

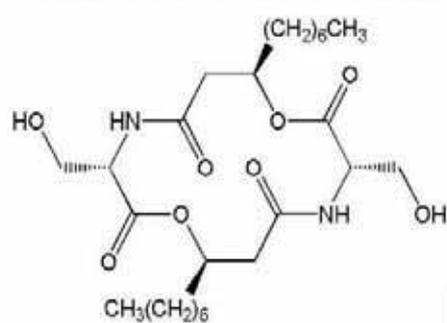
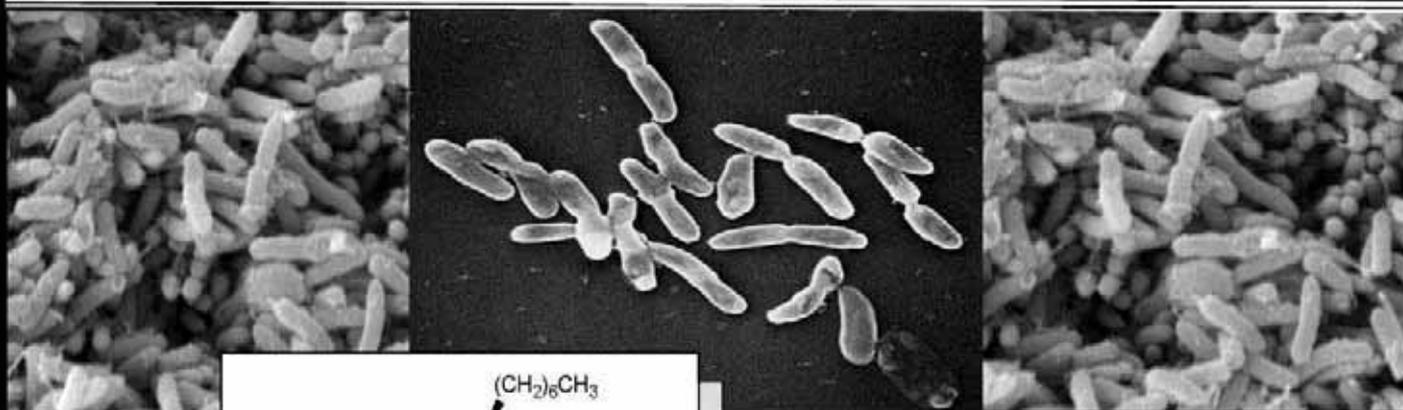
---

---

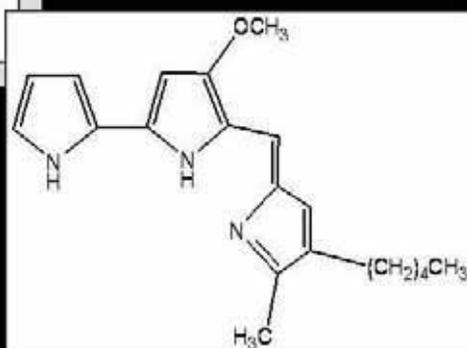
**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO  
ANTICANCEROSO E IDENTIFICACIÓN DE DIANAS  
MOLECULARES DE PRINCIPIOS ACTIVOS  
PROCEDENTES DE *Serratia marcescens***

---

---



TESIS DOCTORAL







**Facultat de Medicina**  
**Departament de Patologia i Terapèutica Experimental**  
Programa de Doctorat: Biologia i Patologia Cel·lulars  
Bienni 2002-2004

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ANTICANCEROSO E  
IDENTIFICACIÓN DE DIANAS MOLECULARES DE PRINCIPIOS  
ACTIVOS PROCEDENTES DE *Serratia marcescens*”**

Memoria presentada por Vanessa Soto Cerrato para optar al grado de Doctor por la Universidad  
de Barcelona

Dr. Ricardo E. Pérez Tomás  
Director

Vanessa Soto Cerrato  
Doctoranda

2007

## **VII. DISCUSIÓN**

---



Ante las limitaciones en el tratamiento de la patología del cáncer mediante quimioterapia, en especial por la aparición de resistencia a múltiples fármacos en tumores ya tratados, nos propusimos la identificación y caracterización del mecanismo de acción de nuevos compuestos anticancerosos.

La naturaleza es una conocida fuente de compuestos químicos con actividades biológicas interesantes para aplicaciones médicas (Newman DJ y Cragg GM, 2007). Fue por ello que nuestro grupo se interesó, en particular, por la identificación de la propiedad anticancerosa en sustancias de origen natural. En esta línea de investigación, a partir del sobrenadante obtenido de la cepa bacteriana de *Serratia marcescens* 2170, nuestro grupo identificó dos sustancias químicas con propiedades anticancerosas. Éstas fueron el tripirrol conocido como prodigiosina y el ciclodepsipéptido serratomolide (AT514). Con el primero se realizaron algunos estudios en líneas cancerosas de origen hematopoyético y gastrointestinal (Montaner B, et al., 2000; Montaner B y Pérez-Tomás R, 2001; Díaz-Ruiz C, et al., 2001).

Estos datos preliminares nos llevaron a plantear el desarrollo de este trabajo de tesis, en el cual hemos caracterizado el efecto anticanceroso de AT514 y hemos ampliado los conocimientos sobre prodigiosina al respecto, profundizando en los mecanismos moleculares de citotoxicidad que inducen ambas sustancias, sobretodo en el modelo de cáncer de mama. También hemos realizado estudios sobre el efecto de prodigiosina en células cancerosas con fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, así como estudios para evaluar la toxicidad *in vivo* de AT514.

Los resultados obtenidos muestran que, tanto AT514 como prodigiosina, son potenciales agentes anticancerosos, aunque la síntesis de derivados con mayor especificidad estaría recomendada con la finalidad de mejorar la ventana terapéutica de dichas sustancias.

## **EFEECTO ANTICANCEROSO**

El cáncer es una enfermedad caracterizada por el excesivo y descontrolado crecimiento celular que invade y daña tejidos de un organismo causando la muerte de éste (Weinberg RA, 2007). Las células que constituyen los tumores se acumulan o bien porque tienen descontrolado el ciclo celular y no paran de dividirse, o bien porque son resistentes a estímulos fisiológicos inductores de muerte. A la hora de combatir esta enfermedad, sobretodo en estadios avanzados, se usan tratamientos sistémicos como la quimioterapia. Ésta tiene como propósito evitar el avance del tumor o provocar su recesión para que no pueda dañar órganos vitales del organismo. Dicho cometido lo puede lograr tanto con sustancias quimioterapéuticas citostáticas, las cuales provocan parada del ciclo celular y con ello la diferenciación de las células o con sustancias quimioterapéuticas citotóxicas, las cuales inducen la muerte de las células del tumor.

En este trabajo se muestra cómo los compuestos naturales AT514 y prodigiosina son capaces de inducir una disminución en la viabilidad celular debida a parada de la proliferación o a muerte celular dependiendo del tiempo de exposición y del modelo experimental utilizado.

