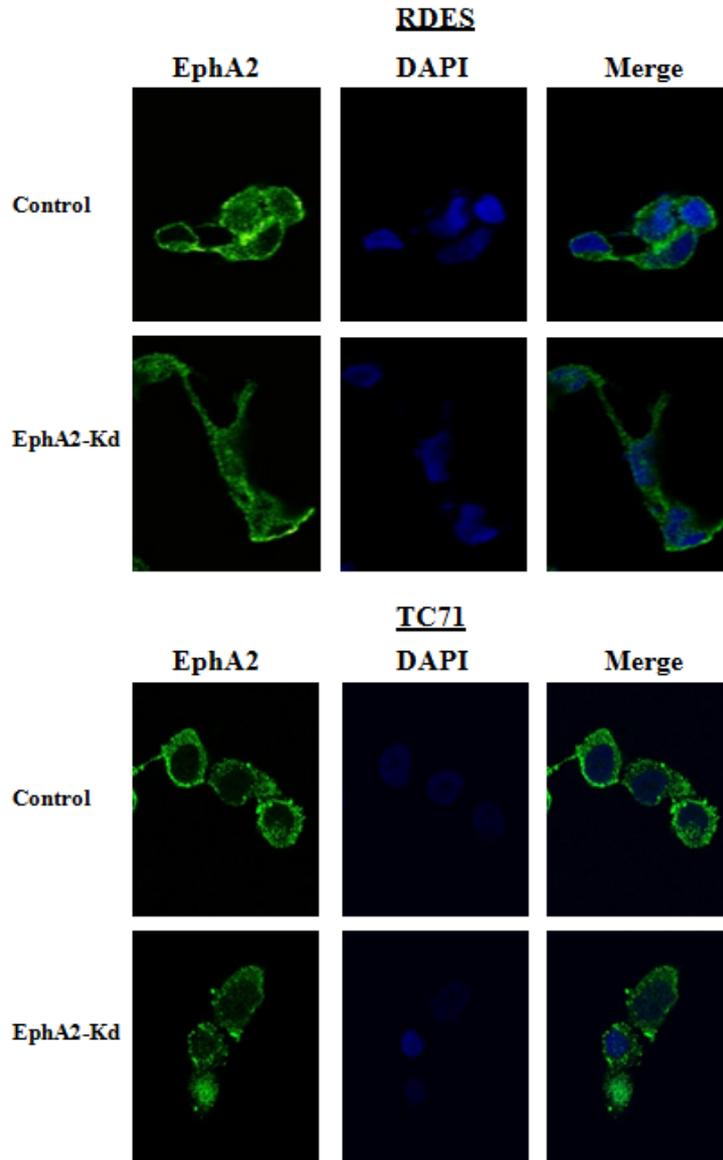


Figura 38. Inmunofluorescencia para EphA2 en los modelos RDES y TC71 EphA2-Kd. En el panel es posible apreciar la redistribución de EphA2 a lo largo del citoplasma de la célula en los clones Kd, mientras que los controles presentan EphA2 en la membrana celular.

Además de analizar la activación y localización del receptor, también se analizó el efecto de los medios condicionantes del modelo EphA2-Kd sobre la migración de células endoteliales PAEC (Figura 39). Los resultados permitieron apreciar la

reproducibilidad de lo sucedido con los modelos de baja expresión de CAV1. Los medios condicionados de los clones EphA2-Kd fueron incapaces de inducir los mismos niveles de migración que los medios condicionados de los controles, presentando así valores estadísticamente significativos ($P = 0.005$).

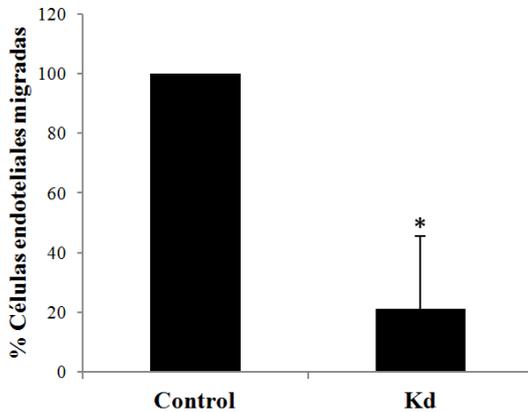


Figura 39. Ensayo de migración. Cuantificación de células endoteliales migradas en Transwells. Medios condicionados del modelo RDES EphA2-Kd utilizados como quimio-atrayentes. (* $P = 0.005$)

Para comprobar los efectos de la falta de actividad quinasa del receptor en el desarrollo angiogénico, se desarrollaron los modelos *in vivo*. Los xenoinjertos en ratones inmuno-deprimidos permitieron ver la semejanza del modelo EphA2-Kd con el modelo de baja expresión de CAV1. El análisis de los tumores permite apreciar la reducción en el volumen tumoral al comparar los clones con los controles (Figura 40).

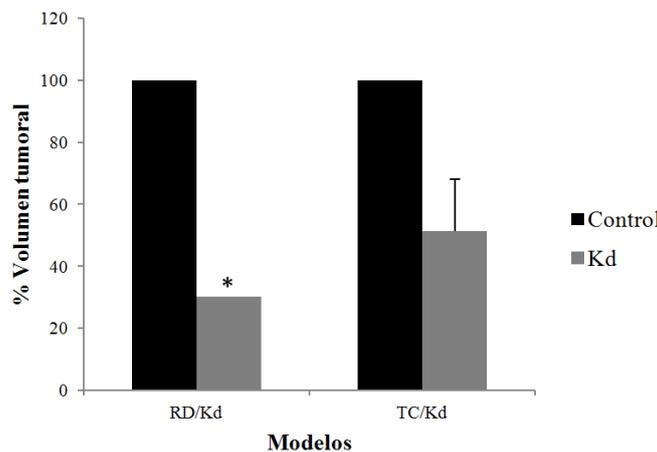


Figura 40. Volumen de los xenoinjertos comparando los tumores de las células EphA2-Kd con las células control. (* $P \leq 0.0283$)

Los modelos fueron analizados de manera individual. La figura permite apreciar una reducción de tamaño de más de un 50% en el modelo RDES EphA2-Kd, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.0283$). Por su parte, el modelo TC71 a pesar de presentar diferencias, éstas no fueron estadísticamente significativas ($P = 0.19$). Partiendo de estas diferencias físicas, decidimos analizar morfológicamente el tumor para detectar la presencia o ausencia de vasos sanguíneos formados por angiogénesis. Mediante un análisis de densidad micro-vascular pudimos apreciar las diferencias en el número de vasos sanguíneos (Figura 41).

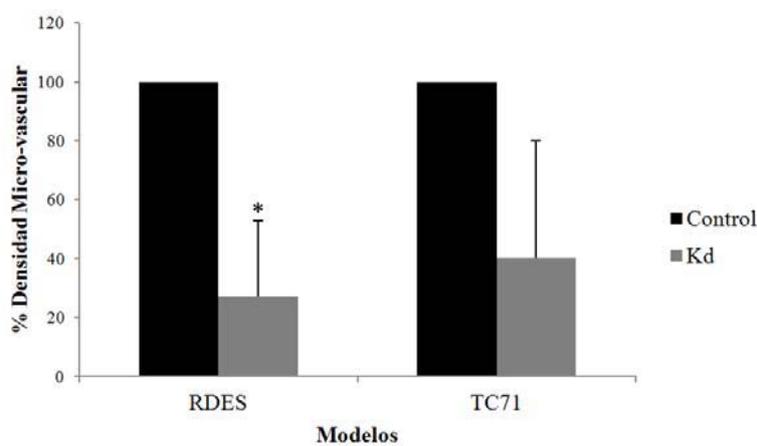


Figura 41. Análisis de densidad micro-vascular comparando los dos modelos EphA2-Kd (RDES y TC71). La gráfica muestra una reducción en el número de vasos sanguíneos de los clones al compararlos con los controles. (* $P = 0.05$)

El gráfico permite apreciar la reducción en el número de vasos sanguíneos presentes en los xenoinjertos desarrollados a partir de los modelos EphA2-Kd. Es en el modelo RDES donde se apreció mejor esta diferencia, siendo estadísticamente significativa ($P = 0.05$), mientras que el modelo TC71 presentó cerca de un 40% en la reducción vascular de nuevo sin ser estadísticamente significativa. Esta disminución en el número de vasos sanguíneos se correlaciona con lo apreciado en el análisis histológico, donde los tumores de los clones presentan un menor volumen tumoral, así como la presencia de lagunas necróticas (Figura 42).

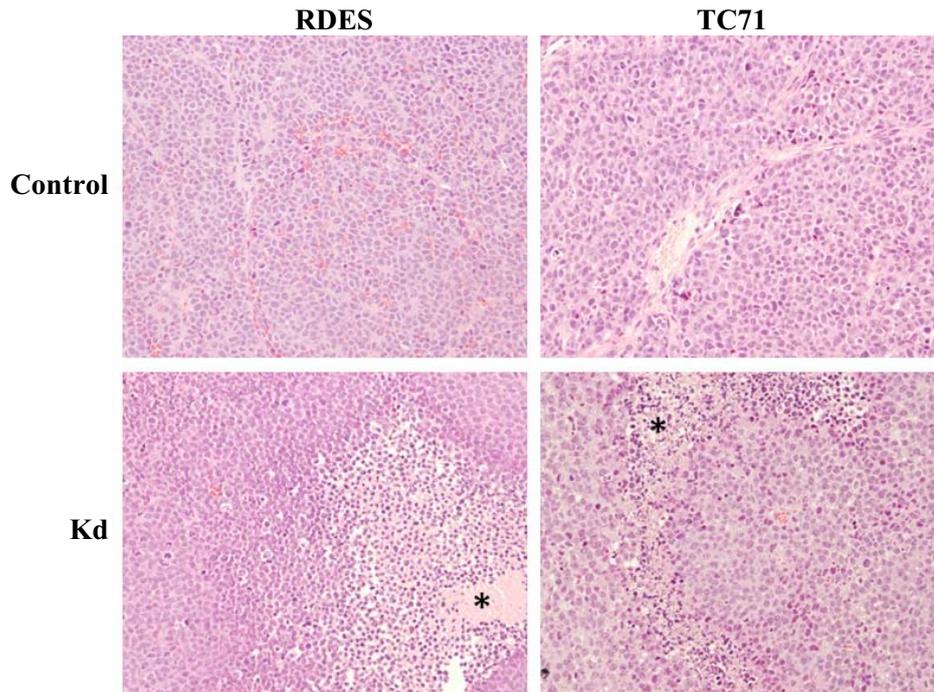


Figura 42. Tinción con Hematoxilina/Eosina en los xenoinjertos del modelo EphA2-Kd. El análisis de los modelos RDES y TC71 mostró la reducción en el volumen tumoral, así como el incremento de necrosis (*) en los tumores EphA2-Kd. (x200)

Finalmente, para establecer la relación entre la actividad quinasa de EphA2 y la transcripción de bFGF, las células del modelo TC71 EphA2-Kd fueron estimuladas con la proteína recombinante EfnA1-Fc. Tras el estímulo con la efrina, se analizaron por western blot las posibles vías implicadas (MAPK/ERK y AKT) así como la transcripción por RT-PCR de bFGF (Figura 43).

