

# **INTRODUCCIÓN**



---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. GENÉTICA DEL CÁNCER: PROTO-ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES

El cáncer es un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células, que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando la muerte del organismo. Un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células y la posterior adquisición de la capacidad invasiva que les permite escapar de su tejido de origen y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos.

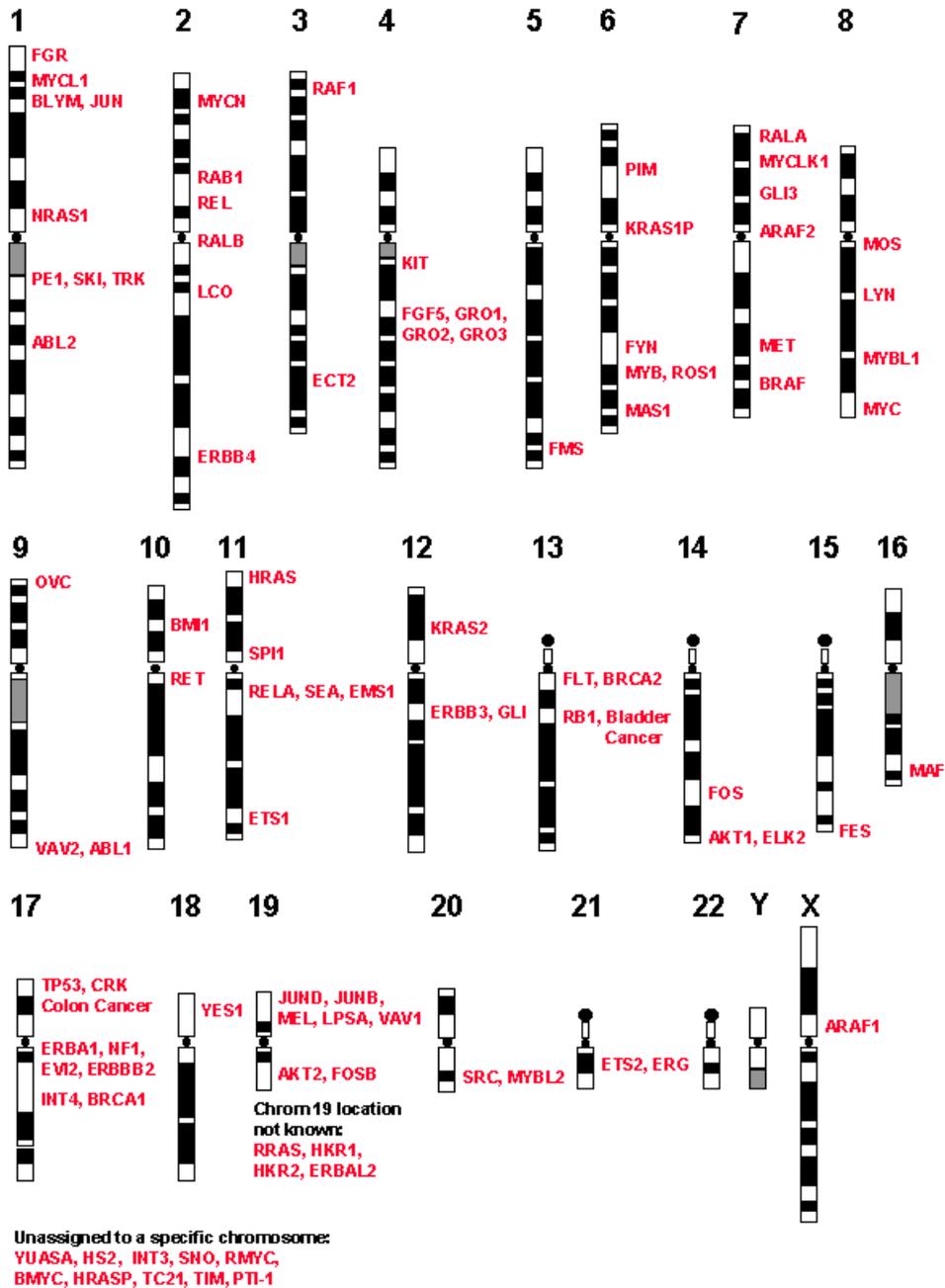
El cáncer constituye la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados y, debido al aumento paralelo de la incidencia de esta enfermedad con respecto al aumento de la esperanza de vida en la población, existe un gran interés médico y social por el cáncer. Los cinco tipos de cáncer más comunes en el mundo son los de pulmón, estómago, mama, colorrectal y de cuello uterino. La mayoría de los cánceres son el resultado de mutaciones en el DNA de una célula somática inicial, que son heredadas por su descendencia clonal. Aquellas células progenie que adquieren nuevas alteraciones genéticas que les confieren ventajas proliferativas son seleccionadas, provocando que ese grupo de células escape del control del crecimiento celular normal y dañe otras células sanas, impidiendo el funcionamiento del organismo (Chabner and Longo, 2001).

En los últimos años se han identificado, caracterizado y mapado muchos de los elementos genéticos involucrados en el desarrollo de las diversas formas de cáncer, datos que están recogidos en la base de datos OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) (Figura I1). En primer lugar se identificaron los oncogenes (versiones genéticamente alteradas de los proto-oncogenes), elementos genéticos que activan la proliferación celular e inhiben la apoptosis (Collins et al., 1997). Los oncogenes adquieren potencial neoplásico cuando se activan por mutaciones dominantes que les confieren una ganancia de función (Collins et al., 1997). Los genes supresores de tumores constituyen el segundo grupo de genes asociados al cáncer. A diferencia de los oncogenes, los genes supresores de tumores regulan negativamente la proliferación celular e inducen la apoptosis, y en las células cancerosas se encuentran versiones

---

mutadas que conllevan pérdidas de función (Collins et al., 1997). Se ha identificado un tercer tipo de genes relacionados con el desarrollo de tumores, los genes mutadores. Estos genes, que se encargan de reparar errores en el DNA, no regulan directamente el ciclo celular, sino que mantienen la integridad y fidelidad del genoma. Cuando se inactivan, las células adquieren potencial mutagénico, ya que se pueden activar oncogenes y/o inactivar genes supresores de tumores (Chabner and Longo, 2001).

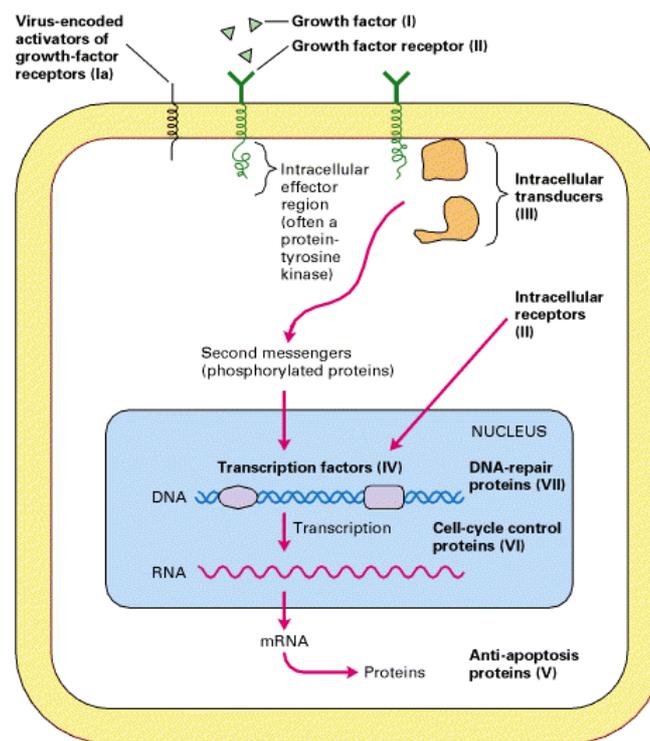
Los proto-oncogenes y genes supresores de tumores ejercen diferentes funciones en las células normales (Figura I2). Controlan la proliferación celular siendo factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, transductores de la señal mitogénica y factores de transcripción, así como la apoptosis (Collins et al., 1997). El gen *c-myc* es el ejemplo más importante de proto-oncogen con actividad transcripcional implicado en el desarrollo de tumores humanos de origen hematológico (Boxer and Dang, 2001). Cuando una célula pierde la capacidad de activar la vía de la apoptosis, de la misma manera que ocurre cuando se desregula el control de la proliferación, se hace susceptible a la transformación celular (Collins et al., 1997). El gen inhibidor de la apoptosis *bcl-2* es, hasta la fecha, el único oncogen descrito que participa en procesos neoplásicos. Se han realizado diversos experimentos que demuestran que la activación de *bcl-2* debido a translocaciones cromosómicas inhibe la apoptosis celular en células de origen linfoide (Collins et al., 1997). El papel de los genes supresores de tumores es prevenir la división celular cuando hay alteraciones que comprometen la fidelidad de la división celular (Figura I2). La inactivación de un gen supresor de tumores se produce por pérdida de heterocigosidad, haciendo que se pierda la capacidad de la célula de detener la progresión del ciclo celular ante condiciones adversas y de reparar errores en el DNA, de diferenciarse, y de inducir la muerte celular por apoptosis (Collins et al., 1997). El ejemplo de gen supresor de tumores más estudiado, *p53*, se describirá en más detalle a lo largo de este trabajo.



**Figura 11.** Localización cromosómica de los diferentes proto-oncogenes y genes supresores de tumores mapados hasta la fecha.

El desarrollo de un tumor es el resultado de varias mutaciones que confieren a la célula una ventaja proliferativa. En general, el fenotipo neoplásico resulta de una combinación de alteraciones genéticas que incluye la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores (Collins et al., 1997). Los procesos de división celular, diferenciación y muerte son básicamente similares en células normales y células tumorales. La única diferencia es que las células cancerosas presentan

aberraciones en los mecanismos de control de estos eventos. En las células tumorales hay cuatro tipos básicos de funciones celulares que se encuentran alteradas. En primer lugar, los puntos de control de la proliferación celular son defectivos. En segundo lugar, el programa de diferenciación celular puede estar alterado. Por otro lado, la integridad cromosómica y genética suele ser inestable, pudiendo generar un incremento de la capacidad metastásica de las células. Finalmente, el programa de muerte celular programada o apoptosis puede estar desregulado (Chabner and Longo, 2001). Por este motivo es necesario comprender cómo se regulan estas funciones celulares en las células normales y por qué mecanismos se alteran en las células tumorales para poder abordar el problema con terapias efectivas.



**Figura I2.** Esquema de las siete funciones celulares de los proto-oncogenes y genes supresores de tumores: factores de crecimiento (I), receptores de factores de crecimiento (II), proteínas involucradas en la señal de transducción mitogénica (III), factores de transcripción (IV), proteínas pro y antiapoptóticas (V), proteínas de control del ciclo celular (VI) y proteínas de reparación del DNA (VII). La expresión de formas mutadas de estas proteínas puede resultar en la formación de un tumor. Además, diferentes proteínas de origen vírico que activan receptores de factores de crecimiento (Ia), pueden inducir cáncer.

## 1. 2. CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El ciclo celular se divide en dos fases funcionales, S y M, y dos fases preparatorias, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Collins et al., 1997; Coqueret, 2002) (Figura I3). El material genético de la célula se duplica durante la fase S (Coqueret, 2002). Una vez duplicado el DNA, los cromosomas se segregan de manera equitativa a cada uno de los núcleos de las células hijas durante la fase M o mitosis (Coqueret, 2002). Las fases preparatorias G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se consideran puntos de control para asegurar que los procesos de síntesis de DNA y segregación cromosómica tienen lugar correctamente (Coqueret, 2002). Las células pueden dejar de dividirse y entrar en fase G<sub>0</sub> o quiescencia (Collins et al., 1997).

Existen dos niveles de control del ciclo celular: uno extrínseco y otro intrínseco. Las vías de regulación extrínsecas actúan en respuesta a las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula mientras que, las vías intrínsecas, son responsables de la progresión ordenada de los eventos del ciclo celular.

### 1.2.1. Regulación extrínseca de la proliferación celular

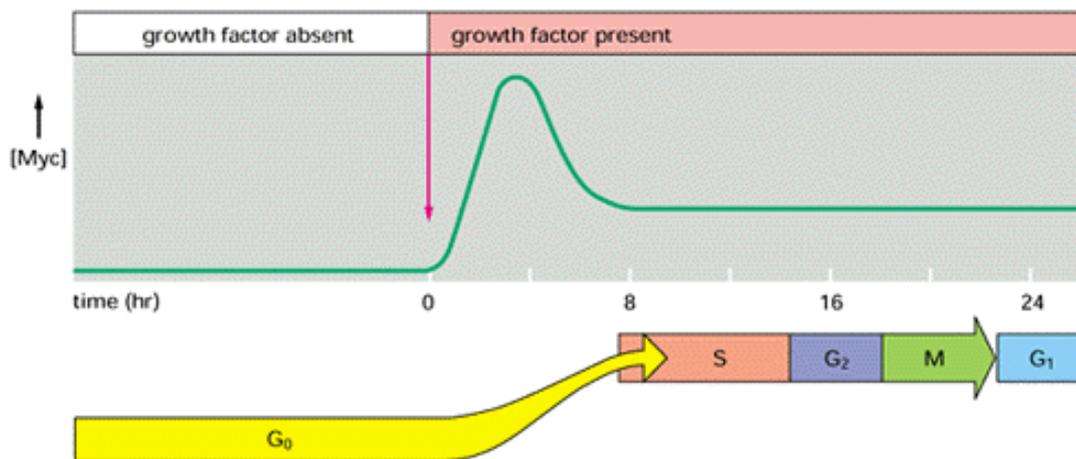
En los organismos pluricelulares la proliferación celular no sólo depende de la disponibilidad de nutrientes. Para que las células puedan proliferar o diferenciarse necesitan recibir factores de crecimiento, proteínas secretadas por las mismas células o por otros tipos celulares próximos o no, normalmente activas a baja concentración. La mayoría de los factores de crecimiento activan la proliferación celular, aunque otros son factores inhibidores (Chabner and Longo, 2001).

El inicio de la progresión del ciclo celular depende del balance neto de factores activadores e inhibidores, que actúan uniéndose con elevada afinidad a receptores de membrana específicos. Como consecuencia de esta unión se induce una cascada de reacciones bioquímicas, que en conjunto se conoce como vía de transducción de la señal mitogénica, que comunica la superficie de la célula con el núcleo. En la transducción de la señal participa un grupo heterogéneo de segundos mensajeros que incluye AMPc, iones o pequeñas moléculas como el inositol fosfato, que en última instancia, activan quinasas que fosforilan y modulan la actividad de factores de transcripción específicos en el núcleo. Una vez que la señal llega al núcleo, se producen cambios en la expresión génica, iniciándose la progresión del ciclo celular desde las fases G<sub>0</sub> o G<sub>1</sub> a S.



**Figura I3.** Fases del ciclo celular. Las células en interfase duplican su material genético (fase S), y lo reparten de manera equitativa a las células hijas durante la división celular o mitosis (M). El ciclo celular es un proceso finamente regulado y controlado por las fases preparatorias G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, que aseguran que la división celular tiene lugar correctamente.

Los genes que se inducen en respuesta a los factores de crecimiento se clasifican en dos grupos: genes de respuesta temprana y genes de respuesta tardía (Lodish, 2000). Los genes de respuesta temprana se inducen en 15 minutos, tras la estimulación con factores de crecimiento y sin requerimiento de síntesis proteica (Figura I4). Los genes de respuesta tardía no se activan antes de 1 hora post-estimulación y su inducción requiere síntesis proteica. Los genes de respuesta temprana actúan como proteínas reguladoras, activando la expresión de los genes de respuesta tardía (Lodish, 2000). Los genes de respuesta temprana mejor caracterizados son los proto-oncogenes *c-myc*, *fos* y *jun* y *Sp1*.



**Figura I4.** Ejemplo de la inducción del gen de respuesta temprana *c-myc* tras la estimulación de la célula con factores de crecimiento. Diferentes modificaciones post-traduccionales, que tienen lugar en respuesta a las cascadas de transducción de señal, activan al factor de transcripción c-Myc a los pocos minutos de la estimulación con factores de crecimiento. La activación de factores de transcripción como c-Myc regula la expresión de los genes de respuesta tardía, involucrados en el control del ciclo celular.

#### • Papel del factor de transcripción Sp1 en el control del ciclo celular

La familia de factores de transcripción Sp1/KLF está formada por, al menos, veinte miembros que incluyen Sp1-4 y diferentes factores similares al factor de transcripción de *Drosophila* krüppel, que se clasifican en diferentes subfamilias (Black et al., 2001; Marco et al., 2003; Suske, 1999). Estos factores de transcripción pueden tanto activar como reprimir la transcripción de más de 100 genes involucrados en la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis (Marco et al., 2003). Su actividad transcripcional se lleva a cabo mediante la unión de estos factores a diferentes regiones promotoras, y a su posterior interacción con la maquinaria de transcripción basal (Black et al., 2001; Black et al., 1999; Grinstein et al., 2002; Marco et al., 2003). La transcripción dependiente de Sp1 puede regular positiva o negativamente la proliferación celular, dependiendo de si el promotor corresponde a un proto-oncogen o a un gen supresor de tumores, y al contexto celular (Black et al., 2001). Por este motivo la familia proteica Sp1/KLF está relacionada con procesos de oncogénesis y, en algunos tumores, se ha detectado que la expresión de estos factores está alterada (Black et al., 2001).