La actividad anticancerosa de AT514 se recoge por primera vez en este trabajo. Ésta se ha demostrado en un amplio panel de células cancerosas humanas *in vitro*, de las que se ha estudiado a fondo en el modelo de cáncer de mama y, en colaboración con el grupo de la Dra. García-Pardo, el modelo *ex vivo* de células B de leucemia linfocítica crónica (B-CLL, de B-cell chronic lymphocytic leukemia). El potencial terapéutico como agentes anticancerosos ha sido atribuido a un gran número de depsipéptidos (Sarabia F, et al., 2004), algunos de los cuales se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos (Rawat DS et al., 2006). Éste es el caso de FR901228 (FK228), el cual también ha demostrado la capacidad de parar el ciclo e inducir muerte en células de melanoma *in vitro* (Klisovic D, et al., 2003), entre otras, e inducir muerte de forma selectiva en B-CLL (Byrd JC, et al., 1999), al igual que AT514. Kahalalido F es un depsipéptido de origen marino que se encuentra en ensayos clínicos y que ha probado tener una potente y selectiva actividad antitumoral, como en el caso de células de cáncer de próstata y mama (Suárez Y, et al., 2003). Didemmina B y dehidrodidemmina (Aplidin<sup>®</sup>) son otros ejemplos de depsipéptidos que han mostrado marcada citotoxicidad, en especial en células de cáncer de próstata, donde se ha mostrado que son más potentes que otros quimioterapéuticos usados en la actualidad, como son vinorelbina, taxol o vincristina (Geldof AA, et al., 1999). Asimismo, es importante remarcar que hemos observado que AT514 es eficaz contra B-CLL resistentes al tratamiento con fludarabina (Escobar-Díaz E, et al., 2005), quimioterapéutico comúnmente usado en el tratamiento de estos pacientes (Schriever F y Huhn D. 2003), y que no tiene

citotoxicidad en linfocitos normales de sangre periférica (PBL, de *peripheral blood lymphocytes*). El éxito de muchos depsipéptidos, junto con las prometedoras propiedades de AT514, hacen de éste un posible candidato a agente antitumoral, especialmente para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica.

Por otro lado, el efecto anticanceroso de prodigiosina ya había sido caracterizado previamente en nuestro laboratorio en modelos *in vitro* de células cancerosas de origen hematopoyético y gastrointestinal (Montaner B, et al., 2000; Montaner B y Pérez-Tomás R, 2001; Díaz-Ruiz C, et al., 2001). En este trabajo ampliamos los estudios acerca de sus propiedades anticancerosas a líneas de cáncer de mama, pulmón y neuroblastoma, observando que prodigiosina también posee una actividad anticancerosa en todos estos modelos celulares. Prodigiosina pertenece a una gran familia de compuestos químicos tripirrólicos llamada prodigininas, de estructura química similar y de los cuales muchos poseen propiedades anticancerosas (Bennett JW y Bentley R, 2000). Cicloprodigiosina hidrócloride es capaz de inducir apoptosis en células en cultivo de cáncer de mama y de colon (Yamamoto D, et al., 2000; Yamamoto C, et al., 2001) y en carcinomas *in vivo* tanto de hígado (Yamamoto C, et al., 1999) como de mama (Yamamoto D et al., 2002). Metacicloprodigiosina y undecilprodigiosina son otras prodigininas con actividad antitumoral (Liu R, et al., 2005). Ya en el año 2000 se realizó un estudio donde se sintetizaron derivados de prodigiosina y se vio que gran parte de su actividad citotóxica residía en el grupo metóxi del carbono 6, ya que al substituirlo por un otro grupo alcoxi mayor, la actividad del compuesto se veía reducida (D'Alessio R, et al., 2000). También se han sintetizado otros derivados de prodigiosina, los cuales se encuentran en ensayos clínicos de fase I/II, llamados Obatoclax mesylate, el cual ha demostrado tener prometedoras actividades anticancerosas (Trudel S, et al., 2007) y 2-(1H-pirrol-2-il)-5[(2H-pirrol-2-ilideno)metil]-1H-pirrol, indicado especialmente para el tratamiento de leucemias y linfomas. Es más, prodigiosina propiamente dicha se encuentra en ensayos preclínicos para su evaluación en el tratamiento del cáncer pancreático (AIDA Pharmaceuticals). Estos datos muestran a las prodigininas, y en especial a prodigiosina, como unos compuestos con una potente y prometedora actividad anticancerosa.

Otros muchos compuestos de origen natural se han descrito recientemente para el tratamiento del cáncer. Entre ellos, muchos son menos potentes a la hora de inducir una bajada en la viabilidad celular que los descritos en este trabajo, ya que necesitan o dosis más elevadas o tiempos de tratamiento más largos para provocar el mismo efecto anticanceroso. Este es el caso, por ejemplo, de dos compuestos marinos llamados neanfimedina y dehidrotirsiferol (Marshall KM, et al., 2003; Pec MK, et al., 2003) los cuales han demostrado menor actividad anticancerosa que prodigiosina en células de cáncer de mama. Respecto a las dosis necesitadas

*in vitro* por quimioterapéuticos que se usan actualmente en la clínica, también encontramos compuestos que necesitan dosis similares o superiores a las descritas en AT514 y prodigiosina para ser eficaces. Epirrubicina, paclitaxel y vinorelbina son tres medicamentos que se usan para el tratamiento del cáncer de mama y se les han descrito unos valores de IC<sub>50</sub> de 8, 25 y 52 µM respectivamente (Yamamoto D, et al., 2002; Menéndez JA, et al., 2001; Menéndez JA, et al., 2002). Los tres son menos potentes que prodigiosina, con valor de IC<sub>50</sub> en torno a 1 µM para células de cáncer de mama, y tan sólo el primero es similar en eficacia a AT514 siendo éste más potente que paclitaxel y vinorelbina. También hemos comparado, en colaboración con el grupo del Dr. Ambrosio, el efecto de prodigiosina y el del quimioterapéutico convencional cisplatino sobre células de neuroblastoma, siendo prodigiosina hasta treinta veces más potente que éste, dependiendo de la línea celular estudiada. Todo ello sugiere que los rangos de dosis eficaces, tanto de AT514 como de prodigiosina, podrían ser perfectamente compatibles con su uso como agentes quimioterapéuticos.

### **POSIBLE USO TERAPÉUTICO. “PROS Y CONTRAS”.**

#### **Ventana terapéutica**

En la actualidad, el desarrollo de un nuevo fármaco es un largo proceso que consta de una fase preclínica y otra clínica. Durante ambas fases se evalúan múltiples características de los compuestos en estudio, pero uno de los factores más críticos para que un fármaco llegue a su comercialización es que demuestre, junto a su elevada eficacia, una baja toxicidad para el paciente y el menor número posible de efectos secundarios no deseados.

En este estudio hemos demostrado que las células cancerosas tienen mayor sensibilidad al tratamiento tanto con prodigiosina como con AT514, incluso las resistentes a múltiples fármacos. También hemos visto que ambas sustancias poseen una eficacia *in vitro* igual a la de muchos quimioterapéuticos utilizados en la práctica clínica habitual. De todos modos, esto puede no ser suficiente para su paso al tratamiento del cáncer ya que, dependiendo de las líneas celulares cancerosas y no cancerosas que comparemos, la eficacia de estos compuestos presenta ventanas terapéuticas no muy amplias. Este es un problema común a muchas sustancias en ensayos clínicos. La estrategia que se sigue es mejorar el producto haciendo análogos químicos con pequeñas variaciones que nos pudieran disminuir la toxicidad en las células no cancerosas y/o aumentar la de las cancerosas. A la sustancia originaria se le denomina “cabeza de serie” y

el resto son compuestos derivados. Existen muchos compuestos que han llegado al tratamiento del cáncer que son derivados de otros que primero demostraron su actividad anticancerosa pero con una ventana terapéutica reducida (Newman DJ y Cragg GM, 2007). En este sentido ya se está trabajando con el compuesto prodigiosina, el cual tiene una patente europea (EP1431286) que protege la síntesis de derivados de este compuesto para su uso en la prevención y el tratamiento del cáncer. Tenemos ejemplos de derivados de esta sustancia en ensayos clínicos de fase I/II como el Obatoclax mesylate (Trudel S, et al., 2007) y 2-(1H-pirrol-2-il)-5[(2H-pirrol-2-ilideno)metil]-1H-pirrol, patentado como agente inmunomodulante para el tratamiento de leucemias y linfomas de células T adultas. Lo mismo podría suceder con derivados de AT514 que mostraran una mayor ventana terapéutica.