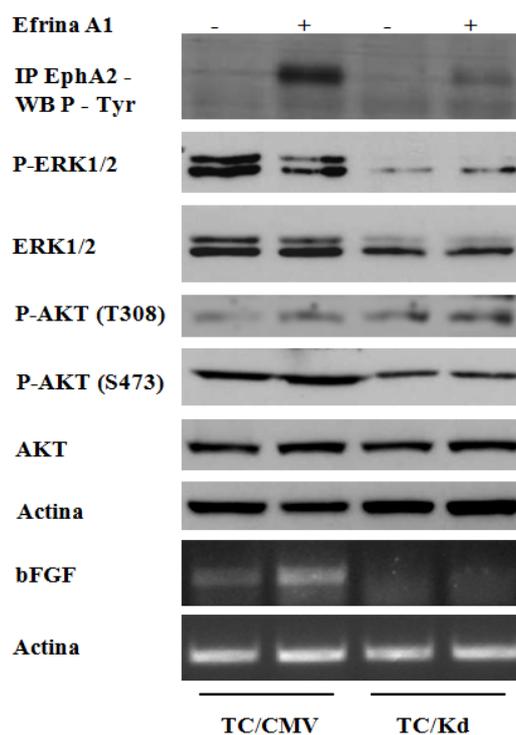


Figura 43. Western blot del modelo TC71 EphA2-Kd (células control y un clon). Tras la estimulación con EfnA1 no se aprecian cambios en la vía de ERK1/2. Es posible observar un aumento en la fosforilación de AKT y altos niveles de expresión de bFGF (RT-PCR) en las células control. El clon por su parte no presenta cambios en la expresión.

Los resultados del western blot recapitularon los resultados obtenidos tras el análisis de los modelos shCAV1: el efecto negativo ejercido por el dominante negativo en la fosforilación de AKT y la transcripción de bFGF en condiciones de estimulación del receptor. Estos datos sugieren que la vía de AKT puede ser la mediadora en el proceso de regulación de bFGF a través de la interacción de CAV1 con EphA2.

4. Determinar la implicación de CAV1 y EphA2 en el mimetismo vascular (VM) en el sarcoma de Ewing.

4.1 Comparación de la vasculatura entre tumores inducidos en ratones inmuno-deprimidos para identificar los vasos angiogénicos y los vasos miméticos en los modelos de baja expresión de CAV1.

El sarcoma de Ewing, como muchos tipos de tumores sólidos, requiere de un aporte vascular considerable para poder desarrollarse. En el sarcoma de Ewing, se ha descrito con anterioridad que las células tumorales son capaces por sí mismas de formar canales que permiten el aporte vascular. Estos canales son iniciados por células tumorales que carecen del fenotipo y los marcadores endoteliales, pero que presentan un comportamiento endotelial [Seftor R.E. *et al.*, 2012]. Es por esto que muchos tipos de tumores parecen utilizar diferentes medios de irrigación como es el caso del mimetismo vascular.

Hasta la fecha, los análisis de la densidad micro-vascular han sido considerados como un estándar en la determinación del aporte vascular en los tejidos tumorales. Sin embargo, resultados contradictorios han demostrado que este análisis no puede ser considerado como un factor pronóstico de supervivencia [Gao J. *et al.*, 2009]. En el proceso de mimetismo vascular, los canales conductores de fluidos se encuentran formados por células tumorales altamente invasivas y genéticamente desreguladas. Estas células tienen la capacidad de formar estructuras tubulares que pueden detectarse al microscopio [Folberg y Maniotis, 2004]. Cabe resaltar que estas estructuras no se encuentran encabezadas ni dirigidas por células endoteliales.

Para confirmar la presencia de vasos miméticos en el sarcoma de Ewing, lo primero que hicimos fue analizar los xenoinjertos inducidos en ratones inmuno-deprimidos. Analizando la estructura tumoral mediante una tinción con Hematoxilina/Eosina fue posible apreciar las diferentes estructuras vasculares presentes en el tumor. Con el fin de establecer una diferencia entre los vasos formados por células endoteliales y los vasos

formados por células tumorales, se llevó a cabo una inmunohistoquímica para CD31 (Figura 44).

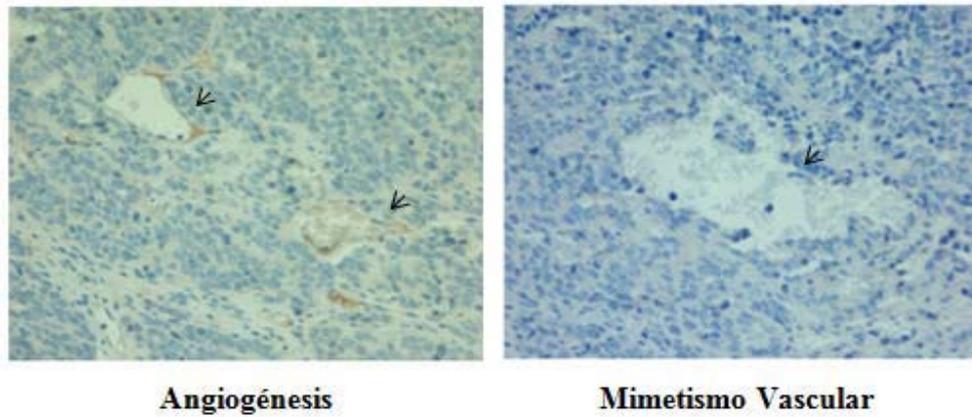


Figura 44. Inmunohistoquímica representativa del modelo RDES, utilizando CD31 para el reconocimiento de los vasos sanguíneos. La figura muestra los vasos sanguíneos formados por células endoteliales – angiogénesis – (izquierda) y aquellos vasos formados por células tumorales – mimetismo vascular – (derecha). (x400)

Basándonos en estos resultados, hipotetizamos que la diferenciación de células tumorales altamente agresivas podría estar implicada en la adquisición de características endoteliales. Para demostrarlo comparamos células endoteliales (PAEC) con células de sarcoma de Ewing (RDES y TC71) en un ensayo de formación tubular en matrigel (Figura 45).

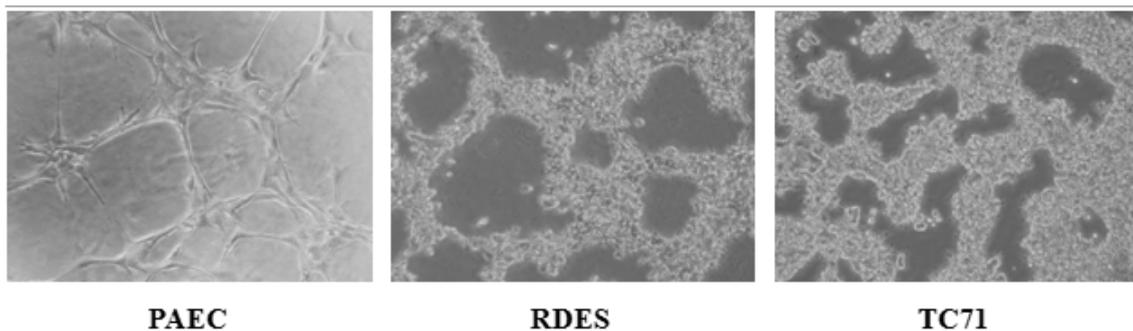


Figura 45. Comparación de la formación tubular entre las células endoteliales y dos líneas celulares de sarcoma de Ewing (RDES y TC71).

Los resultados permitieron observar que las estructuras tubulares formadas por las células endoteliales están compuestas por células alargadas que definen el túbulo. Por el

contrario las estructuras tubulares formadas por las células de sarcoma de Ewing están compuestas por agregados de células que muestran una estructura menos flexible.

Una vez determinada la existencia de los vasos miméticos en el sarcoma de Ewing, bien establecida la diferencia entre éstos y los vasos endoteliales y demostrada la capacidad de estas células de formar estructuras tubulares *in vitro*, decidimos determinar la implicación de CAV1 en el proceso. Para esto llevamos a cabo el análisis histológico de los xenoinjertos de los modelos de baja expresión de CAV1. Mediante la tinción con Hematoxilina/Eosina y por una inmunohistoquímica para CD31, fue posible analizar la presencia de vasos miméticos en los tumores. Los resultados mostraron que los tumores inducidos por células con baja expresión de CAV1 presentaban una menor cantidad o ningún vaso mimético en comparación con los tumores inducidos a partir de células control (Figura 46).