Los miembros de la familia Sp1/KLF se caracterizan por la presencia de tres regiones reguladoras claramente diferenciadas (Figura I5): diversos dominios de transactivación, un dominio implicado en la multimerización y en la modulación de la

---

transactivación, y un dominio de unión al DNA. El dominio C-terminal está muy conservado en los miembros de esta familia y contiene tres dedos de zinc, involucrados en el reconocimiento e interacción con el DNA (Black et al., 2001; Black et al., 1999; Grinstein et al., 2002; Marco et al., 2003). Los miembros de esta familia se unen al DNA, con diferentes afinidades, a secuencias ricas en CG (cajas CG y cajas CACCC), conocidas en conjunto como sitios Sp1. Se han identificado sitios Sp1 en los promotores de genes que codifican reguladores del ciclo celular (*p15*, *p21<sup>WAF1</sup>*, *p27*), MAP quinasas, GTP-asas (Ha-Ras), histonas, enzimas necesarias para la síntesis de DNA (timidín quinasa, dihidrofolato reductasa), factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , PDGF) y receptores de factores de crecimiento (receptor de insulina) (Marco et al., 2003).

Sp1 fue el primer factor de transcripción que se identificó y clonó en mamíferos (Kadonaga et al., 1987). Diferentes estudios demostraron que el factor Sp1 se encarga de reclutar al factor TBP, fijando el inicio de la transcripción en promotores *TATA-less* (Kadonaga et al., 1987). Se ha demostrado que la actividad del factor Sp1 y de todos los miembros de la familia está finamente regulada a nivel de transcripción (regulación de la transcripción de los genes de la familia Sp1/KLF y *splicing* alternativo). Por ejemplo, la expresión del gen *Sp1* está autorregulada, ya que su promotor contiene regiones de unión para Sp1 y Sp3 (Nicolás et al., 2001). La actividad de los miembros de la familia Sp1/KLF también se regula a nivel post-traducciona, mediante procesos de glicosilación, fosforilación y acetilación, variaciones en la estructura de la proteína, e interacciones entre los miembros de la familia Sp1/KLF (Kadonaga et al., 1987).

La fosforilación en diferentes residuos del dominio C-terminal de Sp1 se ha relacionado con cambios en la actividad transcripcional del factor, a través de la modulación de su capacidad de unión al DNA. Diferentes quinasas celulares, fosforilan Sp1 en respuesta a cascadas de transducción de señal, iniciadas tras la estimulación con factores de crecimiento (Black et al., 2001; Grinstein et al., 2002). Se ha demostrado que, en células epiteliales, el factor Sp1 se encuentra muy fosforilado durante la progresión a través de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular y es necesario para la correcta expresión de la ciclina D1 (Grinstein et al., 2002).



**Figura 15.** Estructura primaria de los factores de transcripción Sp1 (arriba) y Sp3 (abajo). Los dos factores contienen tres dedos de zinc en su extremo C-terminal, constituyendo un dominio de unión al DNA muy conservado (en azul claro). El extremo N-terminal contiene unos dominios ricos en glutamina (dominio A, en rosa) y serina/treonina (dominio B, en naranja), involucrados en la multimerización y en la activación transcripcional de manera sinérgica. Además, estos factores contienen una región muy cargada (dominios C y D, en verde y rojo respectivamente), también muy importante para la unión al DNA y el sinergismo localizado en el extremo C-terminal. El dominio IH (en amarillo) presente en el factor Sp3 es un dominio represor.

Los diferentes miembros de la familia proteica Sp1/KLF interaccionan entre ellos, modulando su actividad transcripcional. El ejemplo más estudiado es la interacción entre los factores de expresión ubicua Sp1 y Sp3, que reconocen y compiten por las mismas secuencias ricas en CG en el DNA, presentes en gran cantidad de promotores de numerosos genes (Kardassis et al., 1999; Koutsodontis et al., 2002; Majello et al., 1994; Opitz and Rustgi, 2000). La proteína Sp1 se considera, mayoritariamente, un activador transcripcional, mientras que el factor Sp3 puede actuar tanto activando como reprimiendo la transcripción según el contexto del promotor y la proporción entre Sp1/Sp3 en la célula (Hagen et al., 1994; Suske, 1999; Udvardia et al., 1993).

Los miembros de la familia Sp1/KLF interaccionan con los productos de expresión de diversos proto-oncogenes y genes supresores de tumores para modular la transcripción de diferentes genes involucrados en la proliferación celular. Diferentes estudios han demostrado que el factor Sp1 interacciona con proteínas como p53, ciclina D1 o Retinoblastoma (pRB o Rb) (Black et al., 2001; Grinstein et al., 2002; Peñuelas et al., 2003). Se han identificado secuencias de unión de Sp1 y pRB en los promotores de genes como *c-fos*, *c-jun* y *c-myc* (Black et al., 2001).

#### • Papel del proto-oncogen *c-myc* en el control del ciclo celular

La proteína c-Myc pertenece a la familia proteica Myc, que incluye a B-Myc, L-Myc y N-Myc (Gartel and Shchors, 2003). Son factores de transcripción de tipo básico, hélice-

---

bucle-hélice de unión al DNA y de cremallera de leucinas por las que interaccionan con otras proteínas (bHLH-LZ) (Boxer and Dang, 2001; Gartel and Shchors, 2003). Existen tres isoformas proteicas de c-Myc: una proteína de 62 kDa producto del codón de iniciación canónico AUG, una proteína de 64 kDa resultado de la traducción a partir de un triplete CUG, y una isoforma de 45 kDa derivada de un inicio de traducción interno (Boxer and Dang, 2001).

Se han identificado cuatro promotores funcionales en el gen *c-myc* aunque, en células normales, el 80-90% del RNA correspondiente a *c-myc* se encuentra bajo control transcripcional del promotor 2 (Boxer and Dang, 2001). Se han descrito numerosos factores de transcripción que se unen *in vivo* a diferentes regiones del promotor de *c-myc*, entre ellos, NF- $\kappa$ B y Sp1 (Black et al., 2001; Boxer and Dang, 2001; Vaquero and Portugal, 1998). También se ha descrito el gen *c-myc* es diana de la vía de APC/ $\beta$ -catenina/Tcf (Boxer and Dang, 2001).

La proteína c-Myc está formada por tres dominios funcionales (Boxer and Dang, 2001; Gartel and Shchors, 2003) (Figura I6): dominio N-terminal, dominio central y dominio C-terminal (Boxer and Dang, 2001). El dominio N-terminal incluye las regiones Myc Box I y II (MB1 y MB2), altamente conservadas y únicas en los miembros de la familia proteica Myc e involucradas en la activación de la transcripción (Boxer and Dang, 2001). El dominio central está implicado en la interacción de c-Myc con los factores de transcripción Sp1 y Smad (Boxer and Dang, 2001). El dominio C-terminal contiene el motivo bHLH-LZ, formado por una región básica hélice-bucle-hélice, involucrada en la unión a la secuencia CACGTC o caja E (*E box*), presente en los promotores de diversos genes, y la región de cremallera de leucinas, necesaria para la interacción con otras proteínas de tipo bHLH-LZ, como Max (Boxer and Dang, 2001; Gartel and Shchors, 2003).

El factor de transcripción c-Myc regula la expresión de genes que controlan la progresión celular, la muerte celular programada o apoptosis, los procesos de senescencia, la diferenciación celular y otros procesos celulares básicos (Boxer and Dang, 2001; Gartel and Shchors, 2003). Además de regular la expresión génica, c-Myc regula el crecimiento celular, estimulando la biosíntesis proteica (Boxer and Dang, 2001; Gartel and Shchors, 2003). La proteína c-Myc se une a la secuencia CACGTC (caja E) en forma de heterodímero con la proteína Max, para poder activar la

transcripción génica (Boxer and Dang, 2001; Gartel and Shchors, 2003). Los heterodímeros Myc/Max activan la transcripción de genes implicados en la progresión celular, en concreto en la transición de la fase  $G_0$  a  $G_1$  y en la progresión de la fase  $G_1$  a S, tales *cdc25A*, *cdk4*, *ciclinas D, E y A* (Gartel and Shchors, 2003), y también de genes implicados en la apoptosis y a senescencia, como *p53*, *cdc25A* y *bax* (Boxer and Dang, 2001). A diferencia de c-Myc, Max no contiene regiones transreguladoras, hecho que sugiere que su papel en el control del ciclo celular es regular la actividad de la proteína c-Myc (Boxer and Dang, 2001). La proteína Max es capaz de formar homodímeros Max/Max, y heterodímeros Max/Mad, Max/Mga y Max/Mnt con capacidad represora transcripcional opuesta a la de los heterodímeros Myc/Max (Boxer and Dang, 2001). Las proteínas Mad contienen un dominio SID (*sin3-interacting domain*), que es capaz de reclutar al corepresor con actividad deacetilasa de histonas Sin3A (Boxer and Dang, 2001). Los heterodímeros Max/Mad se unen a las mismas cajas E que Myc/Max, inhibiendo la transcripción génica (Boxer and Dang, 2001). Las proteínas Mad, por lo tanto, ejercen una función inhibitoria de c-Myc compitiendo por Max (Boxer and Dang, 2001).



**Figura 16.** Estructura primaria de la proteína c-Myc. En la región N-terminal se encuentran los dominios conservados Myc box I y II (MB1 y MB2, en rosa y naranja), implicados en la transactivación transcripcional. El extremo C-terminal contiene la región básica, el motivo hélice-bucle-hélice y la cremallera de leucinas (en azul, rojo y lila, respectivamente), implicada en el reconocimiento del DNA y la interacción con la proteína Max. Los factores de transcripción Sp1 y Smad se unen a la región central de la proteína c-Myc.

La proteína c-Myc no sólo activa la proliferación induciendo la transcripción de genes que promueven la progresión del ciclo celular. Los complejos Myc/Max pueden actuar como represores transcripcionales de genes relacionados con la inhibición del ciclo celular, como *p15*, *p21<sup>WAF1</sup>* y *p27* (Gartel and Shchors, 2003; Gartel et al., 2001). Se han descrito dos mecanismos de represión transcripcional mediados por Myc/Max (Gartel and Shchors, 2003). En un primer mecanismo, el complejo Myc/Max reprime la

transcripción de genes que contienen el elemento iniciador de la transcripción Inr en sus promotores (Gartel and Shchors, 2003). Se ha descrito que el heterodímero se une al elemento Inr presente en los promotores de los genes *p15* y *p21<sup>WAF1</sup>* e interacciona con diversos factores activadores de la transcripción, como YY1, TFII-I o Miz-1, interfiriendo con su actividad (Gartel and Shchors, 2003). Existe un segundo mecanismo de represión transcripcional, independiente del elemento Inr. La proteína c-Myc puede unirse por su dominio central a la proteína Sp1 o al complejo Sp1/Smad, inhibiendo la actividad de estos factores de transcripción, independientemente de la unión a DNA (Gartel and Shchors, 2003). Cuando c-Myc forma complejos con Sp1 o Sp1/Smad, no heterodimeriza con Max e inhibe la transcripción regulada por Sp1 (Gartel and Shchors, 2003). Se ha identificado este mecanismo de represión en los promotores de los genes inhibidores de CDks *p15*, *p21<sup>WAF1</sup>* y *p27* (Gartel and Shchors, 2003).

### 1.2.2. Regulación intrínseca de la proliferación celular

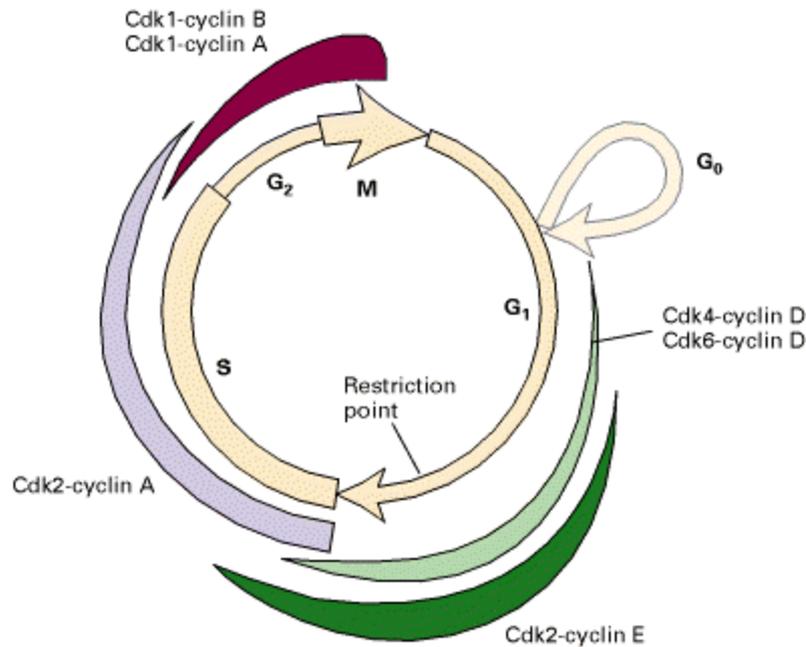
La progresión secuencial a través de las diferentes fases del ciclo celular está determinada por la activación de cascadas de fosforilación/defosforilación que modulan la actividad de diferentes proteínas, que se encuentra bajo “supervisión” de los diferentes puntos de control, distribuidos a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (Collins et al., 1997).

La maquinaria básica que coordina la progresión del ciclo celular está constituida por una familia de proteínas denominadas quinasas dependientes de ciclinas o CDKs ya que, para ser activas necesitan de la asociación a un segundo tipo de proteína, las ciclinas, que se expresan a lo largo del ciclo celular de forma transitoria y en el momento preciso (Collins et al., 1997; Coqueret, 2002). El holoenzima completo está constituido por una subunidad catalítica, la quinasa, y una subunidad reguladora específica, la ciclina (Collins et al., 1997). Las ciclinas forman una familia proteica caracterizada por la presencia de una región de 100 aminoácidos conocida como “*cyclin box*”, dominio necesario para la interacción con la quinasa (Smits and Medema, 2001). Se han identificado diferentes complejos ciclina/CDK y la activación de estos complejos de manera secuencial controla la progresión ordenada del ciclo celular (Smits and Medema, 2001).

La síntesis de las diferentes ciclinas en cada momento del ciclo celular constituye un nivel de regulación de la actividad de las CDKs (Figura I7). Por ejemplo, los genes de respuesta temprana como Sp1 y c-Myc, en respuesta a los factores de crecimiento presentes en el medio, activan la expresión de la ciclina D (D1, D2 y D3), que forma complejo con la cdk4 y cdk6 durante las fases G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> (Black et al., 2001; Gartel and Shchors, 2003; Grinstein et al., 2002). Durante la fase G<sub>1</sub> los complejos cdk4/6-ciclina D activan la transcripción de la ciclina E, que regula la transición G<sub>1</sub>/S formando un complejo con la cdk2 (Coqueret, 2002). Tras la síntesis de la ciclina E, se sintetiza la ciclina A, que se une a la cdk2 durante la fase S, y a la cdc2 (cdk1) durante la fase G<sub>2</sub> (Coqueret, 2002). La entrada en la fase de división o fase M está regulada por las ciclinas de clase B, que también forman un complejo con la cdc2 (Coqueret, 2002). El complejo ciclina B/cdc2 es el responsable de la inducción de la mitosis y también se conoce como factor MPF (*M phase-promoting factor*) (Coqueret, 2002; Smits and Medema, 2001).

Los complejos ciclina/cdk no son activos por sí solos. El complejo ciclinaH/cdk7 es una quinasa activadora de CDK o CAK que fosforila diferentes residuos treonina de los complejos ciclina/cdk activándolos. Existe una actividad quinasa dependiente de ATP que realiza fosforilaciones inactivadoras en residuos treonina y tirosina de los complejos ciclina/cdk. Las fosforilaciones inactivadoras pueden revertirse por acción de la familia de fosfatasas cdc25 (Lodish, 2000).

La familia proteica de inhibidores de CDKs o CKIs constituye un nivel adicional de regulación de la actividad de las quinasas dependientes de ciclina. Se han descrito dos clases de CKIs: la familia INK4A (p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup> y p19<sup>INK4D</sup>), que se une a la cdk4 y 6, interfiriendo con la asociación de estas cdk a sus ciclinas, y la familia CIP/KIP (p21<sup>WAF1</sup>, p27 y p57), que forma complejos ternarios con los complejos ciclina E/cdk2 y ciclina A/cdk2, inhibiendo su actividad, mientras que en el caso del complejo ciclina D/cdk ejercen la función contraria (Alcorta et al., 1996).