### **Efecto anticanceroso en células con resistencia a múltiples fármacos**

La efectividad del tratamiento del cáncer con quimioterapia se ve reducida en muchos casos por un fenómeno denominado resistencia a múltiples fármacos (MDR), el cual se suele desarrollar tras la exposición reiterada por parte de las células de un tumor a uno o varios agentes quimioterapéuticos (Gottesman MM, et al., 2002). Una de las causas moleculares más frecuentes de la MDR es la sobreexpresión de proteínas canales de membrana, llamadas proteínas ABC, que expulsan el fármaco al exterior evitando así que induzca su efecto citotóxico.

Nuevos fármacos que ejercieran su actividad antitumoral incluso en células con fenotipo MDR serían de gran ayuda para erradicar por completo los tumores y con ello la enfermedad. De este modo, prodigiosina ha demostrado ser eficaz en células con fenotipo MDR, tanto en células de cáncer de mama que sobreexpresan la proteína ABC llamada ABCG2, como en células de cáncer de pulmón que sobreexpresan la proteína ABC MRP-1. La sobreexpresión de la proteína ABCG2 confiere resistencia a drogas anticancerosas como mitoxantrona, topotecan, flavopiridol y metotrexato, mientras que la sobreexpresión de MRP-1 impide la actividad de fármacos quimioterapéuticos tan utilizados en la práctica clínica actual como las antraciclinas, los vinka alcaloides, las camptotecinas y metotrexato (Litman T et al., 2001). Además, la sobreexpresión de estas proteínas ABC se ha visto ampliamente descrita en pacientes de diferentes cánceres como los de pulmón, leucemia y carcinoma esofágico en el caso de MRP-1 (Nooter K, et al., 1995) o en leucemias y diferentes tumores sólidos de mama, pulmón, testículo, páncreas, entre otros, en el caso de ABCG2 (Robey RW, et al., 2007). Por todo ello, prodigiosina se presenta como un agente anticanceroso prometedor para el posible tratamiento

de tumores refractarios a la quimioterapia actual, al no ser sustrato de ninguna de las proteínas que confieren la resistencia al tratamiento en dichos tumores.

### **Efecto independiente de la actividad del gen supresor de tumores p53**

Tras una señal de estrés, el gen supresor de tumores llamado p53 se acumula y ejerce su función como factor de transcripción induciendo diferentes programas genéticos dependiendo del tipo y de la gravedad del daño celular ocasionado (Slee EA, et al., 2004). Como resultado de su actividad transcripcional podemos obtener o una parada de ciclo celular, principalmente mediada por el gen p21, o la eliminación de la célula por apoptosis.

Tanto el tratamiento con AT514 como el tratamiento con prodigiosina provocan su efecto citostático o citotóxico independientemente del estado funcional de p53, ya que también hemos observado actividad anticancerosa en células con p53 mutada y en células transfectadas con un mutante negativo de p53. Sin embargo, en las líneas celulares que tienen p53 funcional observamos una acumulación de esta proteína tras el tratamiento con dosis citotóxicas de ambas moléculas. Estos resultados indican que p53 está implicada de alguna manera en este proceso celular, pero su participación no es esencial para la ejecución del mismo. Esta característica es una gran ventaja respecto a otros fármacos que necesitan de la actividad de p53 para llevar a cabo su función anticancerosa, ya que esta proteína se encuentra mutada en la mayoría de tumores humanos (Lowe SW, et al., 1993). Una estrategia que se podría llevar a cabo para que esos fármacos fueran activos sería utilizar como diana molecular de la terapia anticancerosa la p53 mutada que expresa el propio tumor, usando péptidos o pequeñas moléculas para reestablecer la funcionalidad de la proteína (Selivanova G y Wiman KG, 2007). Dicho procedimiento, además de ser costoso y dificultoso, presenta un porcentaje de éxito muy limitado. Es por ello, que el descubrimiento de nuevas drogas, como AT514 y prodigiosina, con un mecanismo de acción independiente de p53, es necesario para el tratamiento de dichos tumores.

### **Ensayos *in vivo***

Un fármaco, durante su desarrollo preclínico, debe ser evaluado en ensayos de toxicidad *in vivo* en modelos animales para posteriormente poder ser evaluado en humanos. La capacidad antitumoral de prodigiosina ha sido evaluada por el National Cancer Institute en ratones atímicos inoculados con diferentes líneas celulares que abarcan desde líneas de células

cancerosas de ovario, mama, o del sistema nervioso central hasta células de melanoma. Se trataron los tumores con diversas dosis, siendo la máxima de 6,70 mg/kg ip una vez al día durante 3 días consecutivos. Esta dosis fue descrita como la dosis máxima tolerable por estos ratones. Aunque los resultados con prodigiosina no muestran una actividad antitumoral significativa, cabe suponer que los estudios realizados con sus derivados Obatoclax mesylate y 2-(1H-pirrol-2-il)-5[(2H-pirrol-2-ilideno)metil]-1H-pirrol, los cuales se encuentran actualmente en fase clínica, fueron más satisfactorios.

Hasta la fecha, no hay estudios de toxicidad ni de actividad antitumoral *in vivo* realizados con AT514. Nuestros resultados muestran que esta molécula posee una baja toxicidad en animales comparada con otros fármacos anticancerosos, aunque no hemos podido determinar la dosis máxima tolerable. También se han realizado, muy recientemente, estudios de farmacocinética con AT514 para evaluar la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) del mismo. En ellos se concluye que la solubilidad y permeabilidad del compuesto son aceptables y que éste debe ser metabolizado por la enzima CYP3A4 (Cancer Research Technologies). Respecto a la toxicidad de otros depsipéptidos, Kahalalido F, aun y presentar dosis eficaces *in vitro* mucho menores a las de AT514, mostró una dosis máxima tolerable *in vivo* de 300 µg/kg (Brown AP, et al., 2002), más de 100 veces inferior a la dosis que se administró de AT514 sin observar toxicidad alguna. Esta es una gran ventaja, ya que al poder administrar más cantidad de principio activo, sin toxicidad para el organismo, esperaríamos obtener mejores resultados terapéuticos. Esta baja toxicidad podría venir dada por la interacción que hemos observado entre AT514 y la albúmina de la sangre. Existen otros fármacos tan conocidos como paclitaxel (Paal K, et al., 2007) o vinblastina (Seetharamappa J, 2004) que también poseen la capacidad de unirse a la albúmina. De hecho, la unión de drogas anticancerosas de bajo peso molecular a anticuerpos, proteínas del suero o polímeros, es un método que se está evaluando para aumentar el índice terapéutico de agentes citotóxicos ya establecidos (Kratz F, et al., 2007). Por lo tanto, la unión de AT514 a albúmina se muestra como una característica beneficiosa ya que esta proteína actuaría de “transportador” de AT514 por el torrente sanguíneo, permitiendo así una liberación gradual de éste y disminuyendo la toxicidad que pudiera ocasionar al resto del organismo.

## **PROCESO DE MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS**

### **Ejecución del proceso apoptótico**

Frente a un estímulo de muerte, como puede ser la exposición a un agente citotóxico, la célula responde activando diferentes procesos celulares los cuales darán como resultado la eliminación de la célula por algún mecanismo de muerte. La apoptosis es un tipo de muerte celular “programada”, ya que se encuentra genéticamente controlada de forma muy estricta (Kerr JF, et al., 1972). Tiene un papel muy importante durante el desarrollo embrionario, así como en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos de organismos adultos. En condiciones fisiológicas, este proceso lleva a la desintegración de los componentes celulares sin verter su contenido al espacio extracelular y a que la célula que lo sufre sea engullida por células fagocitarias vecinas, evitando así causar una respuesta inflamatoria (Danial NN y Korsmeyer SJ, 2004). Es por ello que la inducción de la muerte celular por apoptosis debido a fármacos citotóxicos se considera una de las estrategias terapéuticas más interesantes con la que atacar a las células cancerosas (Kasibhatla S y Tseng B, 2003).