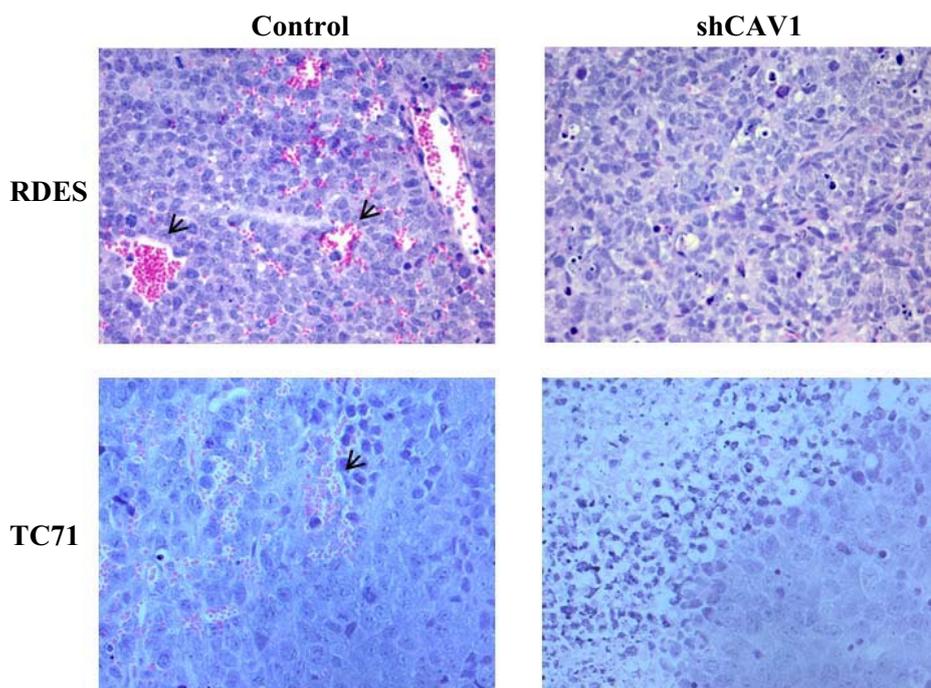


Figura 46. Tinción por Hematoxilina/Eosina que muestra la diferencia en la frecuencia de los vasos miméticos en los modelos de baja expresión de CAV1 (RDES y TC71)

Para respaldar estos resultados se llevó a cabo un ensayo de formación tubular en matrigel (Figura 47). El ensayo mostró la capacidad de las células tumorales (RDES y TC71) de formar las estructuras tubulares que corresponden a la formación de vasos

sanguíneos en los experimentos *in vivo*. Por su parte los shCAV1 fueron incapaces de formar dichas estructuras, presentando una distribución más uniforme sobre la superficie de la placa. Aún cuando los shCAV1 formaron agregados celulares, en ningún momento fueron capaces de formar las estructuras tubulares que formaron los controles. Estos resultados favorecen la hipótesis sobre el papel de CAV1 en el proceso del mimetismo vascular.

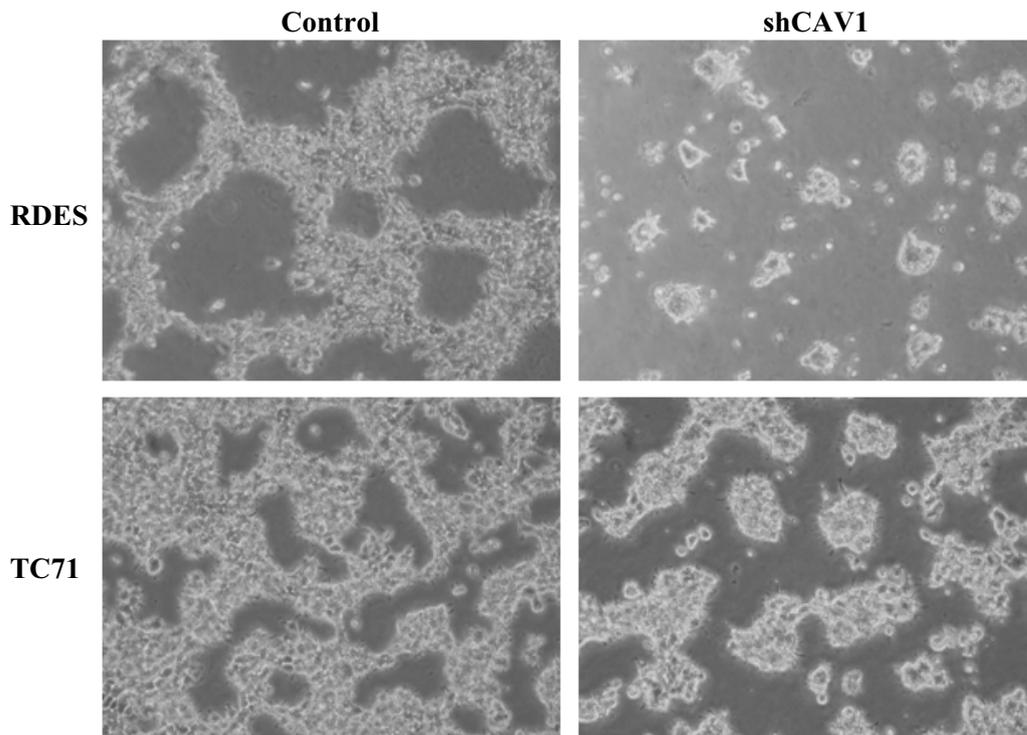


Figura 47. Formación tubular en matrigel. Los modelos RDES y TC71 mostrando la diferencia entre la formación tubular al comparar células control y células con baja expresión de CAV1.

4.2 Análisis del efecto de la actividad quinasa-dependiente e -independiente de EphA2 en el proceso de mimetismo vascular

Teniendo en cuenta el papel que juega EphA2 en el proceso angiogénico, en la formación vascular [Vihanto M. *et al.*, 2006, Wykosky y Debinski, 2008] y su interacción con CAV1, decidimos analizar los efectos de la actividad kinasa-dependiente y quinasa-independiente en el proceso del mimetismo vascular. Partiendo de los resultados obtenidos previamente en los análisis de angiogénesis, decidimos analizar la capacidad de formación tubular del modelo EphA2-Kd.

Primero analizamos los xenoinjertos de los modelos RDES y TC71 EphA2-Kd. A través del análisis histológico pudimos apreciar una reducción en el número de vasos angiogénicos en los clones. Sin embargo, el número de vasos miméticos no presentó ninguna variación al comparar los controles con los clones de EphA2-Kd (resultado no mostrado). Para terminar de valorar este resultado, decidimos llevar a cabo un ensayo de formación tubular en matrigel con los modelos EphA2-Kd (Figura 48).

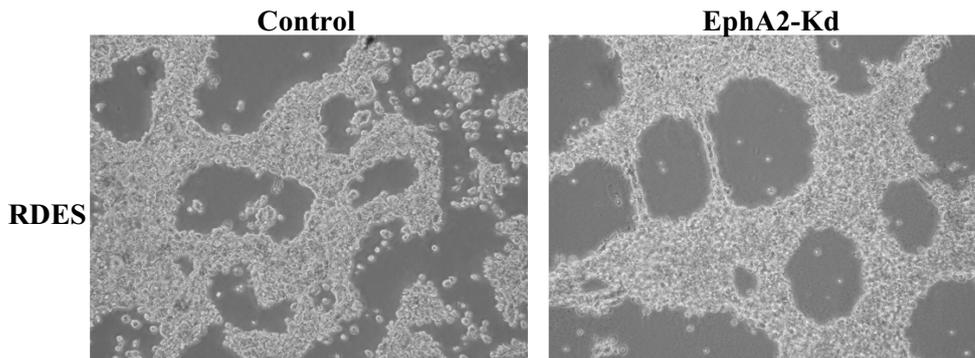


Figura 48. Formación tubular en matrigel. El modelo RDES EphA2-Kd mostrando la diferencia entre la formación tubular al comparar células control y clones.

Los resultados permitieron confirmar la presencia de formaciones tubulares en el modelo RDES, especialmente formaciones más marcadas en los clones de EphA2-Kd. Estos resultados sugirieron así que la actividad quinasa del receptor no se encuentra implicada directamente con la formación tubular o formación de vasos miméticos en el sarcoma de Ewing.

Con la intención de averiguar si la actividad independiente de quinasa del receptor EphA2 participa en el proceso de mimetismo vascular, decidimos transfectar de manera estable un mutante de EphA2 que carece de toda la región citoplasmática del receptor (Δ Cyto), implicando de esta manera la eliminación de sus funciones quinasa-dependientes y quinasa-independientes [Taddei M.L. *et al.*, 2009]. Tras haber transfectado y aislado los clones, analizamos la actividad del receptor mediante una inmunoprecipitación de EphA2 y verificando por western blot utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (Figura 49).

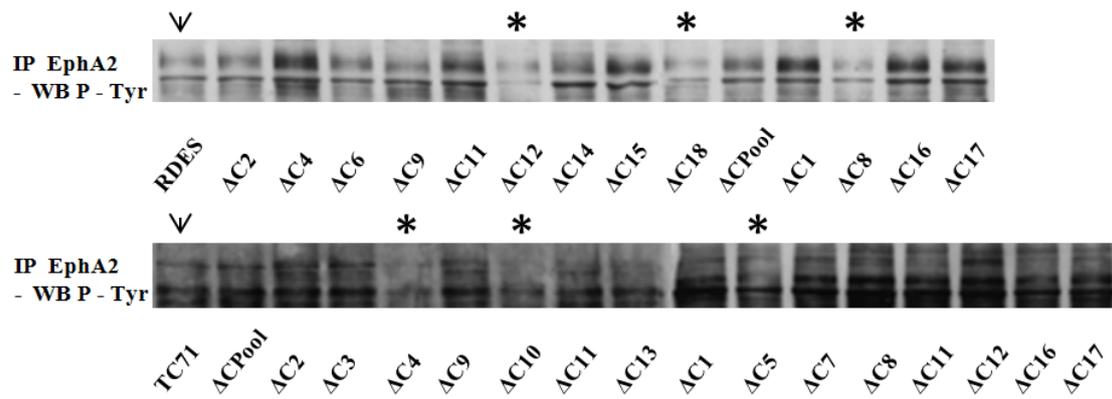


Figura 49. Inmunoprecipitación de EphA2 y análisis por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina. Las flechas marcan las líneas parentales mostrando la actividad de EphA2. Los asteriscos muestran las células seleccionadas, negativas o con menor activación de EphA2.

Una vez establecidos los modelos RDES y TC71 EphA2-ΔCyto, llevamos a cabo un ensayo de formación tubular en matrigel (Figura 50).