**Figura I7.** Activación secuencial de los diferentes complejos ciclina-cdk a lo largo de la progresión del ciclo celular. La transcripción de la ciclina D se activa en respuesta a los genes de respuesta temprana, como Sp1 o c-Myc. Los complejos cdk4/6-ciclina D activan la transcripción de la ciclina E, que regula la transición G<sub>1</sub>/S formando un complejo con la cdk2. La progresión a través de la fase S está mediada por la síntesis de la ciclina A, que se une a la cdk2, durante la fase S. La entrada en la mitosis está mediada por el complejo cdc2-ciclina A, y regulada por las ciclinas de clase B, que también forman un complejo con la cdc2.

Una vez que un complejo ciclina/cdk específico ha ejercido su control en un punto concreto de la progresión del ciclo celular, normalmente es necesaria su inactivación para que la célula pueda completar la fase con éxito. El proceso de inactivación definitivo de estos complejos está mediado por procesos de proteólisis dependientes de ubiquitina (Lodish, 2000).

La activación secuencial de los diferentes complejos ciclina/cdk modula la actividad de la proteína Retinoblastoma, que juega un papel central en la regulación del ciclo celular (Baus et al., 2003; Peñuelas et al., 2003; Tsugu et al., 2000). La proteína pRB es una proteína nuclear que une de manera específica otras proteínas implicadas en el control de la expresión génica (Lodish, 2000). La capacidad de unión de pRB a estas proteínas depende de su estado de fosforilación (Baus et al., 2003). En las células normales, tanto quiescentes como proliferantes, la proteína pRB está siempre presente en el núcleo y lo único que varía es el estatus de fosforilación (Peñuelas et al., 2003) (Figura I8). Existen dos proteínas relacionadas con pRB: p107 y p130, y en conjunto se conoce esta familia como “proteínas *pocket*”, debido a la presencia de un dominio

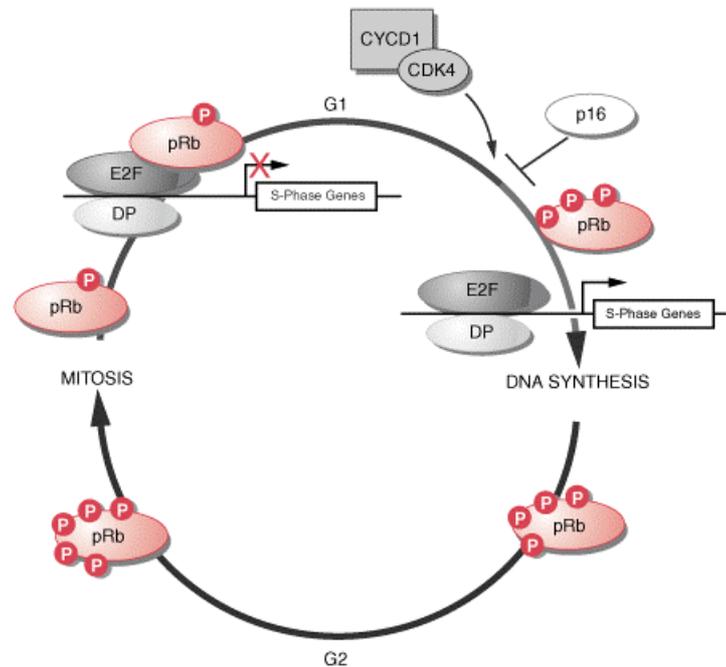
pocket implicado en la unión a diferentes proteínas celulares como la familia de factores de transcripción E2F (Baus et al., 2003).

La forma hipofosforilada de la proteína pRB se encuentra presente en las células durante la fase  $G_1$  del ciclo celular (Tsugu et al., 2000). La proteína pRB hipofosforilada se encuentra unida al factor de transcripción E2F (heterodímero formado por el polipéptido E2F y la proteína DP), manteniendo su estado inactivo. (Bernards et al., 1989). A pesar de que el complejo E2F/pRB puede unirse al DNA, el complejo actúa como un represor dominante, manteniendo reprimidos los genes diana del factor E2F durante la fase  $G_1$  (Bernards et al., 1989) (Figura I8).

El complejo ciclina D/cdk4-6 activo fosforila diferentes residuos de la proteína pRB durante la fase  $G_1$ , haciendo que se pierda afinidad por el factor E2F, que queda libre. El factor E2F libre activa la transcripción de genes implicados en la transición de  $G_1$  a S, como *ciclina E*, *ciclina A* y *c-myc*, y de genes implicados en la síntesis y replicación del DNA, como el gen de la DNA *polimerasa A* (Peñuelas et al., 2003). Una vez sintetizada la ciclina E al final de la fase  $G_1$  y la ciclina A durante la fase S, los complejos ciclina E/cdk2 y ciclina A/cdk2 se encargan de dirigir la fosforilación de pRB para que el factor E2F pueda activar la transcripción de los genes necesarios para la progresión a través del ciclo hasta llegar a la fase  $G_2$  (Bernards et al., 1989). La fosfatasa PP-1 (*phosphatase 1-like protein*) se encarga de defosforilar la proteína pRB durante la mitosis, para que vuelva a su estado hipofosforilado activo después de la división celular (Peñuelas et al., 2003).

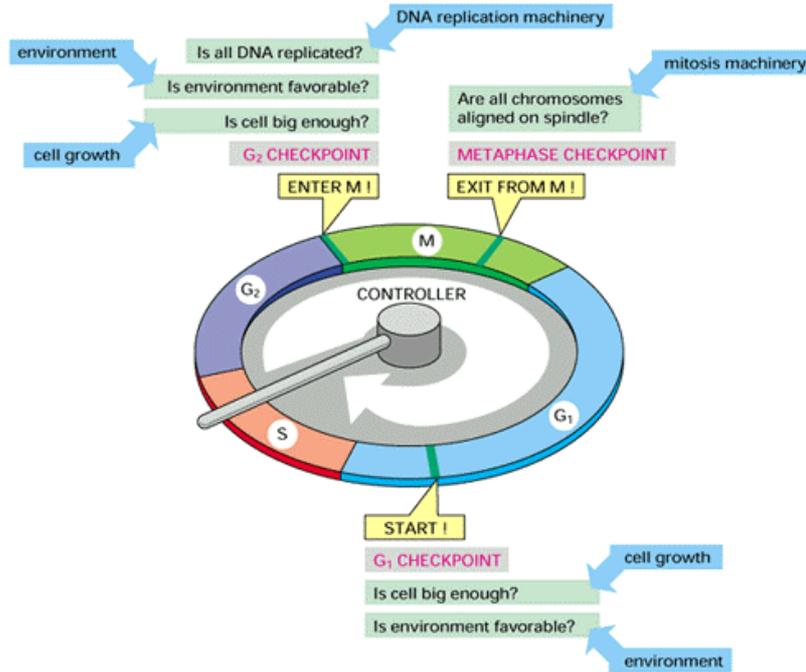
La transición ordenada a través de las diferentes fases del ciclo celular está regulada por los puntos de control (*checkpoints*), que se encargan de asegurar el éxito de la división celular (Figura I9). El punto de restricción (R), *start* (S), o control de  $G_1$ , evita la entrada de las células en la fase S cuando las condiciones ambientales o el tamaño celular no son adecuados, o cuando la célula tiene el DNA dañado (Chabner and Longo, 2001). El punto de control de  $G_2$  controla que la replicación durante la fase S ha sido correcta y que las condiciones ambientales son apropiadas para que la célula pueda iniciar la mitosis (Chabner and Longo, 2001). Durante la transición de la metafase a la anafase existe un punto de control adicional, que asegura que los cromosomas están correctamente alineados y que no hay errores en el huso acromático, antes de iniciarse la segregación cromosómica a las células hijas (Castedo et al., 2004a; Huang et al., 2005). Cuando se activan los puntos de control en respuesta a alteraciones que pueden

comprometer la fidelidad de la división, se produce la parada de la progresión del ciclo celular (Collins et al., 1997).



**Figura 18.** Variaciones del estado de fosforilación de los miembros de la familia de Retinoblastoma. La proteína pRB se encuentra hipofosforilada y unida al factor de transcripción E2F durante las fases  $G_0$  y  $G_1$ . La activación de los complejos ciclina-cdk en respuesta a mitógenos provoca la fosforilación de la proteína pRB en diferentes residuos, favoreciendo la liberación del factor de transcripción E2F y la expresión de diferentes genes implicados en la progresión del ciclo celular.

Parte importante de este trabajo se centra en la respuesta celular frente a alteraciones en el DNA provocadas por diferentes agentes antitumorales. Las células normales inician una serie de respuestas cuando presentan lesiones en el DNA. Estas respuestas incluyen la parada del ciclo celular en las fases  $G_1$  o  $G_2$ , la activación de genes de reparación del DNA, la inducción de la senescencia celular y la muerte celular por apoptosis. Tal y como se desarrollará más adelante, los genes supresores de tumores *p53* y *ATM* son puntos clave en la respuesta celular frente al daño en el DNA. Actúan activando inhibidores de quinasas, que bloquean la fosforilación de la proteína pRB, deteniendo la progresión del ciclo celular en las fases  $G_1$  o  $G_2$ .



**Figura 19.** Esquema de la localización de los diferentes puntos de control del ciclo celular, que aseguran que la progresión del ciclo tiene lugar correctamente. Cuando se activan los puntos de control, en respuesta a alteraciones que pueden comprometer la fidelidad de la división, se produce la parada de la progresión del ciclo celular durante la fase G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> o durante la mitosis.

### 1.3. CONTROL DE LA APOPTOSIS Y SENESCENCIA CELULAR

La capacidad de división en las células somáticas normales es limitada. Las células, después de un número finito de divisiones, mueren por apoptosis o entran en un estado no proliferativo irreversible conocido como senescencia replicativa (Bree et al., 2002; Donehower, 2002). La “longevidad celular” es un proceso complejo y dinámico que resulta del balance de diferentes estímulos intrínsecos y ambientales, que modulan la respuesta de la célula hacia la supervivencia o hacia la muerte celular (Bree et al., 2002).

#### 1.3.1. Apoptosis

La muerte celular puede producirse a través de dos mecanismos: necrosis y apoptosis. En general, la necrosis es un tipo de muerte celular pasiva que se deriva en respuesta a disfunciones celulares agudas (procesos de toxicidad) que conllevan la liberación al entorno del contenido intracelular y a la activación de una respuesta inflamatoria (Bree

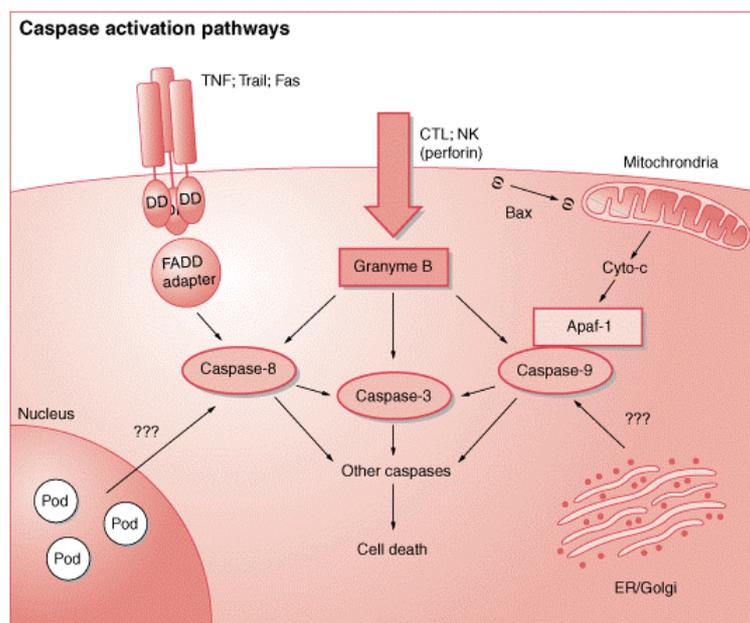
et al., 2002). La apoptosis es un proceso de muerte celular activo y muy regulado que tiene lugar durante el desarrollo, y en diferentes contextos fisiológicos como procesos inmunológicos o en respuesta a lesiones celulares (Bree et al., 2002). Se caracteriza por la formación de cuerpos apoptóticos, posteriormente fagocitados por los macrófagos, que evitan la liberación del contenido celular y la activación de una respuesta inflamatoria (Bree et al., 2002).

La apoptosis es un programa de muerte celular ordenado que se caracteriza morfológicamente por cambios en la membrana plasmática, como la translocación de las fosfatidilserina de la cara interna a la externa, picnosis (condensación de la cromatina), la fragmentación del DNA intranucleosomal, y la formación de cuerpos apoptóticos como resultado de la desintegración celular (Asai et al., 2002; Elliott et al., 1999).

Las caspasas son una familia de proteasas (*cysteine-dependent, aspartate-specific proteases*) que se clasifican en dos categorías: iniciadoras y efectoras. Se han identificado unas 14 caspasas en células de mamíferos. Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos (procaspasas) y se activan mediante una cascada proteolítica que puede ser iniciada por diferentes mecanismos. Las caspasas iniciadoras traducen las diferentes señales de muerte en actividad proteasa y los miembros más representativos son las caspasas-8, -10 y -9. Estas caspasas activan, mediante proteólisis, a las caspasas efectoras como la caspasa-3 que, a su vez, proteolizan diversos sustratos citoplasmáticos y nucleares. La actividad de las caspasas efectoras resulta en la aparición de las características morfológicas típicas de las células apoptóticas como, por ejemplo, la fragmentación del DNA nucleosomal, como resultado de la proteólisis del factor ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*), inhibidor de la endonucleasa CAD (*caspase-activated DNase*) (Boatright, 2003).

La activación de las caspasas puede tener lugar por dos mecanismos principales, conocidos como vías extrínseca e intrínseca (Bree et al., 2002) (Figura I10). La vía extrínseca se activa en respuesta a los receptores de muerte, como el receptor del TNF, Fas o TRAIL cuando son estimulados por sus ligandos. Como consecuencia se produce la trimerización de los receptores, y se activa el reclutamiento de proteínas adaptadoras como FADD (*fas-associated death domain*) y de la caspasa-8. Estas interacciones proteína-proteína, activan a las caspasas -8 y -10 que, a su vez, procesan y activan a las caspasas -3 y -7. La activación de la otra vía, la vía intrínseca, está

mediada por la mitocondria y se activa, principalmente, tras lesionarse el DNA. El cambio de potencial de la membrana mitocondrial o el daño a la mitocondria se asocia con la salida del espacio intermembrana al citosol del citocromo c y de los factores AIF (*apoptosis inducing factor*), Smac/Diablo, Omi/HtrA2, endonucleasa G y caspasa-9 (Chabner and Longo, 2001). El citocromo c, una vez en el citosol, se une a la proteína adaptadora Apaf-1, constituyendo el apoptosoma y activa a la caspasa-9, que a su vez, activa a la caspasa-3 (Bree et al., 2002). Las vías extrínseca e intrínseca pueden estar intercomunicadas a diferentes niveles (Chabner and Longo, 2001). Existe también un tercer mecanismo por el cual puede activarse la apoptosis, mediado por la acción de la granzima B (Bree et al., 2002) (Figura I10).



**Figura I10.** Vías principales de activación de las caspasas en mamíferos. La vía extrínseca (izquierda) se induce a través de la activación de los receptores de muerte, presentes en la superficie de la membrana plasmática celular. La vía intrínseca (derecha) se inicia tras la salida del citocromo c de la mitocondria al citosol. La tercera vía (en medio) se inicia cuando diferentes células introducen en el citosol de las células diana la granzima B. Todas las vías confluyen en la activación de caspasas iniciadoras, que activan a las caspasas efectoras, en una cascada de proteólisis.

### 1.3.2. Senescencia replicativa

Las células somáticas normales son capaces de realizar un número finito de ciclos mitóticos, 50-100 dependiendo del tipo celular, antes de entrar en un proceso irreversible de senescencia celular, anterior a la muerte celular (Bree et al., 2002; Donehower, 2002). Se han propuesto diferentes mecanismos que controlan el “reloj

molecular” de las células somáticas, considerándose el acortamiento telomérico el mecanismo más fuertemente ligado a la senescencia replicativa (Bree et al., 2002; Donehower, 2002). Se ha descrito que el programa de senescencia celular puede activarse también en respuesta a lesiones en el DNA (telomérico o no) provocadas por diferentes agentes, como el estrés oxidativo (Bree et al., 2002; Hosokawa, 2002).