En este trabajo presentamos datos que demuestran que la exposición tanto a AT514 como a prodigiosina desencadena el proceso apoptótico en diversos tipos celulares. Ello lo podemos afirmar por varios cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares típicos del proceso apoptótico que hemos observado en las células expuestas a dichas sustancias.

AT514 causa la aparición de cuerpos apoptóticos, la externalización de residuos de fosfatidilserina, la activación de las caspasas y la fragmentación del ADN en células de cáncer de mama y de leucemia. Todo ello nos indica que provoca muerte por apoptosis, dato consistente con la caracterización del efecto proapoptótico de otros depsipéptidos. Entre ellos, FR901228 se ha visto que provoca la activación de caspasas y modificaciones en miembros de la familia de proteínas de Bcl-2 mientras que IC101 causa condensación de la cromatina, activación de caspasas y fragmentación del ADN (Klisovic D et al., 2003; Fujiwara H, et al., 2004), características compartidas con AT514. Del mismo modo, se ha observado que prodigiosina también provoca muerte celular por apoptosis en células de cáncer de mama, pulmón y neuroblastoma. En nuestro laboratorio se tenían datos previos acerca de la inducción de apoptosis por prodigiosina en células cancerosas de origen hematopoyético (Montaner B, et al., 2000) y gastrointestinales (Montaner B y Pérez-Tomás R, 2001; Díaz-Ruiz C, et al., 2001), pero tan solo fue caracterizada por la aparición de cuerpos apoptóticos y la fragmentación de ADN. En los ensayos aquí presentados se amplían estos conocimientos a otros modelos celulares a la vez que se profundiza en las rutas moleculares que participan en la inducción de la

apoptosis. Todos los eventos descritos tipifican el proceso apoptótico (Ricci MS y Zong WX, 2006) y además de estar descritos en muchos agentes quimioterapéuticos que se usan en la actualidad, también se han mostrado en células tratadas con otras prodigininas, como es el caso de células de cáncer de mama y colon tras la exposición a cicloprodiginina hidrocloreto (Yamamoto D, et al., 2000; Yamamoto C, et al., 2001). Es interesante remarcar que tanto AT514 como prodiginina ejercen su actividad apoptótica en células que no expresan la caspasa-3, considerada la caspasa efectora por excelencia. En el caso de fármacos usados actualmente en el tratamiento del cáncer como doxorubicina, etoposido o cisplatino, la actividad apoptótica de estos se veía muy mermada en células sin caspasa-3, necesitando restaurar la actividad de la dicha caspasa para tener un efecto realmente eficaz en ese tipo celular (Yang XH, et al., 2001; Blanc C, et al., 2000). EL hecho de que AT514 y prodiginina sean eficaces inductores de apoptosis en tipos celulares sin caspasa-3 funcional es una característica ventajosa. Además, podríamos esperar que, de igual modo que con los quimioterapéuticos antes mencionados, al restaurar la función de la caspasa-3 en estas células, el efecto de prodiginina y AT514 se viera incrementado.

Los estímulos que desencadenan la apoptosis se integran mediante diferentes rutas moleculares que dan lugar a la activación de dicho proceso por la vía dependiente de receptores de muerte o por la vía mitocondrial. Prodiginina ha mostrado inducir apoptosis por la vía mitocondrial, ya que observamos salida de sustancias apoptogénicas incluso cuando las caspasas están químicamente inactivadas. La mayoría de agentes citotóxicos, independientemente de sus dianas moleculares principales, acaban matando a las células mediante la inducción de modificaciones en la mitocondria (Cory S y Adams JM, 2002). Por ejemplo, la sustancia anticancerosa curcumina y el quimioterapéutico vinorelbina provocan una marcada apoptosis mediante la activación de la vía mitocondrial (Sen S, et al., 2005). La permeabilización de la membrana mitocondrial está controlada por miembros de la familia de proteínas de Bcl-2. Miembros antiapoptóticos de esta familia interaccionan con el canal mitocondrial VDAC manteniéndolo cerrado, mientras que miembros proapoptóticos interaccionan con él provocando su apertura y con ello la salida de factores apoptogénicos al citoplasma (Tsujimoto Y, 2002). Hemos descrito modificaciones en dichas proteínas, concretamente en Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bid y Bax, tras el tratamiento con AT514 de células de cáncer de mama y de leucemia. Otros agentes anticancerosos provocan efectos similares, como la bajada en la expresión del miembro antiapoptótico Bcl-X<sub>L</sub> provocada por 2,3-DCPE (Wu S, et al., 2004) o la aparición de la forma truncada de la proteína proapoptótica Bid (tBid) durante el proceso apoptótico inducido por otro depsipéptido llamado FR901228 (Peart MJ, et al., 2003). Ambas modificaciones desembocarían en la apertura de poros en la membrana externa mitocondrial y con ello en su permeabilización. No obstante, t-Bid es generado a partir de

estímulos que son integrados sólo por receptores de muerte, vía preferencial del depsipéptido FR901228 para causar apoptosis en B-CLL (Aron JL, et al., 2003). Por lo tanto, AT514 parece diferenciarse de FR901228 ya que activa ambas vías en células de cáncer de mama, y preferencialmente la intrínseca en B-CLL. Por otro lado, hemos visto como prodigiosina se acumula en la mitocondria, pudiendo provocar alteraciones en la membrana de dicho orgánulo y con ello su permeabilización. En este sentido, el análogo de prodigiosina llamado obatoclax (GX015-070) ha sido recientemente descrito como una sustancia que mimetiza el comportamiento de miembros proapoptóticos BH3 de la familia de Bcl-2, evitando la unión de Bax a Mcl-1 y aumentando los niveles de Bim, provocando así la permeabilización mitocondrial (Trudel S, et al., 2007). Prodigiosina podría causar efectos similares, ya que son compuestos químicamente muy parecidos.

Por último, así como prodigiosina ha demostrado inducir apoptosis de forma dependiente de caspasas, ya que al inhibir éstas con un inhibidor específico llamado Z-VAD.fmk (de benziloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona) se evita la muerte celular, AT514 provoca la salida de la mitocondria de AIF, una proteína implicada en procesos de apoptosis independientes de caspasas (Cregan SP, et al., 2004), mucho antes que la salida de citocromo c. Esto podría desencadenar procesos de fragmentación del ADN mediados por AIF, conduciendo a la muerte de la célula de forma previa e independiente a las caspasas. La habilidad de AT514 para inducir muerte celular a través tanto de apoptosis dependiente como independiente de caspasas es una propiedad compartida con otros agentes anticancerosos como irufolven, un agente quimioterapéutico en ensayos clínicos (Liang H, et al., 2004) y le confiere ventajas terapéuticas al poder actuar en modelos celulares que tengan alterada alguna de las dos vías.

### **Mecanismos moleculares que desencadenan el proceso apoptótico**

Cuando una célula recibe un estímulo citotóxico ésta evalúa el daño, y si es demasiado grave para repararlo, pone en funcionamiento una serie de rutas moleculares que activan procesos de muerte celular. En especial, la gran cantidad de efectos farmacológicos de prodigiosina son el resultado de diversos mecanismos de acción que afectan a diferentes procesos biológicos de vital importancia para la célula (Manderville RA, 2001). Los mecanismos moleculares que desembocan en la activación del proceso apoptótico tras el tratamiento con AT514 y prodigiosina se han estudiado en profundidad y entre ellos, la interferencia con la ruta de supervivencia señalizada por la quinasa AKT se ha visto compartido por ambas sustancias. A continuación discutimos los mecanismos de acción de AT514 y prodigiosina descritos en este trabajo junto con algún otro mecanismo que participa en el efecto

anticanceroso de prodigiosina, descrito recientemente, y que está compartido por otras moléculas de la familia de las prodigininas (Fig. 31, modificada de Pérez-Tomás R, et al., 2003).