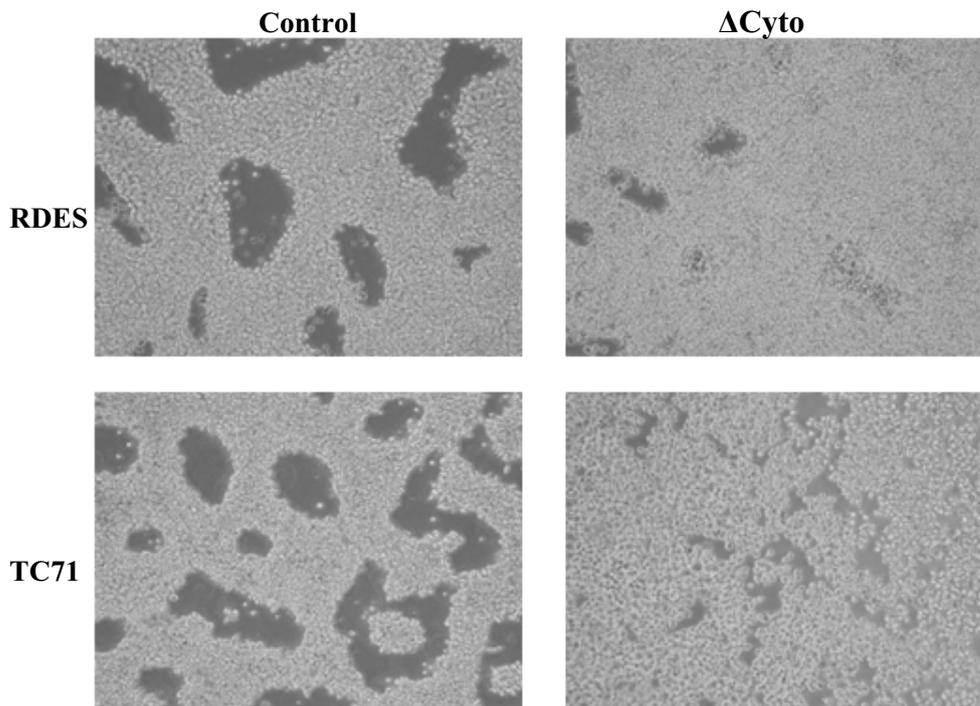


Figura 50. Formación tubular en matrigel. Los modelos RDES y TC71 EphA2-ΔCyto mostrando la diferencia entre la formación tubular al comparar células control y clones.

Los resultados mostraron que las células transfectadas con el vector EphA2- Δ Cyto eran incapaces de formar estructuras tubulares al compararlas con las células control. Estos resultados sugieren que la función quinasa-independiente de EphA2 se encuentra directamente implicada en la formación de vasos miméticos y que junto con los vasos angiogénicos enriquecen el aporte vascular en el sarcoma de Ewing.

DISCUSIÓN

El sarcoma de Ewing es un tumor de células redondas pequeñas capaz de desarrollarse en hueso y en tejidos blandos. A lo largo de las últimas décadas las técnicas de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad han mejorado considerablemente. Sin embargo, esta mejora aún no supone una ventaja sobre el pronóstico de la enfermedad. Debido a la presencia constante de una translocación específica y a la alteración de sus dianas transcripcionales, estas dianas son importantes en la búsqueda de mejoras en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Teniendo en cuenta la influencia de la translocación sobre sus dianas transcripcionales y considerando el papel de CAV1 en el desarrollo vascular, el estudio del aporte vascular en el sarcoma de Ewing regulado por CAV1 es de interés en el conocimiento de la biología de la enfermedad.

Como todos los tumores sólidos, el sarcoma de Ewing requiere de un aporte vascular bien estructurado que permita nutrir y oxigenar a las células tumorales para crecer [DuBois S.G. *et al.*, 2010]. Para esto, la vascularización del tumor debe ser suficiente para permitir al tumor desarrollar diferentes estructuras de irrigación. En el sarcoma de Ewing, estas estructuras son creadas principalmente por los procesos de vasculogénesis y angiogénesis [Stewart y Kleinerman, 2011]. Los procesos de irrigación en el sarcoma de Ewing han sido poco descritos. Independientemente de lo que se conoce sobre el proceso de vasculogénesis [Stewart y Kleinerman, 2011], el mimetismo vascular [Hillen F. *et al.*, 2008] y la angiogénesis [Stewart y Kleinerman, 2011], poco se conoce sobre los mecanismos que regulan estos procesos.

Como se ha demostrado previamente, el silenciamiento de CAV1 en las células de sarcoma de Ewing afecta el desarrollo tumoral en ratones inmuno-deficientes [Tirado O.M. *et al.*, 2006]. Puesto que se ha visto que CAV1 contribuye al proceso de angiogénesis en diferentes sistemas [Sotgia F. *et al.*, 2012], nos propusimos determinar si la alteración del crecimiento tumoral se correlacionaba con la reducción de los vasos sanguíneos angiogénicos como consecuencia de la pérdida de expresión de CAV1. Partiendo del establecimiento de tres nuevos modelos de baja expresión de CAV1 en células de sarcoma de Ewing, pudimos observar una reducción en el desarrollo tumoral.

Esta reducción puede relacionarse con el papel de CAV1 descrito en estudios hechos en cáncer de próstata, donde actúa como un promotor tumoral [Williams T. *et al.*, 2005]. Lo opuesto a lo que sucede en cáncer de mama, donde CAV1 actúa como un supresor de tumores [Williams y Lisanti, 2005]. Esta reducción de volumen se encontraba relacionada directamente con una reducción en la densidad micro-vascular de los xenoinjertos. Nuestros resultados pueden compararse con los obtenidos por Frank P.G. *et al.* y Woodman S.E. *et al.*, donde CAV1 regula el proceso angiogénico [Frank P.G. *et al.*, 2003; Woodman S.E. *et al.*, 2003]. Estos datos se pueden correlacionar con las disfunciones vasculares en el desarrollo pulmonar [Drab M. *et al.*, 2001], con la mediación de la permeabilidad vascular [Schubert W. *et al.*, 2002] y efectos en el desarrollo del osteosarcoma [Cantiani L. *et al.*, 2007]. Sin embargo, hasta el momento, solo se ha visto el efecto de CAV1 en el desarrollo vascular del cáncer de mama [Razani B. *et al.*, 2001] siendo así este trabajo el primer estudio que demuestra un efecto directo en el proceso angiogénico en el sarcoma de Ewing modificado por el silenciamiento de CAV1.

La influencia de las células tumorales sobre las células endoteliales fue estudiada para determinar su posible interacción. Para analizar la respuesta de la célula endotelial ante las señales producidas por la célula tumoral, obtuvimos medios condicionados de los modelos de baja expresión de CAV1. Estos medios fueron utilizados *in vitro* para comparar la capacidad proliferativa y la respuesta migratoria de las células endoteliales. Los resultados mostraron que el medio condicionado de los shCAV1 presentó una capacidad significativamente reducida de inducir la migración de las células endoteliales. Por otra parte, los medios condicionados de las células tumorales no afectaron la capacidad proliferativa de dichas células. La estimulación del proceso migratorio pudo ser constatada al analizar la fosforilación de FAK, una proteína activa durante la migración endotelial [Kuo M.W. *et al.*, 2011; Lamalice L. *et al.*, 2007]. La activación de FAK pudo ser observada sólo en las células endoteliales creciendo en los medios condicionados de los controles, mientras que aquellas células creciendo en medios condicionados de los shCAV1 presentaron una localización perinuclear. Esta activación de FAK es similar a la que aprecian Chan K.F. *et al.* al demostrar la proteólisis de la calpaina 2, donde la activación de FAK presenta la aparición de espigas

o “*sprouts*” en los márgenes de la célula [Chan K.T. *et al.*, 2010]. Observaciones similares han sido descritas por Tong B. *et al.* al analizar la migración endotelial a partir de la activación de FAK y de la MMP2 [Tong B. *et al.*, 2012].

Por su parte, nuestros resultados sugieren que el silenciamiento de CAV1 en las células tumorales afecta la producción de factores que favorecen la migración endotelial. De acuerdo a nuestros resultados, existen otros modelos, donde las células cancerígenas son capaces de liberar sustancias al medio extracelular y de esta manera inducir la migración de las células endoteliales [Gao Z. *et al.*, 2010]. La secreción de factores pro-angiogénicos por las células tumorales del sarcoma de Ewing ya ha sido descrita por otros grupos [DuBois S.G. *et al.*, 2010; Stewart y Kleinerman, 2011]. Mediante el análisis de diferentes factores pro-angiogénicos secretados por las células tumorales, pudimos observar que solo bFGF se veía afectado por el silenciamiento de CAV1. Es importante mencionar que los trabajos realizados con factores pro-angiogénicos en el sarcoma de Ewing solo han analizado VEGF principalmente. VEGF ha sido descrito anteriormente como una diana indirecta de EWS/FLI1 [Takigami I. *et al.*, 2011]. Además, VEGF ha sido descrito como un factor pro-angiogénico capaz de estimular tanto la proliferación como la migración de las células endoteliales, siendo la primera su función principal. Por otro lado, una de las funciones principales que presenta bFGF es la inducción de la migración endotelial [Shi C. *et al.*, 2011]. El hecho de que la expresión de ninguna de las isoformas de VEGF se viera afectada por el silenciamiento de CAV1 explicaría que los efectos inducidos por dicho silenciamiento se tradujesen principalmente en la reducción de la capacidad migratoria de las células endoteliales.

Para respaldar estos datos, llevamos a cabo un experimento utilizando bFGF exógeno en el medio condicionado de las células donde CAV1 había sido silenciada como estimulante de la migración, y un anticuerpo neutralizante en el medio condicionado de las células control para bloquear la actividad pro-migratoria de bFGF endógeno. Los resultados mostraron un aumento en la inducción de migración de las células endoteliales al utilizar la proteína recombinante en el medio condicionado de los shCAV1 comparable a los valores obtenidos con medio condicionado de los controles.

Asimismo, el uso del anticuerpo neutralizante, produjo una reducción en la inducción de migración de las células endoteliales comparable a los valores obtenidos con medio condicionado de células shCAV1. Estos resultados resaltan la importancia de bFGF en la promoción del proceso de migración endotelial, donde su expresión puede promover la angiogénesis y el desarrollo tumoral [Cao R. *et al.*, 2012]. Además, confirman la importancia de bFGF en el proceso angiogénico en el sarcoma de Ewing.