Los telómeros son secuencias hexaméricas muy conservadas que se encuentran repetidas en tándem en los extremos de los cromosomas, alcanzando una longitud que puede superar las 15 Kb (Bree et al., 2002; Donehower, 2002). La secuencia telomérica de los vertebrados está compuesta por repeticiones del hexanucleótido (TTAGGG)<sub>n</sub> (Bree et al., 2002). Los telómeros son necesarios para mantener la integridad de la estructura de los cromosomas, evitando por ejemplo, procesos de degradación o recombinación (Bree et al., 2002). Se ha demostrado que los telómeros se acortan con cada división celular hasta que llegan a una longitud crítica denominada M1 (*Mortality Stage 1*) o senescencia replicativa (Bree et al., 2002). En este momento se activa la quinasa ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) involucrada en el aumento de la estabilidad de p53 (Donehower, 2002). Además de ATM y p53, que actúan como “sensores” de los cromosomas truncados (Donehower, 2002), el programa de senescencia celular está controlado por la activación de los genes supresores de tumores *p21<sup>WAF1</sup>* y *p16* (Alcorta et al., 1996; Beausejour et al., 2003; Bree et al., 2002) y otros genes como *N-Ras* y *Rb* (Chang et al., 1999a). Las células senescentes son células viables y metabólicamente activas, que se mantienen paradas en G<sub>1</sub> y no entran en fase S aunque se estimulen con mitógenos, debido a su incapacidad de sintetizar DNA (Dimri et al., 1995). El estado de senescencia puede mantenerse durante varios años antes de producirse la muerte de las células por necrosis (Bree et al., 2002; Seluanov et al., 2001). Morfológicamente las células senescentes se caracterizan por tener un mayor tamaño y, en ocasiones, micronúcleos, aunque *in vivo* es difícil distinguirlas de las células diferenciadas o de las células quiescentes utilizando criterios exclusivamente morfológicos (Dimri et al., 1995). Las células senescentes, pero no las células diferenciadas ni quiescentes presentan actividad β-galactosidasa lisosomal a pH 6.0 (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000). Por este motivo, la presencia de actividad β-galactosidasa lisosomal a pH 6.0, detectable mediante una tinción histoquímica, se utiliza como biomarcador de senescencia (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000).

El estado de senescencia replicativa puede ser superado por las células cuando se producen mutaciones en alguno de los genes involucrados en su control, como *p53* o *p21<sup>WAF1</sup>*, favoreciendo que éstas continúen dividiéndose (Bree et al., 2002; Donehower, 2002). Los telómeros continúan acortándose tras cada división hasta que alcanzan una segunda longitud crítica conocida como M2 (*Mortality Stage 2*) o *crisis* (Bree et al., 2002; Donehower, 2002; MacKenzie et al., 2000). Por lo tanto, el estado de *crisis* celular supone una segunda barrera a la pérdida de control de la proliferación celular después de pérdida de función de alguno de los genes que controlan el programa de senescencia celular (Wei and Sedivy, 1999). Las células en *crisis*, igual que las células senescentes, presentan actividad  $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0 (Wei and Sedivy, 1999). La principal diferencia entre senescencia y *crisis* reside en la capacidad de las células en *crisis* de sintetizar DNA (Wei and Sedivy, 1999). La *crisis* representa un estado de no proliferación debido al equilibrio entre división y muerte celular (MacKenzie et al., 2000). Recientemente se ha descrito que la muerte de las células en *crisis* tiene lugar por un proceso conocido como catástrofe mitótica (Shay and Wright, 2004), explicado detalladamente en esta memoria en siguientes apartados. Se caracteriza por la presencia de células poliploides y con aberraciones cromosómicas, posiblemente, consecuencia de la síntesis continuada de DNA y la presencia de telómeros extremadamente cortos que comprometen la integridad cromosómica (MacKenzie et al., 2000; Wei and Sedivy, 1999).

### **1.3.3. Aspectos comunes entre apoptosis y senescencia replicativa: papel del gen supresor de tumores *p53***

Se han descrito una serie de genes que juegan un papel importante tanto en los procesos de apoptosis como de senescencia celular. El ejemplo más representativo es el gen supresor de tumores *p53*, que está implicado en la inducción de ciertos tipos de apoptosis, especialmente la mediada por lesiones en el DNA y en procesos de senescencia celular (Alcorta et al., 1996; Beausejour et al., 2003; Bree et al., 2002; Donehower, 2002).

Las proteínas DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*), formada por la unidad quinasa catalítica y el heterodímero Ku70 y 80 kDa, ATM y chk2 también están involucradas en la detección de lesiones en el DNA (Donehower, 2002). Las proteínas ATM y chk2 fosforilan el extremo amino-terminal de *p53*, evitando su unión a la

proteína mdm2 y su degradación dependiente de ubiquitina (Donehower, 2002). Dado que los niveles de p53 nucleares aumentan en presencia de DNA dañado debido a la estabilización de la proteína y al aumento de su vida media, p53 se considera el “guardián del genoma” (Bree et al., 2002; Donehower, 2002). Una vez activada, la proteína forma homodímeros u homotetrámeros a través de su extremo carboxi-terminal y funciona como factor de transcripción. La proteína p53 reconoce secuencias específicas presentes en los promotores de diversos genes (Figura I11) y modula la transcripción génica positiva o negativamente (Donehower, 2002; el-Deiry et al., 1992). El dominio amino-terminal está involucrado en la activación transcripcional de diversos genes implicados en la senescencia celular, como *p21<sup>WAF1</sup>* y *14-3-3 $\sigma$*  (Chan et al., 1999), o la inducción de la apoptosis, como *bax* (Castedo et al., 2004b), entre otras funciones. Además, p53 puede actuar como represor transcripcional de otros genes, como *mdr-1* y *mrp-1*, asociados a la resistencia múltiple a antitumorales (Bein et al., 2004; Muredda et al., 2003).

La proteína p53 activada sufre diversas modificaciones post-traduccionales, como fosforilaciones y acetilaciones en determinados residuos, que determinan que las células respondan frente al DNA lesionado induciendo la senescencia replicativa o la apoptosis (Chaturvedi et al., 2004). Parece que las diferentes modificaciones post-traduccionales determinan, al menos en parte, las dianas celulares de p53 (Figura I11) (Bree et al., 2002), aunque aún no se ha establecido claramente qué vía o vías son responsables de la decisión final que lleva a la senescencia o la apoptosis (Soussi and Beroud, 2001).

#### • Control de la vía intrínseca de la apoptosis: papel de p53 y de la familia de Bcl-2

La proteína p53 activada en respuesta genotóxicos puede inducir la vía intrínseca de la apoptosis, modulando la transcripción de los genes de la familia proteica Bcl-2, como *bax* (Castedo et al., 2004b). La familia proteica Bcl-2 incluye proteínas que pueden favorecer la supervivencia celular, como Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 y Bcl-W, o inducir la muerte por apoptosis, como Bax, Bak, Bcl-X<sub>S</sub> o Bok. La respuesta final de la célula depende del balance entre factores pro y antiapoptóticos, que varía en función a diferentes estímulos (Burlacu, 2003).

| Site Ranking <sup>1</sup> | Consensus <sup>2</sup> : | RRRCWGYYY (R=A/G, Y=C/T, W=A/T)  |
|---------------------------|--------------------------|--|
| 6                         | SCS high affinity site:  | 5'-GGC <b>ATG</b> TCCGGGC <b>ATG</b> TCC-3'<br>3'-CCC <b>GTAC</b> AGGCCCC <b>GTAC</b> AGG-5'   |
| 6                         | p21 promoter (H):        | 5'-GA <b>ACATG</b> TCCCA <b>ACATG</b> TTG-3'<br>3'-CTT <b>GTAC</b> AGGGTT <b>GTACA</b> AAC-5'  |
| 4                         | GADD45 intron (H):       | 5'-GA <b>ACATG</b> TCTAAG <b>CATG</b> CTG-3'<br>3'-CTT <b>GTAC</b> AGATTC <b>GTAC</b> GAC-5'   |
| 4                         | Cyclin G promoter (M):   | 5'-AG <b>ACCT</b> CCCCGGC <b>AA</b> GCCT-3'<br>3'-TCT <b>GGAC</b> GGGCC <b>TT</b> CGGA-5'  |
| 4                         | IGF-BP3(A) intron (H):   | 5'-AA <b>CAAG</b> CCAC <b>CA</b> CTGCTT-3'<br>3'-TT <b>GTTC</b> GGTGGTT <b>GTAC</b> GAA-5'   |
| 3                         | mdm2 intron (M):         | 5'-GGT <b>CAAG</b> TTGG <b>AC</b> CGTCC-3'<br>3'-CC <b>AGTT</b> CAAC <b>CTG</b> T <b>CA</b> GG-5'  |
| 3                         | Bax promoter (H):        | 5'-TC <b>ACAA</b> GTTAG <b>ACA</b> CCCTGG <b>CGTGG</b> CTATATT-3'<br>3'-AGT <b>TTCA</b> ATCTCT <b>GTTC</b> GGACCC <b>GCAC</b> CCGATATAA-5' |
| 3                         | RGC promoter (H):        | 5'-xx <b>CCTT</b> GCCTGG <b>ACTT</b> GCCTGG <b>CTT</b> GCCTTTT-3'<br>3'-xx <b>GGAA</b> CGGACCT <b>GAAC</b> GGACCG <b>GAAC</b> GGAAAA-5'    |
| 2                         | IGF-BP3(B) intron (H):   | 5'-GG <b>CAAG</b> ACCTGCC <b>AA</b> GCCT-3'<br>3'-CCC <b>TTCT</b> GGAC <b>GTTC</b> CGGA-5'   |

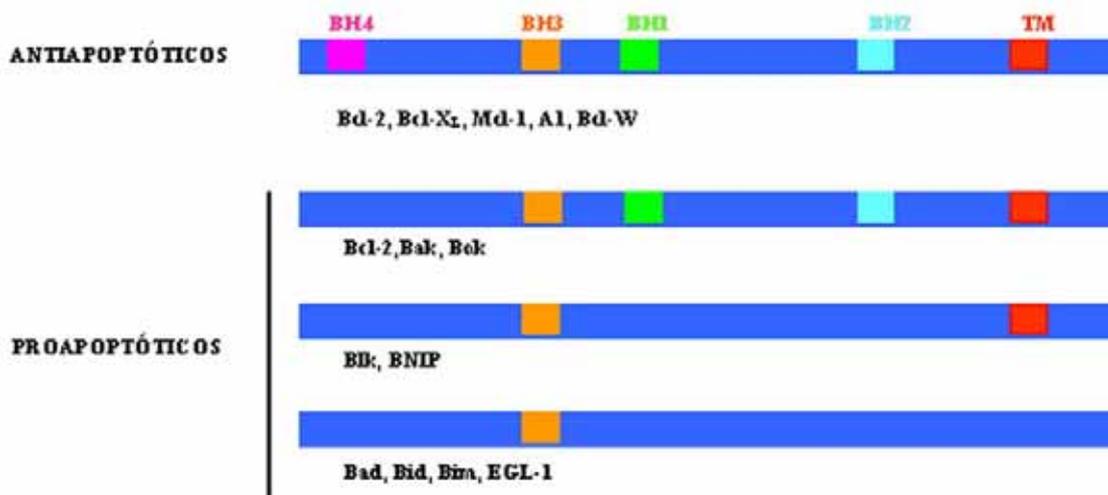
■ -CxxG    ■ -AT/TA core    ■ -AA/TT core    ■ -TT/AA core    ■ -AA, GA, or GG for RR

<sup>1</sup>: Give 1 point each **CATG** and 1 point each RR that is **AA, GA, or GG**.  
<sup>2</sup>: El-Deiry et al., 1992

**Figura I11.** Lugares de unión del factor de transcripción p53 en los promotores de diferentes genes implicados en el control del ciclo celular (el-Deiry et al., 1992).

Los miembros de la familia de Bcl-2 se caracterizan por la presencia de, al menos, uno de los cuatro dominios presentes en la proteína Bcl-2, conocidos como BH1-4 (*Bcl-2 homology 1-4*) (Burlacu, 2003) (Figura I12). En general, las proteínas antiapoptóticas tienen los cuatro dominios muy conservados, mientras que los factores proapoptóticos han perdido la conservación en la secuencia correspondiente al dominio BH4 (Bree et al., 2002; Burlacu, 2003). El dominio BH3, conocido como *kill domain*, se encuentra presente y de manera muy conservada en todos los miembros proapoptóticos de la familia y parece tener una implicación directa en la inducción de la apoptosis (Bree et al., 2002; Burlacu, 2003). Las proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 se localizan en las membranas de diferentes compartimentos intracelulares, como la mitocondria, el retículo endoplasmático y el núcleo (Burlacu, 2003). Los factores con funciones proapoptóticas se localizan en el citosol de las células viables pero se translocan a la membrana externa mitocondrial tras sufrir un cambio

conformacional, cuando las células activan el programa de la apoptosis (Burlacu, 2003; Donehower, 2002). Las proteínas de la familia de Bcl-2 forman homodímeros y heterodímeros en la membrana mitocondrial, y controlan la apoptosis regulando la salida del citocromo c de la mitocondria al citosol (Burlacu, 2003) (Figura I13). Por ejemplo, los homodímeros Bax/Bax estimulan la liberación del citocromo c y la apoptosis, mientras que el heterodímero Bcl-2/Bax neutraliza la función proapoptótica de Bax (Burlacu, 2003). La formación de los heterodímeros Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> impide que Bcl-2 neutralice a Bax y, por lo tanto, juegan un papel proapoptótico (Burlacu, 2003). La regulación de la abundancia relativa y actividad de los diferentes miembros de la familia determinará la respuesta final de la célula (Bree et al., 2002; Burlacu, 2003).

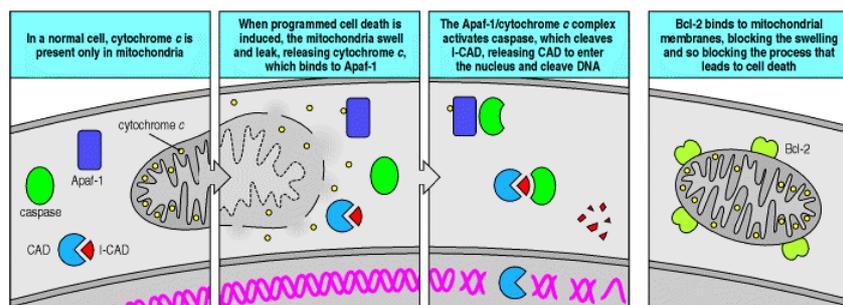


**Figura I12.** Estructura primaria de los miembros de la familia de Bcl-2, que incluye factores anti y proapoptóticos. Todos ellos contienen, al menos, uno de los cuatro dominios conservados BH, que regulan la interacción entre los miembros de la familia. Los miembros antiapoptóticos contienen como mínimo dos de estos dominios, incluyendo BH4. Todos los miembros proapoptóticos tienen, como mínimo, el dominio BH3 o *kill domain*. Los miembros antiapoptóticos y algunos miembros proapoptóticos contienen un dominio transmembrana hidrofóbico (TM) en el extremo C-terminal.

• **Control de la vía de la senescencia replicativa: papel de p53 y de los genes supresores de tumores  $p21^{WAF1}$  y  $p16$**

Se ha demostrado que en células senescentes la actividad de p53 es elevada aunque los niveles de proteína generalmente no aumentan (Chen et al., 2000). La principal diana transcripcional de p53 durante la senescencia, pero no durante la apoptosis, es el gen  $p21^{WAF1}$  (Chan et al., 1999). Como consecuencia de la activación de la proteína

$p21^{WAF1}$ , las células no pueden hiperfosforilar la proteína Rb (Chen et al., 2000) y se detiene la progresión de las células en la fase  $G_1$  (Bunz et al., 1998; Chen et al., 2000) de manera reversible (Alcorta et al., 1996; Beausejour et al., 2003). Aunque parece que la integridad de la vía de p53,  $p21^{WAF1}$  y Rb es necesaria para el establecimiento de la senescencia replicativa en células humanas, la activación de la proteína p16 determina que la senescencia sea irreversible (Alcorta et al., 1996; Beausejour et al., 2003). La activación de la senescencia celular ocurre, al menos en las células humanas, en dos fases secuenciales: en la fase de establecimiento la proteína p53 se activa e induce la expresión de transitoria de  $p21^{WAF1}$ , mientras que la fase de mantenimiento está mediada por la activación estable de p16, la cual detiene la progresión del ciclo celular en la fase  $G_1$  (Alcorta et al., 1996; Beausejour et al., 2003; Roninson et al., 2001). Se ha descrito que una vez se ha iniciado el programa de senescencia celular, las células son refractarias a la apoptosis dependiente de p53 (Bree et al., 2002; Donehower, 2002). Por este motivo, después de un tiempo variable detenidas en  $G_1$ , las células senescentes mueren por necrosis (Donehower, 2002; Seluanov et al., 2001). Posiblemente se debe a que la principal diana transcripcional de p53 durante la senescencia, el gen  $p21^{WAF1}$ , es un antagonista de la apoptosis (Chen et al., 2000), así como al aumento de la proteína antiapoptótica bcl-2 durante los procesos de senescencia celular (Bree et al., 2002).