#### Interferencia con la ruta de AKT (Figura 31, 1)

El mecanismo de acción de AT514 lo hemos descrito, en colaboración con el grupo de la Dra. García-Pardo, en el modelo *ex vivo* de B-CLL. Se sabe que proteínas quinasas como PI3K/AKT y PKC, así como el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, están constitutivamente activados en B-CLL y contribuyen de forma significativa a la resistencia que presentan estas células a morir por apoptosis (Barragán M, et al., 2002; Cuní S, et al., 2004). Los resultados presentados en este trabajo muestran claramente como AT514 interfiere con esta vía de supervivencia. Además, mostramos que estas células tienen AKT constitutivamente fosforilada, dato previamente descrito en este modelo (Cuní S, et al., 2004) y cómo AT514 induce su desfosforilación en la serina 473. La quinasa AKT controla la supervivencia celular mediante la inactivación por fosforilación de proteínas involucradas en el proceso apoptótico (Kandel ES y Hay N, 1999), pero también por la activación de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción que regula genes de supervivencia (Madrid LV, et al., 2000). AT514 reduce los niveles de expresión de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, afectando directamente a la actividad de este factor en B-CLL. Estos datos sugieren que la interferencia con las señales de supervivencia que activa la vía AKT/NF- $\kappa$ B podría ser el mecanismo de acción de AT514 para la inducción de la apoptosis. Ésta no es la primera evidencia de depsipéptidos que provocan la inhibición de la quinasa AKT. FR901228, otro depsipéptido que ha mostrado actividad anticancerosa en B-CLL, mostró la capacidad de disminuir la actividad de AKT en células 10T1/2 mediante la reducción de los niveles totales de esta quinasa (Fecteau KA, et al., 2002). Sin embargo, AT514 disminuye los niveles de fosforilación de AKT sin modificar los de la proteína total. Esta capacidad la comparte con otros depsipéptidos como Kahalalido F, el cual lo ha demostrado en células de cáncer de mama (Janmaat ML, et al., 2005). También IC101 ha mostrado la capacidad de desfosforilar AKT, en este caso gracias a la inhibición de las funciones de la proteína hsp90 (Fujiwara H, et al., 2001). Todo ello apunta a que la inhibición de las señales de supervivencia provocadas por la quinasa AKT es un mecanismo molecular común en el mecanismo de acción de la familia de los depsipéptidos.

Prodigiosina también comparte este mecanismo de acción. En este estudio hemos descrito como prodigiosina provoca la desfosforilación de AKT en el modelo de cáncer de mama. Sin embargo, la proteína regulada por AKT que ha mostrado tener un papel relevante en la

apoptosis inducida por prodigiosina no es NF- $\kappa$ B sino GSK-3 $\beta$ . Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio indicaban la capacidad de prodigiosina de desfosforilar AKT en un estudio en el cual se analizaron los niveles de fosfo-AKT en diversas líneas celulares cancerosas (Costa-Cros E, 2003). En él también se utilizó una línea celular de fibroblastos que expresaba AKT constitutivamente activa y se observó cómo el tratamiento con prodigiosina igualmente provocaba su desfosforilación, lo cual sugería la interacción directa de prodigiosina con AKT como uno de los posibles mecanismos de acción. Esta hipótesis se ha visto apoyada por datos muy recientes que hemos obtenido mediante simulación bioinformática, en colaboración con el Dr. Víctor Guallar (Departamento de Biocomputación, Barcelona Supercomputing Center (BSC)), donde se ha estudiado la interacción de prodigiosina con AKT. Se ha observado que dicha interacción es posible por un dominio de unión a ATP que posee AKT. Esto podría explicar el efecto del tratamiento con prodigiosina sobre los niveles de fosforilación de AKT, ya que podría evitar físicamente que pudiese ser fosforilada o provocar su desfosforilación. La capacidad de interaccionar con AKT no ha sido atribuida a otras prodigininas hasta la fecha, pero sí se ha descrito que un análogo de la undecilprodigiosina, PNU156804, bloquea la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Mortellaro A, 1999), característica compartida con AT514. En el caso de prodigiosina, hemos identificado a la proteína quinasa GSK-3 $\beta$  como la proteína bajo la regulación de AKT clave en el proceso apoptótico inducido por esta droga. Ésta es una quinasa regulada de forma negativa por AKT cuya sobreexpresión induce apoptosis, mientras que la expresión de un dominante negativo de GSK-3 $\beta$  previene este proceso tras la inhibición de PI3K en células de cáncer de próstata (Pap M y Cooper GM, 1998). La desfosforilación de AKT provocada por prodigiosina permitió la activación de GSK-3 $\beta$ , y con ello, la inducción de genes regulados por esta quinasa. Entre ellos encontramos el gen proapoptótico llamado NAG-1 y los receptores de muerte DR-4 y -5. El bloqueo de la actividad de GSK-3 $\beta$  mediante un inhibidor específico previo al tratamiento con prodigiosina, mostró una marcada disminución en la apoptosis inducida por esta droga. Esto sugiere un papel crucial de GSK-3 $\beta$  en este proceso. Además, la expresión inducida por prodigiosina tanto de NAG-1 como de los genes DR-4 y -5 también disminuyó significativamente al inhibir GSK-3 $\beta$ . Estos receptores de membrana activan la caspasa iniciadora 8, dando lugar al proceso de apoptosis activado por la vía extrínseca (Sheridan JP, et al., 1997). En células de cáncer gástrico transfectadas con NAG-1 se ha visto como la expresión de esta proteína provocaba apoptosis y aumentaba significativamente la expresión de DR-4 y DR-5, sugiriendo que NAG-1 estaba regulando la expresión de estos receptores de muerte. Sin embargo, si la activación de GSK-3 $\beta$  que provoca prodigiosina en células de cáncer de mama hace que se expresen DR-4 y -5 gracias a la acción de NAG-1 quedaría por ser demostrado. Por todo ello, podemos afirmar que

prodigiosina es un potencial candidato a agente quimioterapéutico especialmente para tumores que tengan constitutivamente activa la vía de señalización PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$ .

### Rotura del ADN (Figura 31, 2)

Las prodigininas son moléculas muy hidrófobas y podrían difundir libremente a través de las membranas e interactuar con el ADN, provocando roturas en la doble cadena de éste (Pérez-Tomás R, et al., 2003). Tras el daño en el ADN, la célula desencadena un programa de parada de ciclo para iniciar su reparación, y si el daño es muy grave y no es posible repararlo, la célula puede activar el programa apoptótico. Se ha visto que las prodigininas, y en especial prodigiosina, pueden intercalarse en el ADN, preferentemente a las regiones AT del surco menor del ADN (Melvin MS, et al., 1999), y unirse a Cu (II) para facilitar la rotura de la doble hélice de ADN (Melvin MS, et al., 2002). Los agentes intercalantes son un grupo de compuestos que se unen a las bases nitrogenadas del ADN y de esta forma interrumpen la transcripción, replicación y la actividad de unas enzimas reparadoras del ADN llamadas topoisomerasas, como es el caso de agentes anticancerosos como daunorrubicina y WP631 (Portugal J, et al., 2001). Moléculas aromáticas planares son capaces de interactuar con la doble hélice inhibiendo la actividad de las topoisomerasas, transformándolas a su vez en agentes letales para la célula (Turner PR y Denny WA, 1996). Recientemente se ha descrito cómo prodigiosina es capaz de interactuar con el ADN inhibiendo la actividad de las topoisomerasas I y II (Montaner B, et al., 2005). Este mecanismo de acción es el que poseen muchos de los fármacos anticancerosos más eficaces que se usan actualmente en la práctica clínica (Hurley LH, 2002). Un dato que podría parecer estar en desacuerdo con este mecanismo de acción es la distribución que describimos de prodigiosina una vez internalizada en células de neuroblastoma. Observamos que su localización es citoplasmática, sobretudo mitocondrial y no se observa en núcleo. Este dato no tiene porqué ser incompatible con que prodigiosina ocasione daño en el ADN, ya que puede ser que la concentración que haya dentro de núcleo no sea suficiente para poder ser detectada por esta técnica. También sería posible que la membrana nuclear estuviera impidiendo el paso de prodigiosina hacia el núcleo. Entonces, el acceso de prodigiosina al ADN para provocar el daño en él sería posible durante el proceso mitótico, ya que es cuando la membrana nuclear se encuentra desintegrada. Por último, existen algunos depsipéptidos, como ET-743, que se unen al surco menor del ADN (Rinehart KL, 2000) pero no se han realizado estudios con AT514 para comprobar si comparte esta capacidad con ET-743.