Puesto que este proceso está organizado por la activación de diferentes vías y la implicación de diferentes componentes intra- y extra-celulares, la participación de otras estructuras proteicas no puede ser descartada [Carmeliet y Jain, 2011]. Se conoce que VEGF promueve angiogénesis a través del receptor VEGFR-2 también conocido como FLK1 [Ferrara, 2009], que PDGF participa en la maduración de los vasos sanguíneos estabilizando los canales de las células endoteliales [Jain, 2003], y que TGF- β promueve la estabilidad artero-venoso [Pardali E. *et al.*, 2010], entre otros. Por lo tanto, en nuestro modelo, el uso de arrays permitiría analizar mejor cuáles son los factores pro-angiogénicos alterados. Debido a la implicación de diferentes componentes, la interacción de CAV1 con alguno de ellos y el papel que esta pueda jugar en la regulación de bFGF no debe ser descartada.

Durante el desarrollo del proceso angiogénico tumoral, la familia de receptores Eph juega un papel muy importante [Mosch B. *et al.*, 2010]. Estos receptores han sido descritos como una pieza clave en el desarrollo vascular ya que junto con sus ligandos (las efrinas), presentan propiedades particulares en sus rutas de señalización. Ha sido descrito que pueden participar en diversas funciones celulares, tales como la movilidad celular, repulsión, adhesión, contactos célula-célula y célula-matriz, migración, proliferación, diferenciación celular, angiogénesis fisiológica y angiogénesis tumoral. En la angiogénesis tumoral, tanto los receptores como sus ligandos, pueden participar en el desarrollo de los límites vasculares así como en el aumento o disminución de la densidad vascular, el volumen tumoral, la proliferación celular y la progresión metastásica [Mosch B. *et al.*, 2010]. La interacción del receptor EphA2 con su ligando (EfnA1), ha sido descrita como una pieza clave en el proceso angiogénico tumoral

[Vihanto M. *et al.*, 2006, Wykosky y Debinski, 2010] y su interacción con CAV1 ha sido demostrada con anterioridad.

Para confirmar la presencia de estos receptores en nuestros modelos, y confirmando los resultados de un perfil de expresión comparando diferentes sarcomas donde los receptores EphA2, EphB3 y EphB4 aparecieron con una expresión elevada en pacientes con sarcoma de Ewing [Khan J. *et al.*, 2001], analizamos la expresión de éstos 3 miembros en líneas celulares así como en muestras de pacientes. Los resultados mostraron la expresión de EphA2 tanto por western blot en líneas celulares como por inmunohistoquímica en pacientes, mientras que EphB3 y EphB4 solo se pudieron observar a nivel proteico en las líneas celulares. Estos datos se relacionan con los trabajos realizados en otros sistemas biológicos [Brantley-Sieders, 2012; Umeda N. *et al.*, 2004], donde EphA2 se ve implicado directamente en el desarrollo angiogénico tumoral. Cabe resaltar que EphA2 presenta un motivo de unión a CAV1 en su dominio quinasa (WSYGIVMW). La función de este motivo de unión ha sido descrita al jugar un papel en la vía de señalización de EphA2 [Vihanto M.M. *et al.*, 2006].

Esta característica de EphA2 ya ha sido descrita con anterioridad, destacando la interacción de EphA2 con CAV1 y describiendo la necesidad de esta interacción para una señalización adecuada del receptor [Vihanto M.M. *et al.*, 2006]. Esta interacción la hemos podido confirmar en las células de sarcoma de Ewing, mediante la combinación de diferentes técnicas (inmunoprecipitación y co-inmunofluorescencia analizada por microscopía confocal). Nuestros resultados coinciden con lo observado por el trabajo de Vihanto M.M. *et al.* en células de ovario de hámster chino (*Chinese hamster ovary cells* – CHO –). En nuestros modelos el silenciamiento de CAV1 conlleva la redistribución y reducción del receptor EphA2 en las células de sarcoma de Ewing. Esto sugiere algún tipo de degradación o redistribución tras la modificación de su ruta de señalización. Esta redistribución podría verse afectada por una modificación en la membrana celular o bien, que la falta de CAV1 active una cascada de señales que impliquen la degradación del receptor. La degradación de este tipo de receptores (Eph), así como de otros receptores de membrana, ya ha sido descrita anteriormente por otros grupos [Kandouz

M. *et al.*, 2012]. Sin embargo, la redistribución o la degradación del receptor como efecto del silenciamiento de CAV1 queda pendiente de estudio.

Una vez establecida la relación entre EphA2 y CAV1, nos planteamos que la expresión de bFGF estuviese regulada por EphA2. Para esto decidimos llevar a cabo diferentes experimentos analizando el efecto de la estimulación de EphA2 con su ligando: EfnA1. Tal como se esperaba, los shCAV1 tuvieron una respuesta menor a la estimulación con EfnA1 al compararlos con los controles. Ha sido ampliamente descrito que en respuesta a la estimulación de EphA2, la ruta de señalización activada en consecuencia es MAPK/ERK [Fritsche-Guenther R. *et al.*, 2010; Kandouz M., 2012 Lin S. *et al.*, 2010]. En nuestro modelo, por el contrario, la estimulación de EphA2 por EfnA1 resultó en el aumento de la fosforilación de AKT en la treonina 308 (Thr308), en la serina 473 (Ser473) así como en el incremento en la transcripción de bFGF. Por su parte, la vía de señalización de MAPK no presentó ninguna modificación en su activación. Para confirmar que la transcripción de bFGF se producía mediante la activación de la ruta AKT, las células fueron estimuladas en presencia de un inhibidor de AKT. Este inhibidor impide la fosforilación de AKT sin afectar la ruta de PI3K. Los resultados permitieron confirmar la participación de la vía AKT en la transcripción de bFGF como respuesta a la estimulación de EphA2. Sin embargo, determinar el factor de transcripción preciso de bFGF en el sarcoma de Ewing aún está pendiente de estudio. Existen numerosos trabajos que describen la participación de bFGF en el desarrollo tumoral, pero muy poco es lo que se conoce sobre su regulación a nivel transcripcional. Algunos autores han descrito la regulación de bFGF a partir de diferentes factores de transcripción: Erg-1, HOXB7 y STAT-3 [Biesiada E. *et al.*, 1996; Care A. *et al.*, 1996; Fahmy R.G. *et al.*, 2003; Moffett J. *et al.*, 1996; Zeng Z.Z. *et al.*, 2002]. Estas vías de regulación han sido presentadas en diferentes modelos celulares entre los que destaca el modelo de glioma [Ueba T. *et al.*, 1999]. Para confirmar qué ruta de activación afecta la transcripción de bFGF (MEK1/2/Erk1/2 o PI3K/AKT1) [Wang K. *et al.*, 2009], en el sarcoma de Ewing aún queda trabajo pendiente. Nuestros resultados sugieren que la ruta PI3K/AKT1 parece ser la más indicada para poder llegar a determinar que factor o factores promueven la transcripción de bFGF en el sarcoma de Ewing.

Los resultados obtenidos, sugerían que los efectos observados podrían ser dependientes de la actividad quinasa del receptor. Ésta función ha sido mostrada como sobre-activada en diferentes tipos de cáncer [Beauchamp A. *et al.*, 2012; Kandouz M., 2012; Wykosky J. y Debinski W., 2008]. Además, la actividad del receptor se puede ver involucrada en diferentes funciones celulares, tales como la muerte celular y la autofagia [Kandouz M. *et al.*, 2010, Ståhl S. *et al.*, 2011]. Sin embargo, aún no queda clara si es la activación o la sobreexpresión de EphA2 la que juega un papel en la progresión tumoral. Puesto que el silenciamiento de CAV1 afectaba principalmente la fosforilación tirosina de EphA2, decidimos transfectar las líneas celulares RDES y TC71 con un dominante negativo de EphA2. Este mutante utilizado anteriormente en un modelo de cáncer prostático [Taddei M.L. *et al.*, 2009] fue capaz de repetir los efectos observados en el modelo shCAV1. Los resultados mostraron una disminución en la fosforilación constitutiva de EphA2 y su redistribución de la membrana a la fracción citoplasmática. En otro experimento, el medio condicionante del modelo RDES EphA2-Kd mostró una reducción en su capacidad de promover la migración de células endoteliales. Además, el análisis de los xenoinjertos inducidos mostró una reducción en el volumen tumoral así como un grado significativo de necrosis. Esto se relacionó con los análisis de densidad micro-vascular, donde ambos modelos presentaron una reducción en la cantidad de vasos sanguíneos. Finalmente, la estimulación del modelo TC71 EphA2-Kd con la proteína recombinante EfnA1, fue capaz de mostrar tanto la activación de AKT como la sobre-expresión de bFGF. Estos resultados reprodujeron en cierta medida lo observado por el silenciamiento de CAV1 y remarcan la importancia de la actividad quinasa-dependiente de EphA2 promoviendo la angiogénesis en el sarcoma de Ewing.

El efecto del silenciamiento de CAV1 en las células de sarcoma de Ewing ha mostrado la pérdida del fenotipo tumorigénico, la sensibilidad a la quimioterapia y la reducción en la migración y en sus capacidades invasivas [Tirado O.M. *et al.*, 2006; Tirado O.M. *et al.*, 2010; Sáinz-Jaspeado M. *et al.*, 2011]. Basándonos en la demostración que CAV1 es necesario para el correcto funcionamiento de las rutas de señalización controladas por EphA2 en el sarcoma de Ewing, decidimos analizar los efectos producidos en el desarrollo de mimetismo vascular como consecuencia del

silenciamiento de CAV1. Este proceso ha sido descrito anteriormente en otros modelos [Seftor R.E. *et al.*, 2012], destacando su participación en el desarrollo tumoral. EphA2 ha sido estrechamente relacionado con el proceso de mimetismo vascular en diferentes entidades tumorales, tales como el melanoma, el glioblastoma, carcinomas y sarcomas [El Hallani S. *et al.*, 2010; Kirschmann D.A. *et al.*, 2012; van der Schaft D.W. *et al.*, 2005; Warren y Shubik, 1966]. En el proceso de mimetismo vascular, EphA2 juega el papel de regulador de diferentes metaloproteinasas a través de la activación de PI3K. Esta activación supone el inicio de una cascada de señales que finaliza en la formación de vasos miméticos. Sin embargo, esta iniciación de vasos miméticos puede ser llevada a cabo por la actividad de VEGF o por EphA2 [Kirschmann D.A. *et al.*, 2012]. Puesto que en los modelos de baja expresión de CAV1, VEGF no presenta ningún tipo de cambio, EphA2 presenta una disminución en su expresión y se ha visto que la actividad quinasa del receptor no está relacionada directamente con la formación tubular, el papel independiente de quinasa podría ser una pieza clave en el proceso de vascularización mimética en el sarcoma de Ewing. Sin embargo, la actividad quinasa-independiente del receptor EphA2 también ha mostrado jugar un papel en el aporte vascular de modelos pancreáticos [Taddei M.L. *et al.*, 2009]. Esta actividad ha sido relacionada con el transporte lipídico, la adhesión celular, endocitosis y migración celular [Taddei M.L. *et al.*, 2009]. Además, otra estrategia a través de la cual el sarcoma de Ewing es capaz de mantener el aporte vascular necesario para la progresión tumoral es el mimetismo vascular [DuBois S.G. *et al.*, 2010].