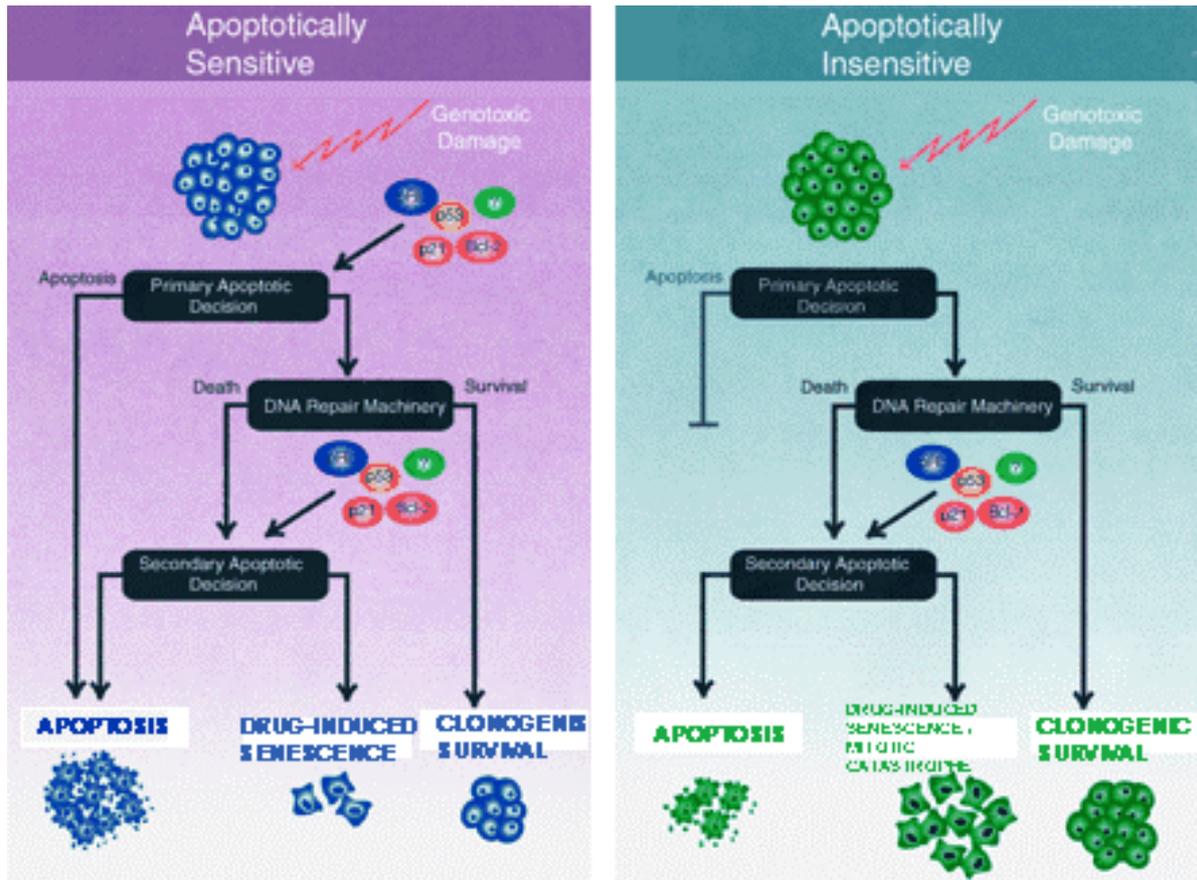


**Figura I13.** Regulación de la vía intrínseca de la apoptosis por los miembros de la familia de Bcl-2. El citocromo c se encuentra localizado en el espacio intermembrana de la mitocondria de las células normales (primer panel). Durante el proceso de apoptosis el citocromo c se libera de la mitocondria al citosol y se une al factor Apaf-1, formando el apoptosoma (segundo panel). El complejo apoptosoma activa la cascada de caspasas, que proteolizan el factor ICAD y permiten la entrada de la endonucleasa CAD en el núcleo (tercer panel). La salida del citocromo c de la mitocondria está modulada por la proporción entre miembros pro y antiapoptóticos de familia de Bcl-2, regulada por acción de la proteína p53 (último panel).

#### **1.4. EL GEN *p53* Y SUSCEPTIBILIDAD A LA TERAPIA ANTITUMORAL: MODELOS DE MUERTE CELULAR COMO ALTERNATIVA A LA APOPTOSIS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

Aún hoy en día se considera que la mayoría de las terapias que se utilizan en el tratamiento del cáncer, incluyendo radioterapia, fármacos citotóxicos, terapia génica o inmunoterapia, funcionan exclusivamente induciendo la apoptosis (Brown and Wouters, 1999; Gewirtz, 1999). Se ha aceptado que los tumores con formas mutadas de genes que regulan positiva o negativamente la apoptosis, como *p53*, son resistentes a los agentes antitumorales que lesionan el DNA y están asociados a una mala prognosis (Brown and Wouters, 1999). Por este motivo se ha relacionado la capacidad de las células tumorales de activar el programa de apoptosis con su susceptibilidad a los diferentes agentes antitumorales (Brown and Wouters, 1999). Sin embargo, diferentes experimentos basados en el ensayo clonogénico durante los últimos años han revelado que el estado funcional del gen *p53*, así como de otros genes involucrados en el control de la apoptosis, no afecta la susceptibilidad de los tumores a los tratamientos (Brown JM, 2005; Brown and Wouters, 1999). Se ha demostrado la existencia de formas de muerte alternativas a la apoptosis dependientes e independientes de la funcionalidad del gen *p53*, como la senescencia celular acelerada y la muerte posterior de las células, y la catástrofe mitótica (Figura I14) (Roninson, 2002; Roninson et al., 2001). Tanto la senescencia celular acelerada como la catástrofe mitótica se ponen de manifiesto cuando se inhibe o se reduce la apoptosis (Roninson et al., 2001).

Los resultados experimentales que se presentan en esta memoria están enmarcados en el análisis de mecanismos de muerte celular, distintos a la apoptosis, que un grupo de antitumorales, las Antraciclinas, puede inducir en diferentes líneas tumorales humanas, y cómo esto puede afectar a su potencia citotóxica. Como se describe en el apartado de Resultados, se han analizado los procesos de senescencia celular acelerada, tanto dependiente como independiente de *p53* y la muerte independiente de *p53* por catástrofe mitótica. La comprensión en mayor detalle de estos modos de muerte de las células tumorales supone una herramienta prometedora a la hora de plantear nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer, especialmente en el tratamiento de tumores refractarios a la apoptosis.



**Figura I14.** Dos modelos esquemáticos que ilustran los mecanismos de muerte de las células sensibles o resistentes a la apoptosis, en respuesta a agentes antitumorales que lesionan el DNA. Las células sensibles a la apoptosis (panel izquierdo) pueden responder al daño genotóxico activando inmediatamente la vía de la apoptosis, o bien, activando la reparación de errores del DNA. Ambas respuestas (apoptosis y reparación) están controladas por numerosos genes, incluyendo *p53*. Cuando se activan los genes involucrados en la reparación de las lesiones del DNA, las células pueden morir por apoptosis, activar la senescencia celular (mediada por la activación de  $p21^{WAF1}$ ), o continuar proliferando. En las células resistentes a la apoptosis (panel derecho) la función del gen *p53* está comprometida. En este caso, cuando las células no pueden reparar los errores del DNA, la mayoría de las células muere a través de mecanismos diferentes a la apoptosis, como la catástrofe mitótica. Adaptado de (Brown and Wouters, 1999).

#### 1.4.1. Terapia antitumoral dependiente de la funcionalidad del gen supresor de tumores *p53*

Las células normales pueden responder a lesiones en el DNA provocadas por diferentes agentes, como la radiación  $\gamma$ , fármacos antitumorales, o el estrés oxidativo derivado del tratamiento con  $H_2O_2$ , induciendo *p53*. La inducción de *p53* contribuye al mantenimiento de la integridad del genoma de las células normales, activando la apoptosis o la senescencia celular acelerada o inducida (Robles and Adami, 1998;

Wang et al., 2003). A diferencia de la senescencia replicativa, asociada al envejecimiento, la senescencia celular inducida por antitumorales parece ser independiente de la longitud de los telómeros y puede tener lugar tanto en G<sub>1</sub> como en G<sub>2</sub> (Roninson et al., 2001). Las células que sufren senescencia inducida son morfológicamente parecidas a las células que senescen por envejecimiento celular, presentando actividad β-galactosidasa lisosomal a pH 6.0 (Wang et al., 2003). La senescencia inducida en células y tejidos normales también está mediada por la activación transitoria de p21<sup>WAF1</sup>, por acción de p53, y la inducción estable de p16 (Beausejour et al., 2003; Robles and Adami, 1998; Wang et al., 2003). Se ha demostrado que los fibroblastos en cultivo activan distintas respuestas celulares tras tratamientos con diferentes dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: inducción de apoptosis a dosis altas, activación de la senescencia inducida a dosis bajas, y apoptosis junto con senescencia a dosis moderadas (Bladier et al., 1997; Chen et al., 2000).

Las células tumorales, aunque han escapado a los mecanismos de control celular, parecen retener la capacidad de las células normales de responder a agentes antitumorales que interaccionan con el DNA, radiación u otros estímulos, activando la apoptosis o la senescencia celular acelerada cuando el gen *p53* y sus genes diana son funcionales (Roninson et al., 2001). En los últimos años se ha demostrado que se puede inducir la muerte por apoptosis o la senescencia celular acelerada en células tumorales, mediante la expresión ectópica de genes como *p53*, *p21<sup>WAF1</sup>*, *p16* o *Rb* (Roninson et al., 2001). Se ha demostrado que la senescencia celular inducida se manifiesta en células en cultivo cuando se inhibe la vía de la apoptosis (Roninson et al., 2001) o cuando se tratan las células con dosis moderadas de antitumorales (Chang et al., 1999b; Roninson et al., 2001). Este tipo de senescencia no se limita a las células tumorales en cultivo, sino que también se ha detectado en biopsias humanas tras el tratamiento con Doxorubicina (Roninson et al., 2001; te Poele et al., 2002). Tanto en líneas tumorales inmortalizadas como en cultivo, las células senescentes expresan el marcador SA-β-gal a pH 6.0 (Roninson et al., 2001). Estos descubrimientos han hecho aumentar el interés por desvelar en profundidad los mecanismos que controlan la senescencia celular inducida como una terapia potencial contra el cáncer (Roninson et al., 2001). Aunque la inducción de la senescencia acelerada como terapia antitumoral implica la pérdida de la proliferación celular, las células senescentes continúan siendo metabólicamente activas y pueden secretar proteínas que promueven la proliferación de las células vecinas,

induciendo nuevos procesos de carcinogénesis (Roninson et al., 2001). Este efecto no deseado parece estar mediado, al menos en parte, por la activación de  $p21^{WAF1}$  en las células senescentes, que activa numerosos genes que codifican proteínas transmembrana, componentes de la matriz extracelular y otras proteínas de secreción (Roninson et al., 2001).

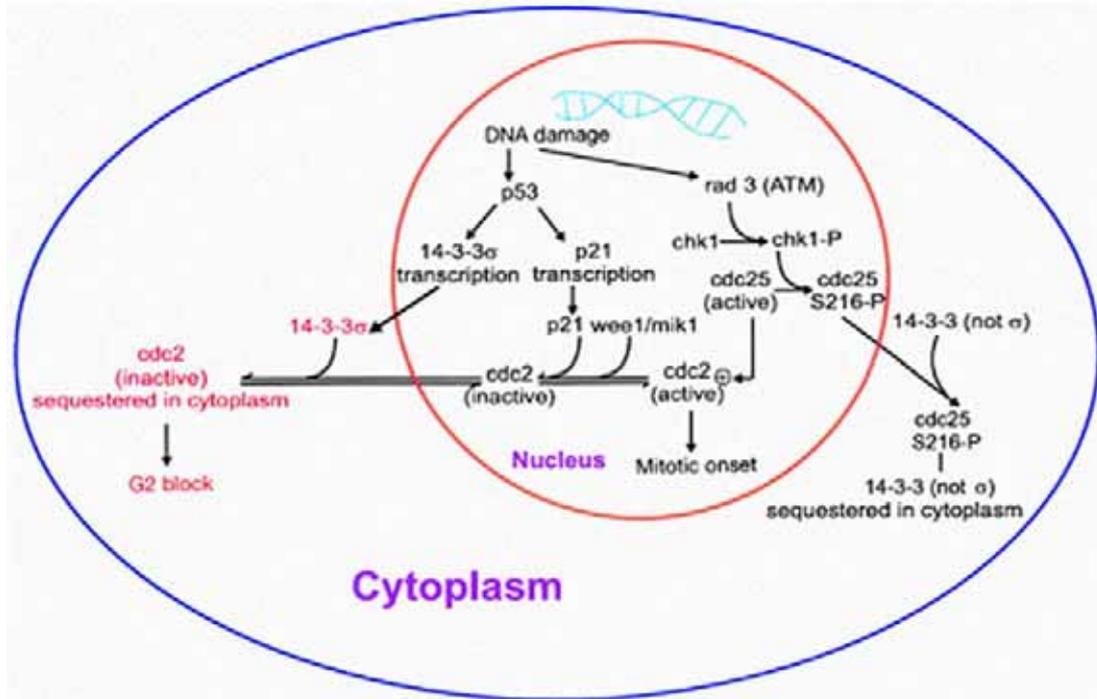
#### **1.4.2. Terapia antitumoral independiente de la funcionalidad del gen supresor de tumores p53**

Los genes  $p53$  y  $p16$  (pero no  $p21^{WAF1}$ ), implicados en la senescencia inducida en células normales, están mutados en la mayoría de los cánceres humanos (Roninson et al., 2001). Sin embargo, experimentos realizados con las líneas HT1080 y HCT116 de fibrosarcoma, deficientes para el gen  $p16$ , demuestran que el tratamiento con diferentes fármacos antitumorales puede inducir la senescencia acelerada en estas células (Chang et al., 1999b; Roninson et al., 2001). Por otro lado, también es posible inducir la senescencia celular en las mismas líneas tumorales cuando los genes  $p53$  y  $p21^{WAF1}$  se han inactivado o suprimido (Chang et al., 1999b). En estos casos, aunque la inactivación de  $p53$  y  $p21^{WAF1}$  disminuye el porcentaje de células senescentes, el proceso no se suprime completamente, indicando que los genes  $p53$  y  $p21^{WAF1}$  controlan positivamente el programa de senescencia celular inducida, pero no son totalmente necesarios para que este se active (Chang et al., 1999b). Esta observación sugiere que es posible inducir la senescencia acelerada en células tumorales sin el requerimiento de  $p21^{WAF1}$ , haciendo posible la separación entre la parada irreversible del ciclo celular y los efectos paracrinos ejercidos por  $p21^{WAF1}$ , no deseables en una potencial terapia tumoral. Se han identificado diferentes genes que están implicados en la senescencia celular inducida independiente de  $p53$  y  $p21^{WAF1}$ , como  $N-Ras$  (Chang et al., 1999a),  $p57$  (Tsugu et al., 2000),  $p27$  (Collado et al., 2000), o  $p130$  (Baus et al., 2003; Collado et al., 2000).

A parte de la senescencia, las células tumorales con mutaciones en el gen  $p53$  pueden responder al tratamiento con agentes antineoplásicos activando la catástrofe mitótica. Se trata de un tipo de muerte celular que resulta, al menos, de una mitosis aberrante (Bunz et al., 1998; Roninson et al., 2001). Las células que sufren catástrofe mitótica tienen un mayor tamaño que las células normales, pueden ser binucleadas o multinucleadas y contienen micronúcleos, ya que estas células inviables forman

múltiples cubiertas nucleares que contienen cromosomas disgregados (Roninson, 2002). La principal diferencia entre apoptosis y catástrofe mitótica es que la última no depende de la funcionalidad del gen *p53* (Castedo et al., 2004a; Roninson, 2002; Roninson et al., 2001). Aunque apoptosis y catástrofe mitótica comparten algunas características morfológicas (Chan et al., 1999; Roninson, 2002; Roninson et al., 2001; Villamarín et al., 2003), la muerte por catástrofe mitótica normalmente no comporta la formación de la escalera de DNA intranucleosomal, típica de la apoptosis (Roninson, 2002) y la condensación de la cromatina durante este evento es parcial y heterogénea (Chan et al., 1999; Roninson, 2002; Roninson et al., 2001).

Cuando se lesiona el DNA, las células tumorales detienen la progresión del ciclo celular en  $G_1$  o en  $G_2$ , impidiendo la replicación del DNA o la entrada en mitosis en presencia de alteraciones genéticas (Bunz et al., 1998). La proporción de células que se detienen en  $G_1$  y en  $G_2$  depende del tipo celular, de las condiciones del cultivo y de los puntos de control operativos en la célula (Bunz et al., 1998). La parada en  $G_1$  se inicia con la activación de ATM, *p53* y de su diana,  $p21^{WAF1}$ , proteína que inhibe los complejos ciclina-cdk necesarios para la transición de  $G_1$  a S (Bunz et al., 1998). Cuando las células tumorales con *p53* mutada se tratan con diferentes agentes que lesionan el DNA, éstas no pueden detener la progresión del ciclo celular en  $G_1$ , pasan la fase S y se detienen en  $G_2$  de manera transitoria, antes de iniciar la muerte celular por catástrofe mitótica (Bunz et al., 1998). Esto sugiere, que a diferencia del punto de control de  $G_1$ , los genes *p53* y  $p21^{WAF1}$  no son responsables de iniciar la parada en  $G_2$  pero sí de mantenerla en el tiempo (Bunz et al., 1998). El punto de control de  $G_2$  se encarga, principalmente, de impedir la entrada de la célula en mitosis cuando el DNA se encuentra dañado (Bunz et al., 1998). Este punto de control está regulado por las vías de *p53* y ATM, que confluyen en la inactivación del complejo cdc2-ciclina B cuando el DNA está dañado, parando el ciclo celular e impidiendo la entrada en mitosis (Bunz et al., 1998; Chan et al., 1999) (Figura I15). De la misma manera, la inactivación de otros genes implicados en los puntos de control de  $G_1$  y  $G_2$ , como ATM, o  $p21^{WAF1}$ , *chk1* o  $14-3-3\sigma$  (Figura I15) induce la parada transitoria en  $G_2$  y la muerte por catástrofe mitótica en células tumorales, tratadas con diferentes agentes (Andreassen et al., 2001; Bunz et al., 1998; Chan et al., 1999).