### Variación del pH intracelular (Figura 31, 3)

La gran hidrofobicidad de las prodigininas podría permitir que la molécula fuera incorporada en la bicapa lipídica de la membrana plasmática, donde por endocitosis podría alcanzar el endosoma o algún otro compartimento ácido. Una vez allí podría desacoplar las bombas ATPasas e inducir la neutralización de este compartimento, provocando a su vez la acidificación del citoplasma y en algunos casos muerte por apoptosis (Pérez-Tomás R, et al., 2003). Respecto al mecanismo de entrada de las prodigininas hipotetizado en ese trabajo, hemos realizado estudios muy recientes que muestran que prodigiosina no es internalizada mediante endocitosis, sino que entra por difusión facilitada acumulándose igualmente en los compartimentos ácidos (comunicación personal). Se ha descrito cómo algunos miembros de la familia son capaces de modular el pH intracelular rompiendo reversiblemente el gradiente que existe entre varios compartimentos celulares. Éste es el caso de cicloprodigiosina hidrócloride, un protonóforo que incrementa el pH lisosomal inhibiendo la actividad de la bomba de protones vacuolar V-ATPasa sin afectar su actividad ATPasa (Lee M, et al., 1995). También prodigiosina, metacicloprodigiosina y undecilprodigiosina ejercen una actividad  $H^+/Cl^-$  simporte y desacoplan la bomba V-ATPasa (Ohkuma S, et al., 1998). El pKa de prodigiosina es 7,2 (Rizzo et al., 1998), y existen en equilibrio la forma protonada y la no protonada, desplazándose hacia la forma protonada a pH inferior a 7,2. Estas formas tienen también diferentes conformaciones, una lineal llamada  $\alpha$ , favorecida a  $pH < 7$ , y una plegada llamada  $\beta$ , favorecida a  $pH > 7$  (Manderville RA, 2001). La carga de prodigiosina, así como su conformación, deben ser determinantes para su distribución y acumulación subcelular. El pH citosólico en las células cancerosas tiende a ser neutro o ligeramente alcalino (Yamamoto C, et al., 1999), por lo que prodigiosina se encuentra prácticamente en su pKa. En los compartimentos ácidos como los lisosomas o el espacio intermembranal de la mitocondria, la forma mayoritaria de prodigiosina debe ser la protonada. El cambio de conformación que sufre prodigiosina al entrar a los compartimentos ácidos podría dificultar su salida, y así podría ejercer su actividad  $H^+/Cl^-$  simporte provocando cambios en el pH intracelular. Esto se corroboró en un estudio del efecto de prodigiosina sobre la modulación del pH en células de cáncer de colon, donde se mostró que ésta era capaz de modular el pH intracelular mediante la alcalinización de los lisosomas (Castillo-Ávila W, et al., 2005). En él también se demuestra cómo la variación de pH intracelular a las dosis utilizadas es reversible y no es suficiente para inducir el proceso apoptótico, a diferencia de lo descrito con cicloprodigiosina hidrócloride (Yamamoto C, et al., 2001), aunque a dosis más elevadas de prodigiosina podría contribuir a él.

Por otro lado, la acción de serratomolide sobre el movimiento de iones en bicapas lipídicas y biomembranas fue estudiado hace algunos años, observando un incremento significativo en la

tasa de movimiento de iones  $K^+$  y  $H^+$  (Deol BS, et al., 1973). De todas formas, el mecanismo por el cual AT514 provocaba dicho efecto quedaría por ser elucidado, así como si pudiera tener relación alguna con su propiedad proapoptótica.

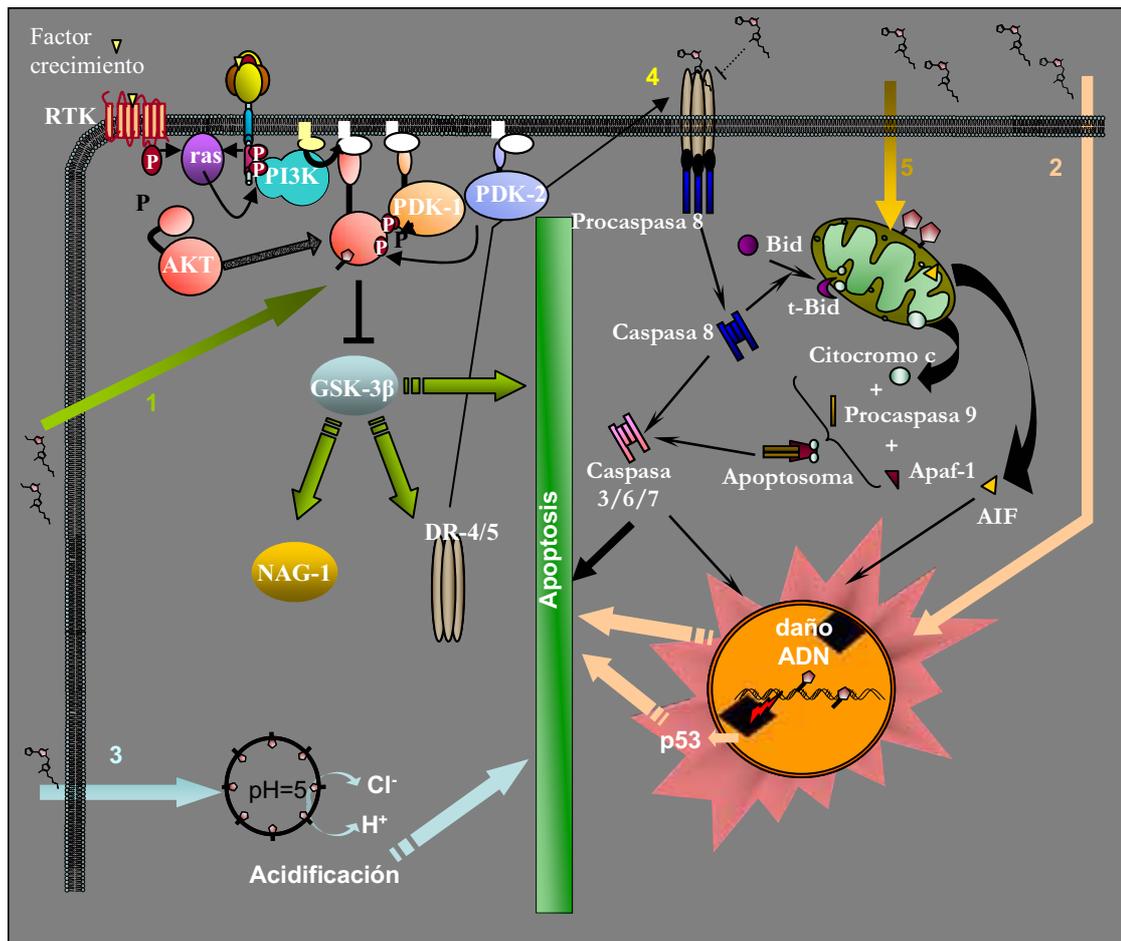
#### Interacción directa o indirecta con receptores de membrana (Figura 31, 4)