Los resultados de analizar el mimetismo vascular en nuestros modelos permitieron observar que el silenciamiento de CAV1 reduce de manera considerable el desarrollo de vasos miméticos *in vivo* e impide la formación tubular *in vitro*. En consecuencia hipotetizamos que este efecto podría estar mediado por EphA2. Así analizamos el efecto de bloquear la actividad quinasa-dependiente del receptor EphA2 sobre el desarrollo de vasos miméticos. Los resultados mostraron que a pesar de tener una relación con el desarrollo de vasos angiogénicos, la actividad quinasa del receptor no afecta al proceso de mimetismo vascular en el sarcoma de Ewing. De hecho al sobre-expresar el receptor aun con menor actividad quinasa favorecía la formación de estructuras tubulares *in vitro*, sugiriendo que EphA2 podría mediar el mimetismo vascular a través de una

función independiente de su actividad quinasa. Para confirmar la participación de EphA2 en el proceso de formación de vasos miméticos, decidimos transfectar un mutante que carece de toda la región citoplasmática del receptor EphA2 (Δ Cyto), eliminando así sus funciones quinasa-dependientes e -independientes [Taddei M.L. *et al.*, 2009]. Los resultados mostraron que el bloqueo total del receptor tenía un efecto negativo en la formación de estructuras tubulares. Las células tranfectadas con el vector Δ Cyto fueron incapaces de formar túbulos, mientras que los controles los formaban de manera normal. Estos resultados confirman la importancia de ambas actividades pro-oncogénicas del receptor EphA2 en el sarcoma de Ewing. En este sentido, tal importancia ha sido observada en otros modelos tumorales [Chen L.X. *et al.*, 2011] resaltando la importancia de la actividad quinasa-independiente del receptor EphA2 no solo en el mimetismo vascular, sino también en otras funciones pro-tumorogénicas inherentes a la célula tumoral. Se abre así una nueva vía de estudio analizando el posible papel de EphA2 como factor oncogénico en el sarcoma de Ewing participando en otros procesos necesarios para la progresión del tumor.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el desarrollo de esta tesis doctoral se puede concluir:

- El silenciamiento de CAV1 produce una reducción en el desarrollo tumoral y el desarrollo vascular del sarcoma de Ewing.
- El silenciamiento de CAV1 se traduce en una reducción en la capacidad migratoria de las células endoteliales sin efectos en su proliferación.
- Esta reducción es consecuencia de la disminución en la secreción de bFGF por parte de las células de sarcoma de Ewing.
- CAV1 interactúa con el receptor EphA2, y el silenciamiento de CAV1 reduce la actividad tirosina quinasa de EphA2.
- La estimulación de EphA2 promueve la expresión de bFGF en el sarcoma de Ewing y requiere la presencia de CAV1.
- El bloqueo de la actividad quinasa del receptor EphA2 reproduce los efectos inducidos por el silenciamiento de CAV1 en el desarrollo vascular angiogénico del sarcoma de Ewing.
- La interacción CAV1/EphA2 participa en el proceso de mimetismo vascular en el sarcoma de Ewing.
- El proceso de mimetismo vascular es importante en el desarrollo tumoral del sarcoma de Ewing.
- La actividad quinasa-independiente del receptor EphA2 se encuentra involucrada directamente con el desarrollo de vasos miméticos en el sarcoma de Ewing.

BIBLIOGRAFÍA

- **Ahmadi SA, Moinfar M, Gohari Moghaddam K, Bahadori M.** Practical application of angiogenesis and vasculogenic mimicry in prostatic adenocarcinoma. *Arch Iran Med.* 2010 Nov;13(6):498-503.
- **Amore A, Cappelli G, Cirina P, Conti G, Gambaruto C, Silvestro L, Coppo R.** Glucose degradation products increase apoptosis of human mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Apr;18(4):677-88.
- **Applebaum MA, Goldsby R, Neuhaus J, Dubois SG.** Clinical features and outcomes in patients with secondary **Ewing sarcoma**. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Jul 27. doi: 10.1002/pbc.24251.
- **Arvand A, Denny CT.** Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene.* 2001 Sep 10;20(40):5747-54.
- **Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, Dubousset J, Mazabraud A.** Translocation of chromosome 22 in Ewing's sarcoma. *C R Seances Acad Sci III.* 1983;296(23):1105-7.
- **Balamuth NJ, Womer RB.** Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol.* 2010 Feb;11(2):184-92.
- **Barker LM, Pendergrass TW, Sanders JE, Hawkins DS.** Survival after recurrence of Ewing's sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol.* 2005 Jul 1;23(19):4354-62.
- **Beauchamp A, Lively MO, Mintz A, Gibo D, Wykosky J, Debinski W.** EphrinA1 is released in three forms from cancer cells by matrix metalloproteases. *Mol Cell Biol.* 2012 Aug;32(16):3253-64.
- **Beck R, Monument MJ, Watkins WS, Smith R, Boucher KM, Schiffman JD, Jorde LB, Randall RL, Lessnick SL.** EWS/FLI-responsive GGAA microsatellites exhibit polymorphic differences between European and African populations. *Cancer Genet.* 2012 Jun;205(6):304-12.
- **Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H.** Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist.* 2006 May;11(5):503-19.
- **Bid HK, Houghton PJ.** Targeting angiogenesis in childhood sarcomas. *Sarcoma.* 2011;2011:601514.

- **Biesiada E, Razandi M, Levin ER.** Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J Biol Chem.* 1996 Aug 2;271(31):18576-81.
- **Brantley-Sieders DM.** Clinical relevance of Ephs and ephrins in cancer: lessons from breast, colorectal, and lung cancer profiling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Feb;23(1):102-8.
- **Burgermeister E, Liscovitch M, Röcken C, Schmid RM, Ebert MP.** Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett.* 2008 Sep 18;268(2):187-201.
- **Bussolino F, Mantovani A, Persico G.** Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci.* 1997 Jul;22(7):251-6.
- **Cai QC, Jiang QW, Zhao GM, Guo Q, Cao GW, Chen T.** Putative caveolin-binding sites in SARS-CoV proteins. *Acta Pharmacol Sin.* 2003 Oct;24(10):1051-9.
- **Cantiani L, Manara MC, Zucchini C, De Sanctis P, Zuntini M, Valvassori L, Serra M, Olivero M, Di Renzo MF, Colombo MP, Picci P, Scotlandi K.** Caveolin-1 reduces osteosarcoma metastases by inhibiting c-Src activity and met signaling. *Cancer Res.* 2007 Aug 15;67(16):7675-85.
- **Cao R, Ji H, Feng N, Zhang Y, Yang X, Andersson P, Sun Y, Tritsarlis K, Hansen AJ, Dissing S, Cao Y.** Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 25;109(39):15894-9.
- **Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, Peschle C, Colombo MP.** HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4842-51.
- **Carmeliet P, Jain RK.** Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011 May 19;473(7347):298-307.
- **Chan KT, Bennin DA, Huttenlocher A.** Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem.* 2010 Apr 9;285(15):11418-26.

- **Chen LX, He YJ, Zhao SZ, Wu JG, Wang JT, Zhu LM, Lin TT, Sun BC, Li XR.** Inhibition of tumor growth and vasculogenic mimicry by curcumin through down-regulation of the EphA2/PI3K/MMP pathway in a murine choroidal melanoma model. *Cancer Biol Ther.* 2011 Jan 15;11(2):229-35.
- **Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, et al.** The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med.* 1994 Aug 4;331(5):294-9.
- **Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, de Jong P, Rouleau G, et al.** Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature.* 1992 Sep 10;359(6391):162-5.
- **Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV.** Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 2001 Sep 28;293(5539):2449-52.
- **DuBois SG, Marina N, Glade-Bender J.** Angiogenesis and vascular targeting in Ewing sarcoma: a review of preclinical and clinical data. *Cancer.* 2010 Feb 1;116(3):749-57.
- **El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idbah A, Marie Y, Mokhtari K, Thomas JL, Eichmann A, Delattre JY, Maniotis AJ, Sanson M.** A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain.* 2010 Apr;133(Pt 4):973-82.
- **Ewing, J.** Diffuse endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc.* 1921; 21, 17-24.
- **Ewing, J.** Further report of endothelial myeloma of bone. *Proc NY Pathol Soc,* 1924; 24, 93–100.
- **Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM.** Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med.* 2003 Aug;9(8):1026-32.
- **Ferrara N.** VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009 Dec;20(4):158-63.