**Figura I15.** Esquema de la regulación del punto de control de G<sub>2</sub>, que controla la entrada de las células en la mitosis. La activación del punto de control de G<sub>2</sub> se inicia con la activación de las proteínas ATM y p53. ATM fosforila y activa a la quinasa chk1, que a su vez fosforila a la fosfatasa cdc25C en el residuo serina 216. La proteína 14-3-3-3 sequestra en el citoplasma a la proteína cdc25C fosforilada, de manera que no puede activarse el complejo cdc2-ciclina B (MPF). La proteína p53 activa la transcripción de los genes *p21<sup>WAF1</sup>* y *14-3-3σ*. La proteína *p21<sup>WAF1</sup>* inactiva el complejo MPF, mientras que *14-3-3σ* lo sequestra en el citoplasma. La inactivación del factor MPF detiene la progresión del ciclo en la fase G<sub>2</sub>. Mutaciones en los diferentes genes involucrados en el punto de control de G<sub>2</sub> impiden el bloqueo sostenido en G<sub>2</sub> cuando se daña el DNA, favoreciendo la catástrofe mitótica.

La imposibilidad de mantener una parada en G<sub>2</sub> sostenida en el tiempo, cuando las células tumorales han perdido la integridad de las vías de p53 o ATM, fuerza a las células a entrar prematuramente en la mitosis con la cromatina parcialmente condensada, con errores en su material genético y, en ocasiones, con DNA endoreduplicado (Bunz et al., 1998; Chan et al., 1999; Roninson et al., 2001).

Existe controversia en cuanto a la actividad de las caspasas durante la muerte por catástrofe mitótica: mientras hay laboratorios que han observado procesos de catástrofe mitótica independientes de la activación de caspasas (Shankar et al., 2001), otros grupos han descrito la activación inicial de la caspasa-2 durante la metafase, que lleva a la permeabilización de la membrana mitocondrial y a la activación de la caspasa-3, considerando la catástrofe mitótica un caso de “apoptosis independiente de *p53*” (Castedo et al., 2004a; Castedo et al., 2004b). Según esto, la catástrofe mitótica es un

evento que tiene lugar durante la metafase, con dependencia de la caspasa-2. La inhibición de las caspasas induciría la progresión de las células a través de la mitosis, generándose células multinucleadas con potencial oncogénico, después de haber escapado de la muerte por catástrofe mitótica (Castedo et al., 2004a; Castedo et al., 2004b). También se ha definido la catástrofe mitótica como un proceso de muerte postmitótico (Barbisan et al., 1999; Lock and Stribinskiene, 1996; Roninson, 2002; Roninson et al., 2001). Estas células no serían capaces de segregar correctamente sus cromosomas, completando la cariocinesis pero no la citocinesis, (Bunz et al., 1998; Castedo et al., 2004a, Huang et al., 2005; Chan et al., 1999; Roninson et al., 2001). Este proceso puede tener lugar después de una mitosis aberrante, conduciendo a la generación de células binucleadas que mueren desde la fase G<sub>1</sub>, o después de varias divisiones anormales, que conducen a la generación de poliploidías y a la fragmentación de los cromosomas (micronucleación) (Shay and Roninson, 2004; Shay and Wright, 2004). En cualquiera de los casos, el destino final de estas células sería la formación de micronúcleos y su muerte (Roninson et al., 2001). Con tal de facilitar la comprensión de los resultados que se presentarán en esta memoria, en la Figura I16 se muestra, de manera esquemática, las diferentes rutas de catástrofe mitótica inducidas por agentes antitumorales propuestas por diferentes grupos.

A pesar de que la entrada en mitosis prematura parece ser el principal mecanismo de inducción de catástrofe mitótica, no es el único que se ha descrito. Experimentos basados en la expresión inducida de  $p21^{WAF1}$  en células en cultivo, demuestran que la catástrofe mitótica también puede iniciarse después de una parada del ciclo celular prolongada de tipo senescente (Chang et al., 1999b; Roninson et al., 2001). La sobreexpresión de  $p21^{WAF1}$  está asociada a la parada del ciclo celular en las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> pero, cuando se reprime el sistema, las células reentran en el ciclo y muchas de ellas mueren por catástrofe mitótica (Chang et al., 1999b; Roninson et al., 2001). El porcentaje de células que mueren por catástrofe mitótica está directamente relacionado con la duración de la parada del ciclo inducida por la sobreexpresión de  $p21^{WAF1}$ , que inhibe la transcripción de diferentes genes que controlan la mitosis (Chang et al., 1999b; Roninson et al., 2001). A mayor duración de la inducción de  $p21^{WAF1}$ , mayor represión de la síntesis de estos factores y, cuando se suprime la inducción, las células entran en mitosis tan pronto como se sintetizan los factores necesarios para el proceso, pero sin haber dado tiempo a la célula a reorganizar el punto de control mitótico (Chang et al.,

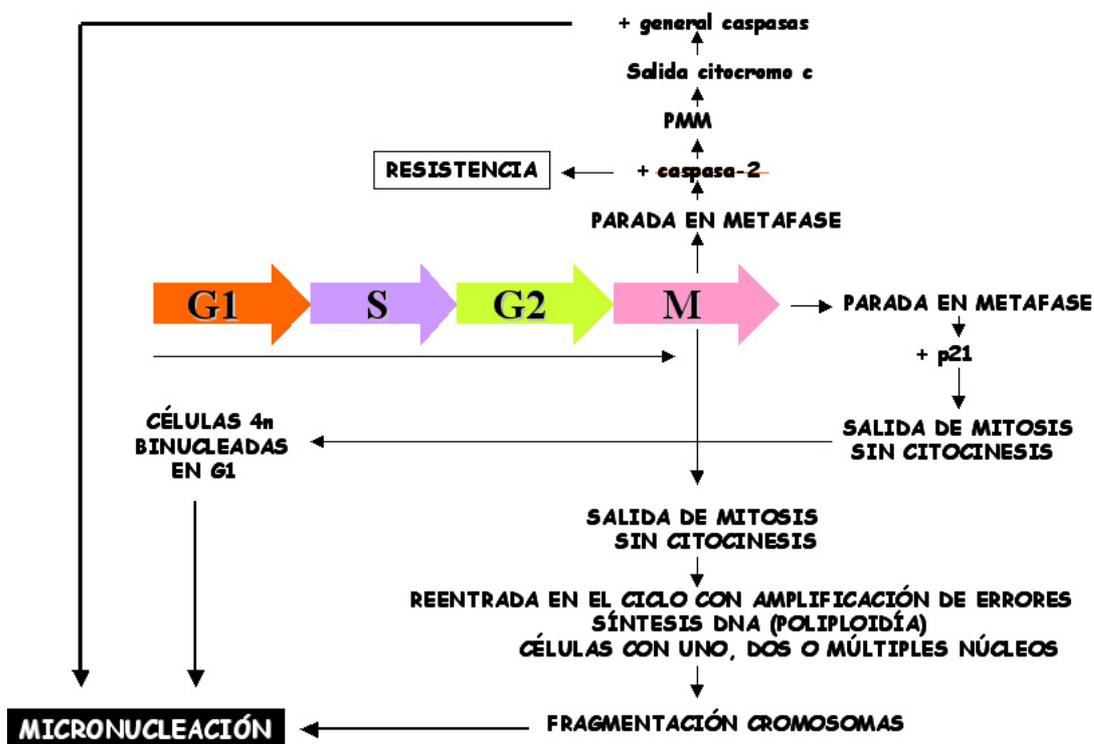
1999b; Roninson et al., 2001). Como consecuencia, las células que entran en mitosis tienen defectos en la regulación de la segregación de cromosomas o duplicaciones centrosómicas aberrantes, que llevan a la formación de figuras mitóticas anormales, típicas de la catástrofe mitótica (Chang et al., 1999b; Roninson et al., 2001).

La catástrofe mitótica también puede ser resultado de defectos en el punto de control mitótico, que asegura que la segregación de los cromosomas durante la mitosis es correcta (Baek et al., 2003). Diferentes observaciones indican que posiblemente los genes *p53* y *p21<sup>WAF1</sup>* no están involucrados en este punto de control (Bunz et al., 1998; Castedo et al., 2004a), sino que está regulado por múltiples factores, como Msp1, Mad1-3, Bub-1, Bub-3, BubR1, CENP-E, survivina, aurora kinasa, o polo-kinasa (Baek et al., 2003; Castedo et al., 2004a; Shankar et al., 2001). Estos factores se localizan principalmente en los cinetocoros cuando los cromosomas no están alineados correctamente, y provocan la parada transitoria de la mitosis durante la transición metafase-anafase (Baek et al., 2003; Castedo et al., 2004a; Huang et al., 2005). Cuando hay defectos en el punto de control mitótico, las cromátidas hermanas se separan prematuramente y las células hijas completan la mitosis con alta inestabilidad cromosómica y polipliodías, y sin que haya citocinesis. Esto se debe a procesos de endoreduplicación del DNA, que tiene lugar durante la anafase (Baek et al., 2003).

### **1.5. LAS ANTRACICLINAS COMO AGENTES ANTITUMORALES**

Las Antraciclina constituyen uno de los grupos de antitumorales con mayor espectro de actividad en cánceres humanos (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). Ensayos clínicos realizados durante los años 60 demostraron la actividad antineoplásica de las Antraciclina Daunorubicina y Doxorubicina (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004; Weiss, 1992). A partir de entonces se inició la búsqueda de derivados menos tóxicos y más eficaces, ampliándose el repertorio de fármacos antitumorales disponibles en la oncología moderna. La mayoría de las Antraciclina son antibióticos naturales, producto de la fermentación de la bacteria *Streptomyces peucetius*, o son productos semisintéticos que se obtienen modificando partes de la molécula después de la síntesis microbiana (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). En los últimos años se ha recurrido a la síntesis química para poder obtener nuevos análogos como, por ejemplo, la Idarubicina (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004; Priebe, 1995). La identificación y clonación de los genes

involucrados en la biosíntesis y en el metabolismo secundario de las Antraciclinas ha permitido optimizar la producción de Antraciclinas mediante ingeniería genética (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). Aunque se han obtenido muchas Antraciclinas, en la quimioterapia actual del cáncer sólo se utilizan la Daunorubicina, la Doxorubicina, la Epirubicina y la Idarubicina (Figura I17) (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004)



**Figura I16.** Representación esquemática de las diferentes vías que llevan a la catástrofe mitótica. Cuando *p53* está mutado y se tratan las células con antitumorales, éstas no pueden activar la apoptosis ni mantener la parada en la fase  $G_2$ . Las células entran en mitosis con errores en el DNA, activándose el punto de control de salida de la mitosis, que detiene la división en la metafase. La catástrofe mitótica puede constituir un caso especial de apoptosis, mediado por la activación durante la metafase de la caspasa-2. Alternativamente, la catástrofe mitótica puede tener lugar sin activación de las caspasas, forzando a las células a salir de la mitosis y detenerse en  $G_1$  con un contenido en DNA de  $4n$ , o a realizar varios ciclos de divisiones aberrantes que culminan en la muerte de las células por catástrofe mitótica. En todos los casos, la muerte por catástrofe mitótica en células con *p53* no funcional culmina en la formación de micronúcleos.

### 1.5.1. Estructura de las Antraciclinas

Las Antraciclinas están constituidas por un cromóforo tetracíclico plano e hidrofóbico (quinona o aglicona) unido mediante un enlace glicosídico a un aminoazúcar (daunosamina), o más. La Daunorubicina y la Doxorubicina (Figura I17) difieren únicamente en un grupo hidroxilo presente en el C14, que les confiere un espectro diferente en su actividad antitumoral (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). Además de estas dos moléculas, actualmente se utilizan en clínica otros dos derivados antraciclínicos (Figura I17). La Idarubicina es un derivado semisintético de la Daunorubicina al que se le ha eliminado el grupo 4-metoxi presente en el compuesto parental (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). La Epirubicina es un epímero de la Doxorubicina que contiene un grupo hidroxilo en la posición C4' de la daunosamina, lo que le confiere una mayor lipofilidad respecto a su parental (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004).

### 1.5.2. Mecanismos de acción de las Antraciclinas

Diferentes experimentos han demostrado que la diana principal de las Antraciclinas es el DNA (Chaires, 1996; Valentini et al., 1985). Las Antraciclinas interaccionan con la doble hélice con la consecuente inhibición de la síntesis de DNA, el entrecruzamiento con el DNA, la interferencia en la separación de las cadenas y con la actividad helicasa, y el daño del DNA vía inhibición de la topoisomerasa II (Chaires, 1996; Zunino and Capranico, 1990). Existen resultados contradictorios con respecto a la relación entre la inhibición de la síntesis del DNA, la inhibición del crecimiento celular y la inducción de apoptosis, aunque la unión al DNA parece ser imprescindible para que estos fármacos sean capaces de inhibir el desarrollo tumoral (Gewirtz, 1999; Perego et al., 2001; Valentini et al., 1985). Recientemente, en nuestro laboratorio hemos descrito que la Daunorubicina puede ejercer efectos antiproliferativos en células Jurkat induciendo apoptosis o senescencia celular, dependiendo de la dosis utilizada (Mansilla et al., 2003).

La unión de las Antraciclinas al DNA también está asociada a la inhibición de la de transcripción génica (Gewirtz, 1999; Marín et al., 2002; Portugal et al., 2001). Su capacidad de inhibir la síntesis de RNA se debe a la habilidad de estas moléculas de competir con diversos factores de transcripción por los lugares de unión en el DNA (Chiang et al., 1998; Dickinson et al., 1998; Mansilla et al., 2004; Martín et al., 1999;

Vaquero and Portugal, 1998). Dado que la expresión de los genes se controla mayoritariamente a nivel de transcripción, el desarrollo de fármacos capaces de regular la expresión génica a nivel de transcripción (Gottesfeld et al., 2000) constituye una herramienta terapéutica potencialmente efectiva en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, se ha demostrado que la afinidad de la mayoría de estas moléculas es menor que la de los factores de transcripción por sus dianas génicas (Bellorini et al., 1995; Brogгинi et al., 1989; Chiang et al., 1998), de manera que las concentraciones necesarias para modular la transcripción son relativamente altas ( $\mu\text{M}$ ).

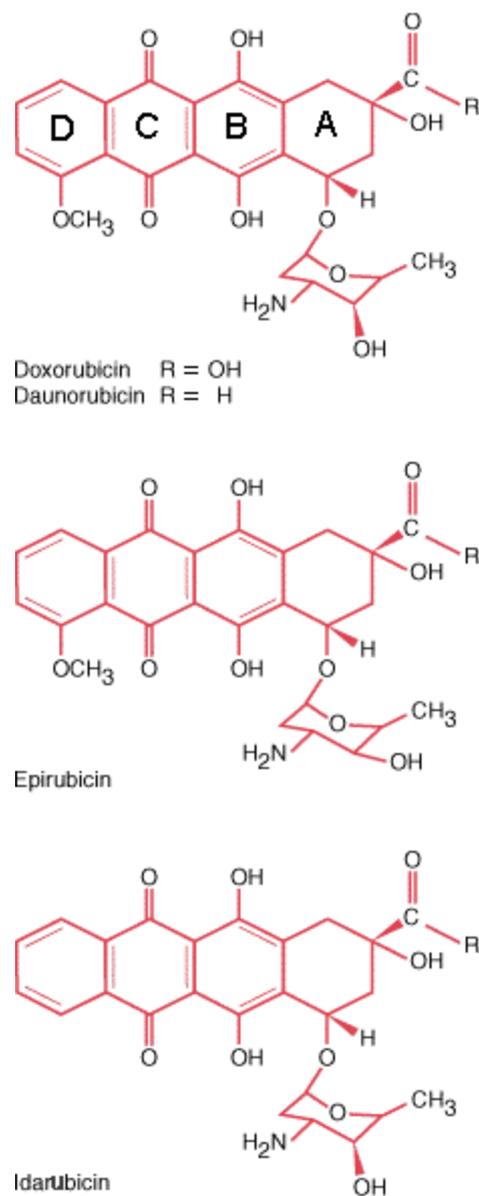
Se han descrito otros mecanismos de acción, independientes de la unión directa de las Antraciclinas al DNA. Estos compuestos parecen estar implicados en la formación de radicales libres, peroxidación lipídica y efectos directos sobre la membrana plasmática (Gewirtz, 1999; Minotti et al., 2004), mecanismos que pudieran ser responsables, en parte, de los efectos secundarios derivados de tratamientos extensos con Antraciclinas (Gewirtz, 1999; Minotti et al., 2004). Debido a la aparición de efectos secundarios indeseados y a la presencia de resistencias en algunas células tumorales, existe la necesidad de obtener Antraciclinas que mantengan o incrementen su efectividad antitumoral pero que presenten una reducción de los efectos adversos.