La molécula tripirrólica podría inhibir/activar, de forma directa (no se ha descrito ningún receptor específico de estas moléculas hasta el momento) o de forma indirecta, receptores de membrana citoplasmática (Pérez-Tomás R, et al., 2003). Algunas prodigininas bloquean o activan receptores que regulan rutas moleculares clave en la regulación del ciclo celular o la apoptosis de las células. Así, PNU156804, un derivado de undecilprodigiosina, inhibe la proliferación en linfocitos T bloqueando la señal inducida vía el receptor de interleukina-2, lo cual provoca la inhibición de la quinasa JAK-3 asociada a dicho receptor (Stepkowski SM, et al., 2002). En este trabajo describimos cómo el tratamiento con prodigiosina modula la expresión y/o actividad de receptores de membrana. Así, prodigiosina induce la expresión de los receptores de muerte DR-4 y -5 en el modelo de cáncer de mama y activa la caspasa-8. La activación de esta caspasa ya se había descrito en una línea celular de origen hematopoyético (Montaner B y Pérez-Tomás R, 2002). Ésta es la molécula iniciadora del proceso de apoptosis por la vía de señalización extrínseca y está regulada de forma directa por receptores de muerte situados en la membrana plasmática. Este mecanismo amplifica la señal apoptótica que se origina vía mitocondrial. Otros receptores de membrana que hemos visto que intervienen en el mecanismo de acción de prodigiosina son los de la vía del TGF- $\beta$ , actividad de los cuales hemos descrito como necesaria para que prodigiosina pueda ejercer su efecto citostático en células de cáncer de mama. Esta ruta molecular se discute con detalle en el siguiente apartado dedicado a los mecanismos de parada de la proliferación celular. De todas formas, esta vía también ha sido descrita como reguladora de moléculas inductoras de la apoptosis. Este es el caso de TIEG, un factor de transcripción regulado por la vía de TGF- $\beta$  capaz de inducir apoptosis en células epiteliales (Chaloux E, et al., 1999). Por lo tanto, esta vía también podría estar participando en el proceso apoptótico observado tras el tratamiento de apoptosis.

#### Interacción con la membrana externa mitocondrial (Figura 31, 5)

Las prodigininas podrían difundir libremente a través de las membranas plasmáticas, interactuar con la membrana externa mitocondrial desacoplando la  $F_0-F_1$ -ATPasa y provocando la salida de moléculas apoptogénicas, como por ejemplo el citocromo c, lo cual desencadenaría el proceso apoptótico (Pérez-Tomás R, et al., 2003). Prodigiosina, metacicloprodigiosina y undecilprodigiosina desacoplan la bomba  $F_0-F_1$ -ATPasa mitocondrial

ejerciendo la función de  $H^+/Cl^-$  simporte (Konno H, et al., 1998) alterando así el pH intracelular. En un estudio realizado en colaboración con el grupo de Dr. Ambrosio, hemos descrito cómo prodigiosina, tras su entrada en la célula, se acumula especialmente en la mitocondria, provocando un efecto desacoplador de la cadena respiratoria y de la actividad ATPasa en células de neuroblastoma. Como resultado, la producción de ATP se ve disminuida sin alterar la tasa de consumo de oxígeno. Esto podría ser debido a la habilidad que tiene prodigiosina para atrapar protones una vez se encuentra en compartimentos ácidos, aumentando el pH del compartimento y cambiando de conformación, lo cual evitaría su salida.



**Figura 31.** Esquema de los posibles mecanismos de acción de prodigiosina para la inducción de apoptosis (Modificado de Pérez-Tomás R, et al., 2003).

### Otros mecanismos moleculares activados en respuesta al estímulo citotóxico

Tras la exposición de una célula a un agente químico se ponen en marcha una serie de mecanismos básicos de defensa, como la activación de sistemas de detoxificación, mecanismos

de reparación del daño en ADN, etc...Las enzimas detoxificantes protegen de los daños que pueden causar una gran variedad de agentes xenobióticos y toxinas endógenas. Prodigiosina ha mostrado, mediante análisis proteómico, que induce la sobreexpresión de la proteína glutatión-S-transferasa (GST) M3 en células de cáncer de mama con fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. Esta proteína es una enzima detoxificante involucrada en el metabolismo de drogas y en protección celular (Frova C, 2006). El incremento en la expresión de determinadas isoenzimas de la GST se ha relacionado con la resistencia a ciertos agentes alquilantes y otra clase de drogas anticancerosas en células resistentes a diferentes fármacos (Cullen KJ, et al., 2003; Harbottle A, et al., 2001). Además, la sobreexpresión de GST puede operar en sinergia con transportadores de membrana como las MRPs, confiriendo mayor resistencia a diversos carcinógenos, mutágenos y drogas anticancerosas. La simple sobreexpresión de GST en células de melanoma confiere resistencia a clorambucilo, mientras que la sobreexpresión de GST junto con MRP1 protege a las células de del efecto tóxico de la vincristina (Depeille P, et al., 2004). El incremento de la expresión de GST observado en las células de mama resistentes a mitoxantrona, MCF-7 MR, puede estar contribuyendo a la menor sensibilidad que tienen al tratamiento con prodigiosina comparada con su línea parental. De todos modos, no podemos descartar que sea simplemente un mecanismo de defensa activado a consecuencia de la exposición al agente citotóxico.

Prodigiosina provoca daño en el ADN, por lo tanto es de esperar que la célula ponga en marcha mecanismos de reparación de dicho daño. La proteína ribosomal P0 es una proteína ácida que mantiene unido el heterodímero (P1/P2) al ribosoma, formando una estructura lateral protuberante (Tchorzewski M, et al., 2003). Dicha proteína se ha visto sobreexpresada, además de por prodigiosina, por algunos agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN, en diferentes líneas celulares (Grabowski DT, et al., 1992). En estos estudios, asocian el incremento de la expresión de la proteína ribosomal P0 al proceso de reparación del ADN. Esto podría explicar su sobreexpresión en respuesta a prodigiosina. Por otro lado, esta proteína también se ha asociado a procesos de señalización de células apoptóticas, ya que migra hasta la superficie celular de éstas sirviendo así de molécula de reconocimiento para las células fagocíticas que la habrán de engullir (Nishida J, et al., 2002). Esta sería otra posible función de la proteína P0 en respuesta al tratamiento con prodigiosina. Ello favorecería la rápida eliminación de las células cancerosas sin provocar reacción inflamatoria, propiedad deseada en un agente quimioterapéutico.

También hemos observado la aparición o el aumento en la expresión de diversas citoqueratinas tras la exposición de células de cáncer de mama a prodigiosina. Éstas son proteínas estructurales muy importantes en las células epiteliales, que pueden ser reguladas por

proteólisis o fosforilación, variando así su función en diversos procesos celulares (Omary MB, 2006). Forman parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto y se expresan en diferentes combinaciones dependiendo del tipo epitelial y del grado de diferenciación (Steinert PM y Roop DR, 1988). Durante el proceso de apoptosis, estas proteínas del citoesqueleto son reconocidas y proteolizadas por las caspasas, llevando a cabo cambios dramáticos en la estructura celular (Oshima RG, 2002). Se ha visto como citoqueratina-18, pero no citoqueratina-8, es proteolizada por la caspasa-6 durante la apoptosis inducida por luz UV (Caulin C, et al., 1997). Estos resultados coinciden con los que hemos obtenido nosotros tras el tratamiento con prodigiosina de células de mama. Observamos la aparición de un nuevo fragmento de 26 kDa, el cual identificamos como la citoqueratina-18 proteolizada, y otro de 28 kDa que resultó ser un la citoqueratina-19 procesada. Sin embargo, la citoqueratina-8 se mostró resistente a la proteólisis tras el tratamiento con prodigiosina. El procesamiento de citoqueratina-19 también se ha visto con anterioridad durante la apoptosis sufrida por células de cáncer de colon expuestas al inhibidor de la síntesis proteica anisomicina (Ku NO, et al., 1997). Por tanto, podemos concluir que la apoptosis inducida por prodigiosina genera fragmentos estables de las citoqueratinas de tipo I, pero no de las de tipo II, siendo unas de las proteínas responsables de los cambios estructurales provocados por prodigiosina. Estos cambios en la morfología celular tras el tratamiento con prodigiosina ya habían sido observados en células de cáncer de estómago (Díaz-Ruíz C, et al., 2001). En este trabajo se estudiaron los cambios provocados por el tratamiento de prodigiosina en el citoesqueleto de actina, observando una reorganización en los microfilamentos de actina, la cual también estaría contribuyendo a los cambios morfológicos inducidos por esta droga. Asimismo, muchos de los genes modulados por prodigiosina que obtuvimos de los experimentos de análisis de la expresión génica están también relacionados con el mantenimiento de la morfología celular. Entre ellos encontramos algunos implicados en adhesión celular (JUP, integrina  $\beta_4$ , vitronectina), proteínas del citoesqueleto (queratina-7, -8, 18) y proteínas que intervienen en movilidad celular (Rho GDI). Todo ello apunta a que prodigiosina provoca modificaciones a nivel génico y proteómico que serían las responsables de llevar a cabo los cambios morfológicos observados en las células tratadas.