- **Folberg R, Maniotis AJ.** Vasculogenic mimicry. *APMIS*. 2004 Jul-Aug;112(7-8):508-25.
- **Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP.** Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jul 1;23(7):1161-8
- **Fritsche-Guenther R, Noske A, Ungethüm U, Kuban RJ, Schlag PM, Tunn PU, Karle J, Krenn V, Dietel M, Sers C.** De novo expression of EphA2 in osteosarcoma modulates activation of the mitogenic signalling pathway. *Histopathology*. 2010 Dec;57(6):836-50. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03713.x.
- **Furuya M, Yonemitsu Y, Aoki I.** III. Angiogenesis: complexity of tumor vasculature and microenvironment. *Curr Pharm Des*. 2009;15(16):1854-67.
- **Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, Boucher KM, Watkins WS, Jorde LB, Graves BJ, Lessnick SL.** Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 22;105(29):10149-54.
- **Gao J, Knutsen A, Arbman G, Carstensen J, Frånlund B, Sun XF.** Clinical and biological significance of angiogenesis and lymphangiogenesis in colorectal cancer. *Dig Liver Dis*. 2009 Feb;41(2):116-22.
- **Gao Z, Wang X, Wu K, Zhao Y, Hu G.** Pancreatic stellate cells increase the invasion of human pancreatic cancer cells through the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis. *Pancreatology*. 2010;10(2-3):186-93.
- **García-Aragoncillo E, Carrillo J, Lalli E, Agra N, Gómez-López G, Pestaña A, Alonso J.** DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. *Oncogene*. 2008 Oct 9;27(46):6034-43.
- **Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR.** Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Dec;27(4):715-35.
- **Goh PP, Sze DM, Roufogalis BD.** Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 Dec;7(8):743-58.

- **Grohar PJ, Woldemichael GM, Griffin LB, Mendoza A, Chen QR, Yeung C, Currier DG, Davis S, Khanna C, Khan J, McMahon JB, Helman LJ.** Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jun 22;103(12):962-78. doi: 10.1093/jnci/djr156.
- **Heymach JV.** Angiogenesis and antiangiogenic approaches to sarcomas. *Curr Opin Oncol.* 2001 Jul;13(4):261-9. Review.
- **Hildebrand O.** Über das tubuläre Angiosarkom oder Endotheliom des Knochens. *Dtsch Z Chir.* 1890; 31, 261-281.
- **Hillen F, Kaijzel EL, Castermans K, oude Egbrink MG, Löwik CW, Griffioen AW.** A transgenic Tie2-GFP athymic mouse model; a tool for vascular biology in xenograft tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Apr 4;368(2):364-7.
- **Iwamoto Y.** Diagnosis and Treatment of Ewing's Sarcoma. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37(2): 79-89
- **Jain RK.** Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):685-93.
- **Janknecht R.** EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene.* 2005 Dec 19;363:1-14.
- **Jawad MU, Cheung MC, Min ES, Schneiderbauer MM, Koniaris LG, Scully SP.** Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973-2005. *Cancer.* 2009 Aug 1;115(15):3526-36.
- **Kandouz M, Haidara K, Zhao J, Brisson ML, Batist G.** The EphB2 tumor suppressor induces autophagic cell death via concomitant activation of the ERK1/2 and PI3K pathways. *Cell Cycle.* 2010 Jan 15;9(2):398-407.
- **Kandouz M.** The Eph/Ephrin family in cancer metastasis: communication at the service of invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2012 Jun;31(1-2):353-73.
- **Karski EE, Matthay KK, Neuhaus JM, Goldsby RE, Dubois SG.** Characteristics and outcomes of patients with Ewing sarcoma over 40 years of age at diagnosis. *Cancer Epidemiol.* 2012 Sep 4.

- **Khan J, Wei JS, Ringnér M, Saal LH, Ladanyi M, Westermann F, Berthold F, Schwab M, Antonescu CR, Peterson C, Meltzer PS.** Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med.* 2001 Jun;7(6):673-9.
- **Kirschmann DA, Seftor EA, Hardy KM, Seftor RE, Hendrix MJ.** Molecular pathways: vasculogenic mimicry in tumor cells: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2012 May 15;18(10):2726-32.
- **Kleibeuker EA, Griffioen AW, Verheul HM, Slotman BJ, Thijssen VL.** Combining angiogenesis inhibition and radiotherapy: a double-edged sword. *Drug Resist Updat.* 2012 Jun;15(3):173-82.
- **Kuo MW, Wang CH, Wu HC, Chang SJ, Chuang YJ.** Soluble THSD7A is an N-glycoprotein that promotes endothelial cell migration and tube formation in angiogenesis. *PLoS One.* 2011;6(12):e29000.
- **Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J.** Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007 Mar 30;100(6):782-94.
- **Le Lan C, Gallay J, Vincent M, Neumann JM, de Foresta B, Jamin N.** Structural and dynamic properties of juxta-membrane segments of caveolin-1 and caveolin-2 at the membrane interface. *Eur Biophys J.* 2010 Jan;39(2):307-25.
- **Leavey PJ, Mascarenhas L, Marina N, Chen Z, Krailo M, Miser J, Brown K, Tarbell N, Bernstein ML, Granowetter L, Gebhardt M, Grier HE; Children's Oncology Group.** Prognostic factors for patients with Ewing sarcoma (EWS) at first recurrence following multi-modality therapy: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2008 Sep;51(3):334-8.
- **Lessnick SL, Ladanyi M.** Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:145-59.
- **Li S, Huang NF, Hsu S.** Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem.* 2005 Dec 15;96(6):1110-26.

- **Lin S, Gordon K, Kaplan N, Getsios S.** Ligand targeting of EphA2 enhances keratinocyte adhesion and differentiation via desmoglein 1. *Mol Biol Cell.* 2010 Nov 15;21(22):3902-14.
- **Liu L, Brown D, McKee M, Lebrasseur NK, Yang D, Albrecht KH, Ravid K, Pilch PF.** Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab.* 2008 Oct;8(4):310-7.
- **Lücke, A.** Beiträge zur Geschwulstlehre: III. Lympho-sarcom der Achseldrüse: embolische Geschwülste der Lungen; allgemeine Leukämie. *Tod. Virchows Arch.* 1866; 35, 524-539.
- **Machado I, Noguera R, Pellin A, Lopez-Guerrero JA, Piqueras M, Navarro S, Llombart-Bosch A.** Molecular diagnosis of Ewing sarcoma family of tumors: a comparative analysis of 560 cases with FISH and RT-PCR. *Diagn Mol Pathol.* 2009 Dec;18(4):189-99.
- **Mackintosh C, García-Domínguez DJ, Ordóñez JL, Ginel-Picardo A, Smith PG, Sacristán MP, de Álava E.** WEE1 accumulation and deregulation of S-phase proteins mediate MLN4924 potent inhibitory effect on Ewing sarcoma cells. *Oncogene.* 2012 May 28. doi: 10.1038/onc.2012.153
- **Malempati S, Weigel B, Ingle AM, Ahern CH, Carroll JM, Roberts CT, Reid JM, Schmechel S, Voss SD, Cho SY, Chen HX, Krailo MD, Adamson PC, Blaney SM.** Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2012 Jan 20;30(3):256-62.
- **May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, Lunsford LB, Lewis BC, Delattre O, Zucman J, Thomas G, Denny CT.** Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jun 15;90(12):5752-6.
- **Mendiola M, Carrillo J, García E, Lalli E, Hernández T, de Alava E, Tirode F, Delattre O, García-Miguel P, López-Barea F, Pestaña A, Alonso J.** The orphan nuclear receptor DAX1 is up-regulated by the EWS/FLI1 oncoprotein

- and is highly expressed in Ewing tumors. *Int J Cancer*. 2006 Mar 15;118(6):1381-9.
- **Moffett J, Kratz E, Florkiewicz R, Stachowiak MK.** Promoter regions involved in density-dependent regulation of basic fibroblast growth factor gene expression in human astrocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2470-5.
 - **Mosch B, Reissenweber B, Neuber C, Pietzsch J.** Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis. *J Oncol*. 2010;2010:135285.
 - **Naing A, LoRusso P, Fu S, Hong DS, Anderson P, Benjamin RS, Ludwig J, Chen HX, Doyle LA, Kurzrock R.** Insulin growth factor-receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with refractory Ewing's sarcoma family tumors. *Clin Cancer Res*. 2012 May 1;18(9):2625-31.
 - **Nilsson G, Wang M, Wejde J, Kreicbergs A, Larsson O.** Detection of EWS/FLI-1 by Immunostaining. An Adjunctive Tool in Diagnosis of Ewing's Sarcoma and Primitive Neuroectodermal Tumour on Cytological Samples and Paraffin-Embedded Archival Material. *Sarcoma*. 1999;3(1):25-32.
 - **Ordóñez JL, Osuna D, Herrero D, de Alava E, Madoz-Gúrpide J.** Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Res*. 2009 Sep 15;69(18):7140-50.
 - **Owen LA, Lessnick SL.** Identification of target genes in their native cellular context: an analysis of EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Cell Cycle*. 2006 Sep;5(18):2049-53.
 - **Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P.** Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*. 2010 Sep;20(9):556-67.
 - **Park DS, Lee H, Frank PG, Razani B, Nguyen AV, Parlow AF, Russell RG, Hult J, Pestell RG, Lisanti MP.** Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and

- hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade. *Mol Biol Cell*. 2002 Oct;13(10):3416-30.
- **Phillips PG, Birnby LM.** Nitric oxide modulates caveolin-1 and matrix metalloproteinase-9 expression and distribution at the endothelial cell/tumor cell interface. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 May;286(5):L1055-65.
 - **Pizzo PA, Poplack DG, eds.** Principles and Practice of Pediatric Oncology. 6th ed. Philadelphia Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2011:987-1014.
 - **Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P.** Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011 Sep 16;146(6):873-87.
 - **Potikyan G, France KA, Carlson MR, Dong J, Nelson SF, Denny CT.** Genetically defined EWS/FLI1 model system suggests mesenchymal origin of Ewing's family tumors. *Lab Invest*. 2008 Dec;88(12):1291-302.
 - **Ravid D, Maor S, Werner H, Liscovitch M.** Caveolin-1 inhibits anoikis and promotes survival signaling in cancer cells. *Adv Enzyme Regul*. 2006;46:163-75.
 - **Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP.** Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38121-38.
 - **Reddy K, Zhou Z, Schadler K, Jia SF, Kleinerman ES.** Bone marrow subsets differentiate into endothelial cells and pericytes contributing to Ewing's tumor vessels. *Mol Cancer Res*. 2008 Jun;6(6):929-36.
 - **Riggi N, Stamenkovic I.** The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett*. 2007 Aug 28;254(1):1-10.
 - **Sáinz-Jaspeado M, Lagares-Tena L, Lasheras J, Navid F, Rodríguez-Galindo C, Mateo-Lozano S, Notario V, Sanjuan X, García Del Muro X, Fabra A, Tirado OM.** Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize. *Mol Cancer Res*. 2010 Nov;8(11):1489-500.