### 1.5.3. Farmacología de las Antraciclinas

#### • Actividad y administración en clínica

Las Antraciclinas Doxorubicina (Adriamicina<sup>®</sup>) y Daunorubicina (Daunomicina) se utilizan en el tratamiento de varios tipos de cáncer desde hace casi 40 años (Weiss, 1992). La Doxorubicina es la molécula de esta familia con el espectro de actividad más amplio. Se considera uno de los agentes más eficaces en el tratamiento de cánceres de mama y se administra solo o de forma combinada con otros antitumorales. Además, la Doxorubicina resulta eficaz en el tratamiento de carcinomas de endometrio, cáncer de testículo, próstata, cerviz y muchos mielomas y presenta una actividad limitada, aunque probada, frente a cánceres de tiroides, ovarios y pulmón (Booser and Hortobagyi, 1994; Gewirtz, 1999; Minotti et al., 2004; Weiss, 1992). La Daunorubicina es el fármaco más utilizado en el tratamiento de leucemias mieloides linfocíticas agudas (Gewirtz, 1999; Weiss, 1992). Aunque presenta alguna actividad frente a tumores sólidos en niños, la actividad anticancerígena en tumores sólidos de adultos es muy baja (Booser and Hortobagyi, 1994; Gewirtz, 1999; Minotti et al., 2004). Las Antraciclinas se pueden

administrar en diferentes posologías. Como norma general, se realizan tratamientos con la dosis máxima tolerada por el paciente, expresada en  $\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$  (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). En quimioterapia se suelen administrar las Antraciclinas de manera intravenosa, en forma de bolo semanal, o bien, se realiza una infusión continua de hasta 96 horas (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). La infusión continua de Antraciclinas resulta en la reducción de la toxicidad y de los efectos no deseados como la mielosupresión y la aparición de náuseas y vómito, sin afectar la eficacia del tratamiento (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004).

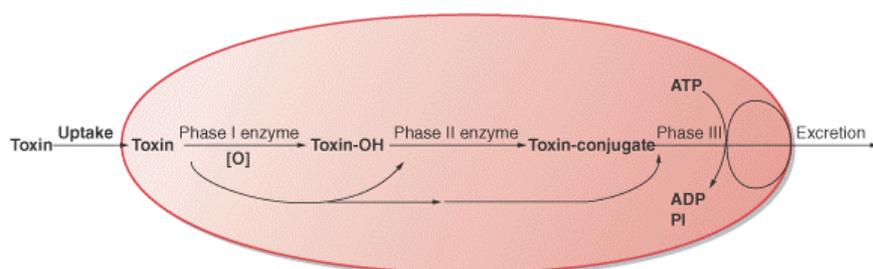


**Figura I17.** Estructura de las cuatro Antraciclinas comúnmente utilizadas en el tratamiento del cáncer en la actualidad, Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina e Idarubicina. Todas las Antraciclinas están formadas por un cromóforo plano y un aminoazúcar o daunosamina.

### • Efectos adversos derivados de la quimioterapia con Antraciclinas

#### Mecanismos de resistencia

La resistencia múltiple o fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*) se caracteriza porque las células tumorales presentan resistencia cruzada a varios fármacos, no relacionados entre sí estructuralmente (Zhang and Berger, 2003). Existen diferentes mecanismos implicados en el desarrollo de la resistencia múltiple en las células tumorales, que incluyen la pérdida de función de genes implicados en la vía de la apoptosis, como *p53*, y alteraciones en el proceso de detoxificación de xenobióticos, como la reducción de la eficacia de las reacciones de la fase I o la activación de los procesos de las fases II y III, esquematizados en la Figura I18 (Zhang and Berger, 2003).



**Figura I18.** Esquema de las fases del proceso de detoxificación celular de xenobióticos y fármacos. La fase I del metabolismo de xenobióticos está mediada por la acción de la citocromo p450 oxidasa, que genera metabolitos con una mayor toxicidad que los fármacos parentales, y que son procesados durante la siguiente fase de la detoxificación. Durante la fase II se forman conjugados entre el xenobiótico y el glutatión (GSH), ente otros, reacción catalizada por la glutatión-S-transferasa (GST). La fase III de la detoxificación está mediada por la acción de bombas transportadoras de membrana, que expulsan los xenobióticos parentales o sus metabolitos fuera de la célula, en un proceso que requiere gasto energético. Alteraciones en uno o diversos factores que controlan las diferentes fases están asociado al fenotipo MDR de algunos tumores.

El fenotipo MDR está frecuentemente asociado a una reducción de la acumulación intracelular de los fármacos antitumorales, normalmente como consecuencia de la sobreexpresión en las células tumorales de las proteínas involucradas en la detoxificación. La resistencia múltiple a antitumorales se debe a la sobreexpresión de dos tipos de proteínas en las células cancerosas: transportadores de membrana que bombean moléculas al exterior de la célula y proteínas que impiden la entrada de los fármacos al interior de las células. La primera categoría está constituida por los miembros de la familia de proteínas transmembrana MDR, como la glicoproteína P

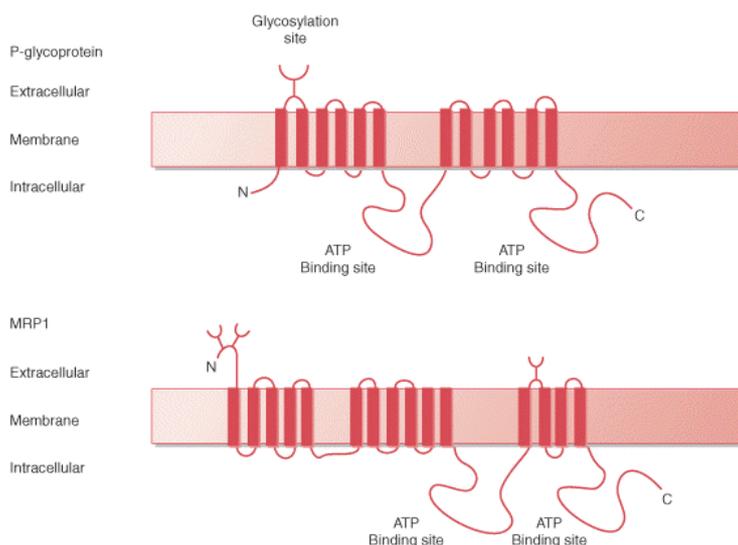
(asociada al fenotipo de MDR clásico) y las proteínas MRP (*Multidrug Resistance Protein* o *Multidrug Resistance-associated Protein*). Los miembros de esta familia pertenecen a la familia multigénica de proteínas transportadoras dependientes de ATP ABC (*ATP Binding Cassette*), cuya estructura se muestra en la Figura I19. La glicoproteína P, de 170 kDa, está codificada por el gen *mdr-1* (Figura I19, parte superior). La proteína MRP-1 o *Multidrug Resistance Protein 1* (Figura I19, parte inferior) tiene un peso molecular de 190 kDa y está codificada por el gen *mrp-1*. Tanto la glicoproteína P como la proteína MRP-1 se expresan de manera ubicua en células normales y tumorales. Además se han identificado otras cinco isoformas de la proteína MRP-1 y se ha relacionado la implicación de, al menos dos de ellas, MRP-2 y -3, en procesos de resistencia a antitumorales. La sobreexpresión de estas proteínas transportadoras en las células tumorales puede deberse a alteraciones que afectan directamente a los genes que las codifican, como procesos de amplificación génica. Por otro lado, el fenotipo MDR puede adquirirse también de manera secundaria, como resultado de mutaciones en los genes *p53* o *Sp1*, cuyos productos reprimen y activan, respectivamente, la expresión de los genes *mdr-1* y *mrp-1*.

Muchos de los fármacos utilizados en la terapia del cáncer, incluyendo las Antraciclinas, pueden ejercer su efecto induciendo la apoptosis como consecuencia de la interferencia con las topoisomerasas (Gewirtz, 1999; Perego et al., 2001). Las topoisomerasas son enzimas nucleares que catalizan cortes transitorios en una o en las dos cadenas del DNA que son necesarios para numerosas funciones celulares, como la duplicación, la transcripción o la reparación de errores, y su posterior religado. Se han descrito dos tipos de topoisomerasas en mamíferos: I y II, que catalizan cortes sobre una o dos cadenas del DNA, respectivamente. Experimentos realizados demuestran que las Antraciclinas unidas al DNA, al menos a elevadas dosis intracelulares, interfieren con el corte y religado de la topoisomerasa II (Gewirtz, 1999). Como consecuencia se producen lesiones en el DNA y un proceso de “envenenamiento”, debido a que las células intentan compensar las lesiones generando una mayor cantidad de topoisomerasa II, que retroalimenta el proceso y activa la vía de la apoptosis dependiente de *p53* (Zunino and Capranico, 1990). Muchas células tumorales desarrollan resistencia a antitumorales que actúan interfiriendo con las topoisomerasas, debido a que contienen alteraciones en la actividad de las topoisomerasas I o II (Booser and Hortobagyi, 1994; Gewirtz, 1999; Minotti et al., 2004). Por otro lado, la sobreexpresión de las proteínas

transportadoras MDR-1 o MRP-1 puede interferir con estos fármacos porque disminuyen las cantidades intracelulares de fármaco necesarias para provocar la interferencia con las topoisomerasas (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004; Zhang and Berger, 2003).

### Efectos secundarios: cardiotoxicidad

Los efectos secundarios derivados de los tratamientos prolongados con Antraciclinas son la aparición de mielosupresión, mucositis, alopecia, náuseas, vómitos, el incremento de la pigmentación de la piel y la cardiotoxicidad, siendo este último el efecto adverso más grave (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004).



**Figura I19.** Estructura de las proteínas transmembrana de la familia MDR: glicoproteína P o MDR-1 (parte superior) y MRP-1 (parte inferior). Se trata de proteínas transportadoras que bombean diversos compuestos, incluidos algunos fármacos antitumorales, al exterior de la célula con dependencia de ATP. Su sobreexpresión en células tumorales se relaciona con la resistencia a diversos agentes utilizados en la quimioterapia de cáncer.

Los efectos cardiotóxicos de las Antraciclinas derivan del metabolismo de estas moléculas. El anillo C de la quinona tiene alto potencial reactivo (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). Puede actuar como aceptor de uno o dos electrones en reacciones mediadas por los enzimas citocromo p450 reductasa, NADH

deshidrogenasa y xantina oxidasa, y reducirse, formando el radical libre semiquinona (deoxiglicona) (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). La semiquinona puede interactuar con moléculas de oxígeno y participar en procesos de transferencia de electrones, contribuyendo a la formación de nuevos radicales libres como el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) o el radical peróxido ( $H_2O_2$ ) (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). Los procesos de formación de radicales libres pueden inhibirse por acción de los enzimas celulares superóxido dismutasa (SOD), catalasa, o glutatión peroxidasa (GSH PX) (Gewirtz, 1999). Los radicales libres que se generan durante el metabolismo de las Antraciclinas provocan lesiones en el DNA, inhiben la fosforilación oxidativa e inducen peroxidación lipídica en las membranas plasmáticas de las células (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). La producción de radicales libres no contribuye significativamente en la citotoxicidad de las Antraciclinas en las células tumorales pero sí de las células cardíacas, células que son metabólicamente muy activas (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004).

La susceptibilidad a la cardiotoxicidad tras el tratamiento prolongado con Antraciclinas depende de varios factores: la edad y los factores de riesgo del paciente, y la duración del tratamiento. Además, el uso de moléculas que revierten el fenotipo de resistencia clásica puede incrementar la concentración intracelular de Antraciclinas en tejido sanos, entre ellos las células cardíacas, acentuándose su potencial cardiotóxico (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). Existen diferentes estrategias para reducir los efectos cardiotóxicos de las Antraciclinas, como la administración de los fármacos en forma de infusión continua durante 48-96 horas (de manera que la concentración en sangre sea menor que con el bolo semanal) y/o la administración de cardioprotectores, como quelantes del hierro (involucrado en la transferencia de electrones) o antioxidantes (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004).

#### **1.5.4. Optimización del índice terapéutico de las Antraciclinas: diseño racional de fármacos**

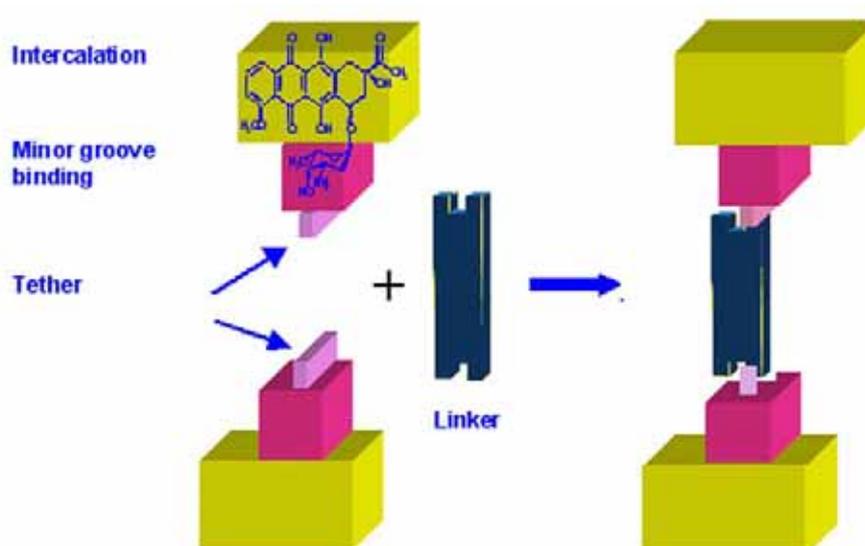
Como se ha mencionado con anterioridad, a pesar de ser antitumorales de probada eficacia, el uso de las Antraciclinas en la quimioterapia del cáncer tiene inconvenientes, esencialmente fenómenos de toxicidad en tejidos sanos y el desarrollo de resistencias en algunas células tumorales (Gewirtz, 1999; Minotti et al., 2004). Por

este motivo, existen diferentes estrategias a la hora de aumentar el índice terapéutico de las Antraciclinas y minimizar los efectos adversos.

El diseño racional de nuevos compuestos a partir de moléculas ya existentes constituye una estrategia con el fin de obtener nuevos fármacos. Esto ha sido posible gracias a los datos cristalográficos y termodinámicos, que han permitido conocer las interacciones que se establecen entre las distintas Antraciclinas y el DNA (Chaires, 1990; Hu et al., 1997; Leng et al., 1998; Robinson et al., 1997). La mayor comprensión de los principios mecanísticos y estructurales de los intercaladores del DNA, ha permitido avanzar en el diseño de nuevos fármacos a partir de moléculas parentales modificadas (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001). Es posible diseñar y sintetizar nuevas moléculas potencialmente más eficaces, modificando selectivamente el cromóforo o el azúcar, sin alterar los grupos que intervienen en la interacción con el DNA (Priebe et al., 2001). Por ejemplo, se ha sintetizado un análogo de la Doxorubicina, la WP744, que ha demostrado ser muy eficaz en líneas de neuroblastoma con resistencia múltiple (Inge et al., 2004). Sin embargo, estas moléculas reconocen regiones de 2-4 pb en el DNA de manera que, aunque el reconocimiento sea altamente específico, el número total de estas secuencias diana en todo el genoma es elevado, hecho que explica en parte la aparición de efectos clínicos inespecíficos no deseados.

El “diseño modular” es un tipo de diseño racional que permite crear nuevas moléculas que reconocen específicamente secuencias en el DNA de mayor longitud (6 pb o más), permitiendo un mayor potencial discriminatorio de la secuencia de unión, así como el aumento de la especificidad de la misma (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001). Consiste en la unión de diferentes moléculas monoméricas preexistentes, de las que se conoce cómo interaccionan con el DNA, con el objetivo de obtener moléculas de mayor tamaño (Figura I20). Siguiendo esta línea de investigación, se ha desarrollado una batería de Bisantraciclinas (Figura I21) que interaccionan con el DNA con alta afinidad, cuyo interés como agentes antitumorales se está evaluando en la actualidad (Priebe et al., 2001). El primer bisintercalador que se sintetizó, la WP652, deriva de la Daunorubicina y se intercala en tetranucleótidos con una afinidad significativamente superior a su fármaco parental (Priebe et al., 2001). La Bisantraciclina WP760 está formada por dos moléculas de Doxorubicina conectadas, igual que la WP652, mediante un ligando a través del carbono 4 de las daunosaminas (Priebe et al., 2001). Se ha analizado el potencial antitumoral de la mayoría de las Bisantraciclinas sintetizadas en

el NCI (Nacional Cancer Institute, Rockville, MD) sobre un panel de 60 líneas tumorales humanas (Priebe et al., 2001). Los resultados más prometedores se obtuvieron para la WP760, que mostró ser un agente citotóxico altamente selectivo contra melanomas (Priebe et al., 2001).