- **Sáinz-Jaspeado M, Martin-Liberal J, Lagares-Tena L, Mateo-Lozano S, Garcia del Muro X, Tirado OM.** Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe? *Oncotarget*. 2011 Apr;2(4):305-12.
- **Sanna E, Miotti S, Mazzi M, De Santis G, Canevari S, Tomassetti A.** Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of growth-associated genes in ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2007 Apr 15;313(7):1307-17.
- **Schubert W, Frank PG, Woodman SE, Hyogo H, Cohen DE, Chow CW, Lisanti MP.** Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):40091-8.
- **Seftor RE, Hess AR, Seftor EA, Kirschmann DA, Hardy KM, Margaryan NV, Hendrix MJ.** Tumor Cell Vasculogenic Mimicry: From Controversy to Therapeutic Promise. *Am J Pathol*. 2012 Aug 31.
- **Shi C, Lu J, Wu W, Ma F, Georges J, Huang H, Balducci J, Chang Y, Huang Y.** Endothelial cell-specific molecule 2 (ECSM2) localizes to cell-cell junctions and modulates bFGF-directed cell migration via the ERK-FAK pathway. *PLoS One*. 2011;6(6):e21482.
- **Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP.** Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*. 1999 Nov;19(11):7289-304.
- **Song Y, Xue L, Du S, Sun M, Hu J, Hao L, Gong L, Yeh D, Xiong H, Shao S.** Caveolin-1 knockdown is associated with the metastasis and proliferation of human lung cancer cell line NCI-H460. *Biomed Pharmacother*. 2012 Sep;66(6):439-47. doi: 10.1016/j.biopha.2012.03.001
- **Sotgia F, Martinez-Outschoorn UE, Howell A, Pestell RG, Pavlides S, Lisanti MP.** Caveolin-1 and cancer metabolism in the tumor microenvironment: markers, models, and mechanisms. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:423-67.
- **Ståhl S, Branca RM, Efazat G, Ruzzene M, Zhivotovsky B, Lewensohn R, Viktorsson K, Lehtiö J.** Phosphoproteomic profiling of NSCLC cells reveals that ephrin B3 regulates pro-survival signaling through Akt1-mediated

- phosphorylation of the EphA2 receptor. *J Proteome Res.* 2011 May 6;10(5):2566-78.
- **Stewart KS, Kleinerman ES.** Tumor Vessel Development and Expansion in Ewing's Sarcoma: A Review of the Vasculogenesis Process and Clinical Trials with Vascular-Targeting Agents. *Sarcoma.* 2011;2011:165837.
 - **Stout AP.** A tumor of the ulnar nerve. *Proc NY Pathol Soc,* 1918; 18: 2-12.
 - **Subbiah V, Anderson P, Lazar AJ, Burdett E, Raymond K, Ludwig JA.** Ewing's sarcoma: standard and experimental treatment options. *Curr Treat Options Oncol.* 2009 Apr;10(1-2):126-40.
 - **Subbiah V, Anderson P.** Targeted Therapy of Ewing's Sarcoma. *Sarcoma.* 2011;2011:686985.
 - **Subbiah V, Kurzrock R.** Ewing's sarcoma: overcoming the therapeutic plateau. *Discov Med.* 2012 Jun;13(73):405-15.
 - **Taddei ML, Parri M, Angelucci A, Onnis B, Bianchini F, Giannoni E, Raugei G, Calorini L, Rucci N, Teti A, Bologna M, Chiarugi P.** Kinase-dependent and -independent roles of EphA2 in the regulation of prostate cancer invasion and metastasis. *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1492-503.
 - **Tahir SA, Yang G, Goltsov AA, Watanabe M, Tabata K, Addai J, Fattah el MA, Kadmon D, Thompson TC.** Tumor cell-secreted caveolin-1 has proangiogenic activities in prostate cancer. *Cancer Res.* 2008 Feb 1;68(3):731-9.
 - **Takigami I, Ohno T, Kitade Y, Hara A, Nagano A, Kawai G, Saitou M, Matsuhashi A, Yamada K, Shimizu K.** Synthetic siRNA targeting the breakpoint of EWS/Fli-1 inhibits growth of Ewing sarcoma xenografts in a mouse model. *Int J Cancer.* 2011 Jan 1;128(1):216-26. doi: 10.1002/ijc.25564.
 - **Thompson TC, Tahir SA, Li L, Watanabe M, Naruishi K, Yang G, Kadmon D, Logothetis CJ, Troncoso P, Ren C, Goltsov A, Park S.** The role of caveolin-1 in prostate cancer: clinical implications. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010 Mar;13(1):6-11.
 - **Tirado OM, MacCarthy CM, Fatima N, Villar J, Mateo-Lozano S, Notario V.** Caveolin-1 promotes resistance to chemotherapy-induced apoptosis in

- Ewing's sarcoma cells by modulating PKC α phosphorylation. *Int J Cancer*. 2010 Jan 15;126(2):426-36.
- **Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llort A, Gallego S, Ban J, Kovar H, Notario V.** Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9937-47.
 - **Tong B, Lu D, Wei Z, Wang T, Xia Y, Dai Y.** Gleditsioside B, a triterpene saponin isolated from the anomalous fruits of *Gleditsia sinensis* Lam., abrogates bFGF-induced endothelial cell migration through preventing the activation of MMP-2 and FAK via inhibiting ERK and PI3K/AKT signaling pathways. *Vascul Pharmacol*. 2012 Sep 29. pii: S1537-1891(12)00189-9. doi: 10.1016/j.vph.2012.09.006
 - **Ture-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir G.** Chromosomal translocation (11; 22) in cell lines of Ewing's sarcoma. *C R Seances Acad Sci III*. 1983;296(23):1101-3.
 - **Ueba T, Kaspar B, Zhao X, Gage FH.** Repression of human fibroblast growth factor 2 by a novel transcription factor. *J Biol Chem*. 1999 Apr 9;274(15):10382-7.
 - **Umeda N, Ozaki H, Hayashi H, Oshima K.** Expression of ephrinB2 and its receptors on fibroproliferative membranes in ocular angiogenic diseases. *Am J Ophthalmol*. 2004 Aug;138(2):270-9.
 - **Uren A, Toretsky JA.** Ewing's sarcoma oncoprotein EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent. *Future Oncol*. 2005 Aug;1(4):521-8.
 - **Van Bergen T, Vandewalle E, Van de Veire S, Dewerchin M, Stassen JM, Moons L, Stalmans I.** The role of different VEGF isoforms in scar formation after glaucoma filtration surgery. *Exp Eye Res*. 2011 Nov;93(5):689-99.
 - **van der Schaft DW, Hillen F, Pauwels P, Kirschmann DA, Castermans K, Egbrink MG, Tran MG, Sciort R, Hauben E, Hogendoorn PC, Delattre O, Maxwell PH, Hendrix MJ, Griffioen AW.** Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11520-8.

- **Vihanto MM, Vindis C, Djonov V, Cerretti DP, Huynh-Do U.** Caveolin-1 is required for signaling and membrane targeting of EphB1 receptor tyrosine kinase. *J Cell Sci.* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2299-309.
- **Wang K, Jiang YZ, Chen DB, Zheng J.** Hypoxia enhances FGF2- and VEGF-stimulated human placental artery endothelial cell proliferation: roles of MEK1/2/ERK1/2 and PI3K/AKT1 pathways. *Placenta.* 2009 Dec;30(12):1045-51.
- **Warren BA, Shubik P.** The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Lab Invest.* 1966 Feb;15(2):464-78.
- **Widhe B, Widhe T.** Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am.* 2000 May;82(5):667-74.
- **Williams TM, Hassan GS, Li J, Cohen AW, Medina F, Frank PG, Pestell RG, Di Vizio D, Loda M, Lisanti MP.** Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):25134-45.
- **Williams TM, Lisanti MP.** Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005 Mar;288(3):C494-506.
- **Williams TM, Lisanti MP.** The caveolin proteins. *Genome Biol.* 2004;5(3):214. **Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J, Muller WJ, Chopra NG, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP.** Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51630-46.
- **Windsor R, Strauss S, Seddon B, Whelan J.** Experimental therapies in Ewing's sarcoma. *Expert Opin Investig Drugs.* 2009 Feb;18(2):143-59.
- **Woodman SE, Ashton AW, Schubert W, Lee H, Williams TM, Medina FA, Wyckoff JB, Combs TP, Lisanti MP.** Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *Am J Pathol.* 2003 Jun;162(6):2059-68.

- **Wykosky J, Debinski W.** The EphA2 receptor and ephrinA1 ligand in solid tumors: function and therapeutic targeting. *Mol Cancer Res.* 2008 Dec;6(12):1795-806.
- **Zeng ZZ, Yellaturu CR, Neeli I, Rao GN.** 5(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates DNA synthesis in human microvascular endothelial cells via activation of Jak/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling, leading to induction of expression of basic fibroblast growth factor 2. *J Biol Chem.* 2002 Oct 25;277(43):41213-9.

ANEXOS

Durante el desarrollo de esta tesis, el doctorando ha participado en la elaboración de un manuscrito y dos revisiones que se adjuntan a continuación:

1. Sáinz-Jaspeado M*, Lagares-Tena L*, Lasheras J, Navid F, Rodriguez-Galindo C, Mateo-Lozano S, Notario V, Sanjuan X, Garcia Del Muro X, Fabra A, Tirado OM. **Caveolin-1 modulates the ability of Ewing's sarcoma to metastasize.** Mol Cancer Res. 2010;8(11):1489-500.*Contributed equally
2. Sáinz-Jaspeado M, Martín-Liberal J, Lagares-Tena L, Mateo-Lozano S, García del Muro X, Tirado OM. **Caveolin-1 in sarcomas: friend or foe?** Oncotarget. 2011;2(4):305-12.
3. Martín Liberal J, Lagares-Tena L, Sáinz-Jaspeado M, Mateo-Lozano S, García Del Muro X, Tirado OM. **Targeted therapies in sarcomas: challenging the challenge.** Sarcoma. 2012;2012:626094.