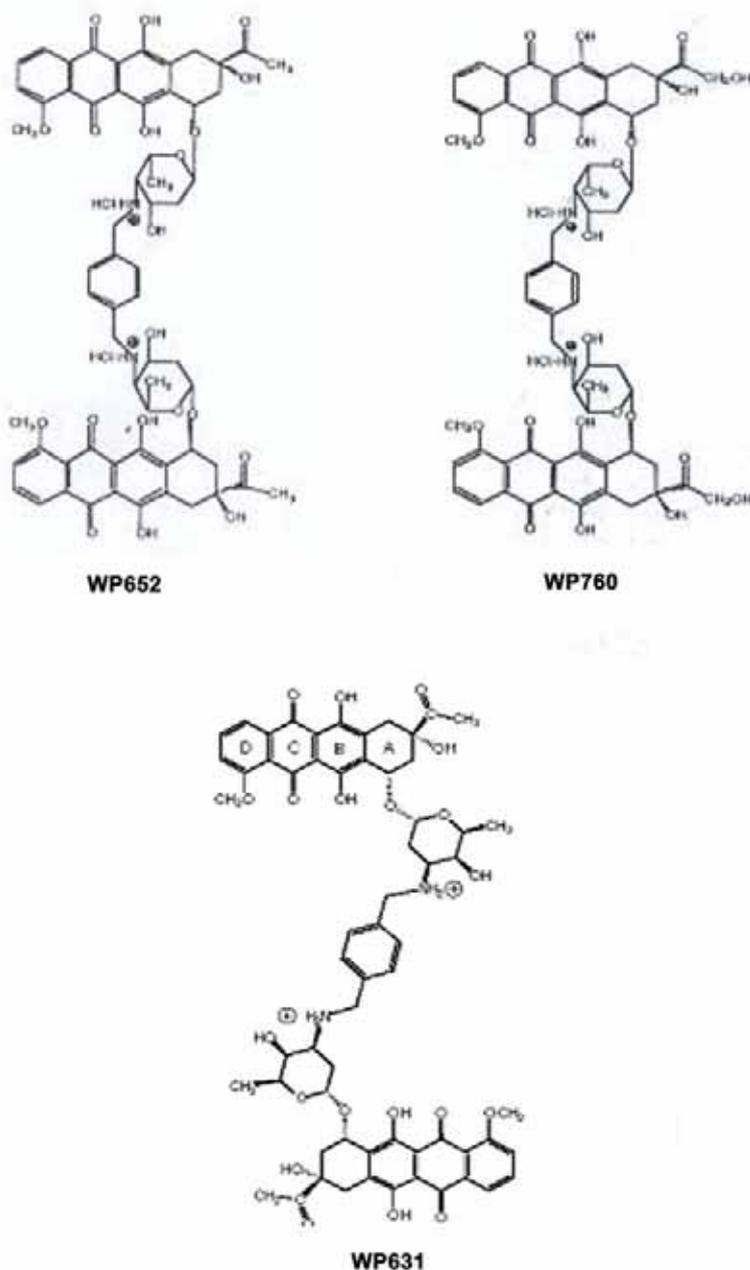


**Figura I20.** Diseño de Bisantraciclina basado en el diseño modular. El diseño modular consiste en unir dos (o más) moléculas preexistentes, en nuestro caso dos Antraciclina que se unen al DNA por intercalación, a través de un ligando o *linker*. El uso de múltiples moléculas y ligandos ha dado lugar a la creación de un amplio repertorio de nuevas moléculas, que reconocen el DNA con elevada especificidad y afinidad, y cuyo interés terapéutico se está evaluando en la actualidad.

Uno de los objetivos del grupo en el cual se ha desarrollado el presente trabajo es analizar en detalle los mecanismos de acción otra de las Bisantraciclina sintetizadas según el diseño modular, la WP631 (Figura I21), a partir de la unión de dos moléculas de Daunorubicina conectadas por el carbono 3 de sus daunosaminas (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001).

### 1.5.5. Diseño y síntesis de la Bisantraciclina WP631

La Bisantraciclina WP631 fue diseñada y sintetizada el año 1997 en el laboratorio del Dr. Waldemar Priebe en base a los conocimientos termodinámicos y cristalográficos sobre la interacción de la Daunorubicina con oligonucleótidos de DNA (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001).



**Figura I21.** Estructura de las Bisantracinas WP652, WP760 y WP631. La síntesis de estas moléculas está basada en el “diseño modular” (Figura I20). La WP631 está formada por dos moléculas de Doxorubicina, mientras que la WP652 y la WP631 están constituidas por dos Daunorubicinas unidas entre sí.

- **La Daunorubicina se intercala específicamente en tramos C+G**

La preferencia de unión de secuencia en el DNA de la Daunorubicina se ha caracterizado mediante diversas técnicas, incluyendo *footprinting* (Chaires et al., 1990). El análisis de difracción de rayos X de alta resolución ha permitido conocer las interacciones moleculares que se producen en los complejos DNA-Daunorubicina

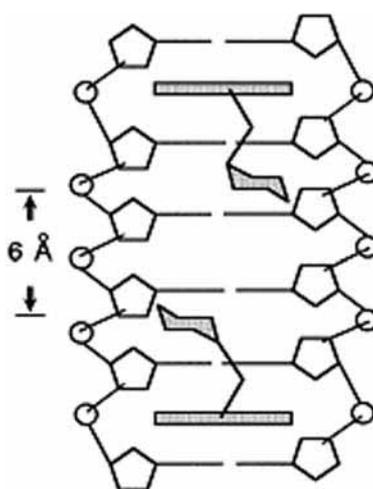
(Chaires, 1990; Chaires, 1996). Se sabe que la molécula se dispone a lo largo del surco estrecho del DNA, reconociendo preferentemente secuencias 5'(A/T)CG3' y 5'(A/T)GC3', con las que interacciona intercalando el cromóforo entre los pasos CpG de los tripletes (Chaires, 1990; Chaires, 1996). Si bien el cromóforo es esencial en la unión al DNA, existen contactos adicionales que ayudan a estabilizar el complejo. Mientras los anillos B, C y D del crómoforo (Figura I17) se intercalan a través del surco estrecho entre los tramos CpG, el anillo A ayuda a estabilizar el complejo estableciendo enlaces de hidrógeno. El segundo dominio de la molécula, formado por la daunosamina, se une al surco menor del DNA, contribuyendo a la especificidad de la unión (Priebe et al., 2001). En todas las estructuras de complejos Antraciclina-DNA estudiadas, la estequiometría es de 2:1 (Figura I22). Cada molécula de Antraciclina se intercala en un extremo del hexanucleótido d(CGTACG) con las daunosaminas apuntando la una hacia la otra, siendo la separación entre ellas de unos 7Å (Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997; Priebe et al., 2001). A partir de esta observación, se decidió unir dos moléculas de Daunorubicina a través de sus aminoazúcares para dar lugar a un nuevo fármaco, la WP631, capaz de bisintercalarse en el DNA (Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997; Priebe et al., 2001).

• **La WP631 se bisintercala en el DNA con una constante de unión equiparable a la de muchos factores de transcripción**

La Bisantraciclina WP631 está constituida por dos monómeros de Daunorubicina, unidos a través de sus grupos amino por medio de un grupo *p*-xililo, que conecta los aminoazúcares a través del carbono 3 (Figura I21). Se trata de una molécula, cuyo diseño racional está basado en el “diseño modular” explicado anteriormente. El ligando se sintetizó de manera que tuviera una longitud apropiada (aproximadamente 7Å) y pudiera acomodarse en el surco menor del DNA sin ningún obstáculo estérico. Estudios cristalográficos y de viscosimetría han confirmado que la WP631 se une al DNA mediante bisintercalación (Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997; Priebe et al., 2001; Robinson et al., 1997).

Mientras la Daunorubicina se une a secuencias de 3 pb, la WP631 reconoce tramos de 6-8 pb ricos en CpG (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001). Al aumentar la longitud del lugar de unión, la probabilidad de encontrarlo repetido en el genoma disminuye (Beato, 1990; Kopka et al., 1998), hecho que permite una mejor

discriminación de secuencia y, por lo tanto, un aumento en la especificidad del reconocimiento (von Hippel and Berg, 1986). Teóricamente, el aumento en el número de bases del lugar de unión de un ligando comporta una ganancia en capacidad de discriminación del mismo ya que, de esta manera, se consigue reducir el número de los sitios de unión potenciales para la molécula en todo el genoma (Kopka et al., 1998). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que una secuencia de unión larga no siempre consigue incrementar la especificidad de unión de los ligandos puesto que la acumulación de *mismatches* podría ser mayor que en una secuencia corta (Kopka et al., 1998).

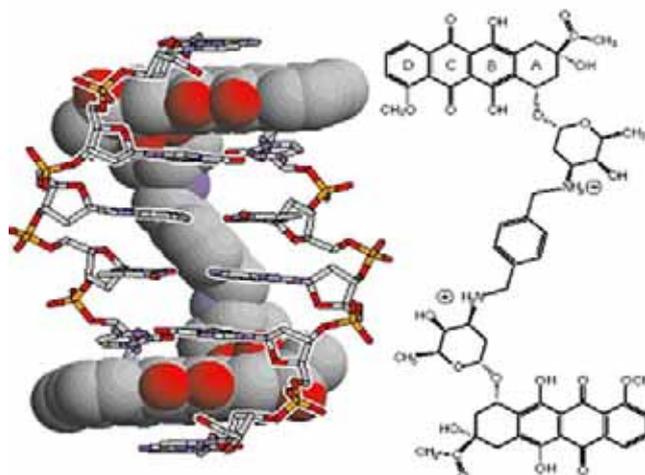


**Figura I22.** Estructura del complejo formado por la unión de dos moléculas de Daunorubicina al hexanucleótido d(CGTACG), según los resultados de cristalografía. Los cromóforos se intercalan en el surco menor, mientras las daunosaminas quedan dispuestas a lo largo del surco menor. Las daunosaminas quedan encaradas entre ellas, con los grupos reactivos 3' NH<sub>2</sub> separados entre ellos una distancia ~ 7 Å.

La Bisantraciclina WP631 presenta un orden en la preferencia de unión a secuencias ricas en CpG, siendo éste 5'CGTACG ≈ CGATCG >> CGCGCG ≈ CGGCCG'3 (Robinson et al., 1997). La unión a estas secuencias se realiza por bisintercalación, donde los dos cromóforos de la WP631 se intercalan entre los pasos CpG de los extremos de las secuencias, a través del surco menor del DNA (Figura I23).

Mediante estudios de curvas de fusión del DNA y Calorimetría Diferencial de Rastreo se ha determinado la constante de afinidad de la WP631 por el DNA, siendo ésta de  $2.7 \times 10^{11} \text{M}^{-1}$  (Chaires et al., 1997; Leng et al., 1998; Priebe et al., 2001). El valor de la constante de unión de la WP631 es muy próximo al de algunas proteínas

reguladoras que se unen al DNA (Priebe et al., 2001), lo que supone un incremento potencial en la actividad biológica (Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997; Portugal et al., 2001; Priebe et al., 2001).



**Figura 123.** Esquema de la estructura cristalográfica del complejo WP631-DNA (Robinson et al., 1997). La unión de la WP631 al DNA tiene lugar por bisintercalación entre los pasos CpG de los extremos de las secuencias, a través del surco menor del DNA.

#### • Mecanismo de acción: la WP631 inhibe al factor de transcripción Sp1

Como se ha mencionado en el apartado 1.2.1., el factor Sp1 es un miembro de una familia génica formada por los factores de transcripción Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4 (Suske, 1999) con alta homología estructural. Los factores Sp1 y Sp3 se expresan de manera ubicua, mientras que Sp2 y Sp4 son factores específicos de tejido (Suske, 1999). Mientras que Sp1 se considera un activador de la transcripción, el factor Sp3 puede actuar tanto activando como reprimiendo la transcripción según el contexto del promotor y la proporción entre Sp1/Sp3 (Fandos et al., 1999; Hagen et al., 1994; Suske, 1999; Udvadia et al., 1993). Los factores Sp1 y Sp3 reconocen y compiten por las mismas secuencias en el DNA (Fandos et al., 1999; Majello et al., 1994). Estas secuencias son ricas en CG y están presentes en gran cantidad de promotores de genes que controlan el ciclo celular (Kardassis et al., 1999; Koutsodontis et al., 2002; Opitz and Rustgi, 2000). Además, se ha demostrado que la expresión del factor Sp1 aumenta durante los eventos que llevan a la transformación celular (Studzinski et al., 1996).

Debido a que el factor de transcripción Sp1 juega un papel muy importante en procesos oncogénicos, sus secuencias de unión en el DNA se han considerado dianas de interés para fármacos antitumorales que interactúan con el DNA. En esta dirección, se han desarrollado diversos estudios con ligandos que se unen específicamente a regiones ricas en CG, entre ellos la Daunorubicina y la WP631.

La Daunorubicina y la WP631 inhiben el inicio de la transcripción génica, como se ha demostrado mediante ensayos de transcripción *in vitro* realizados en nuestro grupo (Martín et al., 1999; Portugal et al., 2001). Ambos fármacos inhiben el inicio de la transcripción del promotor tardío mayor de adenovirus (AdML) unido a un cassette *G-less*, de forma dependiente de concentración y a unas concentraciones de fármaco similares. Sin embargo, la eficiencia de la inhibición cuando el promotor tenía un lugar de unión de para el factor activador de la transcripción Sp1 fue unas 15 veces superior para la WP631. Estos resultados indican que la WP631 compite con Sp1 por su lugar de unión en el DNA. Ensayos adicionales de retardamiento en gel (*bandshift*) y *footprinting* han confirmado la eficiencia de la WP631 para desplazar al factor Sp1 de su lugar de unión en el DNA (Martín et al., 1999; Portugal et al., 2001). Posteriormente se realizaron experimentos adicionales para comprobar que la WP631 era capaz de modular la expresión de genes activados por Sp1 *in vivo*. Se escogió el oncogen *c-myc* debido al papel central que juega en el control del ciclo celular y en procesos de transformación cuando su expresión se encuentra desregulada (Desbarats et al., 1996; Hay et al., 1987; Martín et al., 1999; Portugal et al., 2001) y se confirmó que la WP631 era capaz de inhibir su expresión en células MCF-7 y Jurkat T (Portugal et al., 2001). Sin embargo, los efectos de la WP631 sobre Sp1 *in vivo* son difíciles de diseccionar, debido a que el control del ciclo celular está sometido a complejos niveles de regulación y a cascadas génicas (Koutsodontis et al., 2002; Opitz and Rustgi, 2000). Para poder realizar un análisis más directo, recientemente hemos diseñado nuevos experimentos de transcripción *in vivo* (células en cultivo), que confirman la capacidad de la WP631 para inhibir eficientemente la transcripción dependiente del factor Sp1 en células Jurkat T transfectadas (Mansilla et al., 2003), tal y como se describe en detalle en esta memoria.

Por otra parte, trabajos desarrollados en otros laboratorios corroboran que la Bisantranciclina WP631 es un potente inhibidor de la unión del factor de transcripción Sp1 al DNA, ya sea directa o indirectamente (Botella et al., 2001; Gaidarova and Jiménez, 2002).

---

- **Actividad antitumoral de la WP631: inducción de muerte celular independiente de p53 de líneas tumorales**

Dada la elevada constante de afinidad de la WP631 y confirmada su habilidad de competir y desplazar eficientemente al factor Sp1 de su lugar de unión al DNA, se postuló que esta Bisantraciclina sería capaz de modular la expresión génica en células tumorales con mayor efectividad que su fármaco parental, la Daunorubicina, y otras Antraciclina como la Doxorubicina. Se ha demostrado que la WP631 es más efectiva (citotóxica) que la Doxorubicina en las líneas Jurkat T y MCF-7/VP-16 (línea resistente a diferentes antitumorales), pero no en la línea MCF-7 salvaje (Chaires et al., 1997; Portugal et al., 2001; Villamarín et al., 2002; Villamarín et al., 2003).

Recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio, que la WP631 provoca la acumulación en G<sub>2</sub>/M de las células Jurkat T, con una inducción limitada de apoptosis (Villamarín et al., 2002; Villamarín et al., 2003). Tratamientos prolongados con WP631 (72-96 horas) provocaron en algunas células la aparición de poliploidías y la muerte posterior por catástrofe mitótica. La catástrofe mitótica es un tipo de muerte celular independiente de *p53* que se puede inducir tras tratamientos con fármacos que lesionan el DNA (Brown JM, 2005; Bunz et al., 1998; Roninson et al., 2001). La mejor comprensión de las vías que regulan el proceso constituye una herramienta potencial en la racionalización del tratamiento del cáncer, especialmente de los tumores sólidos, que frecuentemente presentan formas no funcionales de *p53* y son refractarios a la inducción de la apoptosis (Zhang and Berger, 2003). La actividad antiproliferativa de este nuevo fármaco podría estar más ligada a su capacidad de inhibir la transcripción de algunos genes, como *c-myc* y *p53*, tal y como demostraron análisis preliminares de *Northern* y *Western blot* (Villamarín et al., 2002).