Además de participar en procesos de reorganización estructural de la célula, las citoqueratinas también son liberadas por la célula siendo un buen marcador en suero para evaluar el progreso clínico de pacientes con enfermedades epiteliales (Kramer G, et al., 2004). Además, prodigiosina provoca la sobreexpresión de la citoquina NAG-1, la cual se secreta y también podría ser utilizada como marcador de la eficacia del tratamiento con prodigiosina. A su vez, esta proteína podría llegar a las células vecinas del tumor, amplificando el efecto de este agente anticanceroso.

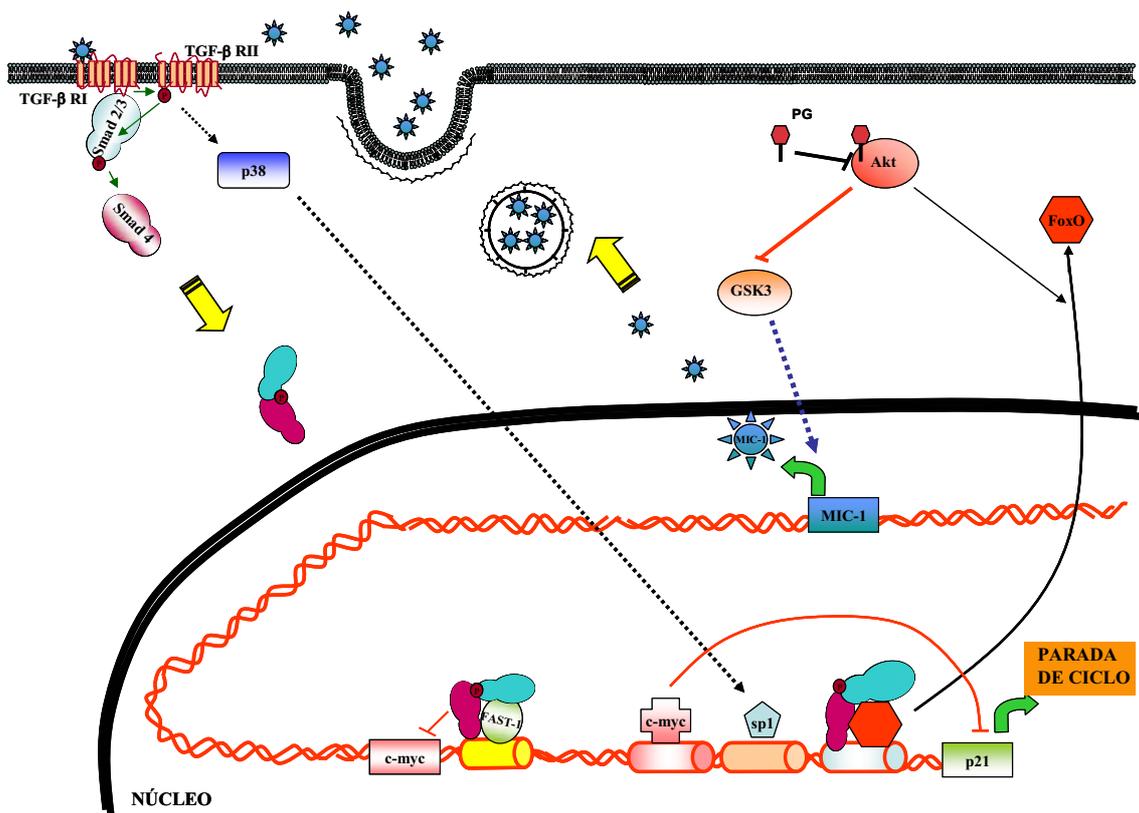
## **PARADA DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

Las células de un tumor se acumulan porque no detienen su proceso de división, bien porque tienen el control del ciclo celular alterado, o porque son resistentes a estímulos fisiológicos inductores de muerte. En ambos casos, agentes anticancerosos capaces de inducir una parada del ciclo celular son deseados, ya que provocarían la estabilización del tumor, evitando así que invadiese tejidos de órganos vitales lo cual causaría la muerte del individuo. Este es el caso tanto de AT514 como de prodigiosina, moléculas que hemos descrito que poseen un efecto citostático en determinados modelos celulares.

El tratamiento de células de cáncer de mama MCF-7 con AT514 provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase  $G_0/G_1$ , observando un marcada bajada de la población celular en fase S. Este efecto también ha sido observado tras el tratamiento de células de cáncer pancreático con otro ciclodepsipéptido, sansalvamida A, el cual inhibía el ciclo celular en la misma fase (Ujiki MB, et al., 2006). De igual modo, hemos observado como prodigiosina causa un marcado acúmulo en la fase  $G_0/G_1$  de células de cáncer de mama, aunque la mayoría de las células acaban finalmente sufriendo apoptosis. Previamente se había descrito su capacidad antiproliferativa, actuando como inmunosupresor, en células de origen hematopoyético (Han SB, et al., 2001) y se había analizado en mayor profundidad esta propiedad mediante el estudio de modificaciones sufridas en proteínas relacionadas con la regulación del ciclo celular de células Jurkat (Pérez-Tomas R y Montaner B). También hemos descrito cómo la expresión de un gran número de genes relacionados con el control del ciclo celular es modificada tras el tratamiento con prodigiosina (Soto-Cerrato V, et al., 2007). Entre los que aumentan su expresión cabe destacar al inhibidor de quinasas p21 o la interleucina  $1\beta$  y entre los que bajan su expresión encontramos al oncogen c-myc, importante inhibidor de la parada de ciclo celular. La propiedad inmunosupresora de prodigiosina está compartida con otros miembros de la familia, como es el caso de undecilprodigiosina, la cual inhibe específicamente la proliferación de linfocitos T *in vitro* e *in vivo* (Songia S, et al., 1997; Tsuji RF, et al., 1992). También se ha descrito cómo su análogo, PNU156804, inhibe de forma eficaz la proliferación de linfocitos T y B, evitando el rechazo en transplantes humanos (Stepkowski SM, et al., 2002).

La proteína p21 es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas el cual se sobreexpresa en respuesta a señales de estrés, como la exposición a agentes químicos que dañan el ADN, desencadenando la parada del ciclo celular (El-Deiry WS, et al., 1994). Hemos visto cómo prodigiosina causa parada del ciclo celular de células de mama a la vez que induce de forma significativa la expresión de p21, sugiriendo un papel de p21 en la inducción de dicho proceso. Además, p21 se expresa de forma independiente a la actividad de p53 tras el tratamiento con

prodigiosina, ventaja terapéutica frente a otros quimioterapéuticos que necesitan de la actividad de dicha proteína (Royds JA y Iacopetta B, 2006). Otras proteínas que pueden inducir la expresión de p21 son los smads, factores de transcripción activados por la vía de la citoquina TGF- $\beta$  (Pardali K, et al., 2000). La activación del receptor tipo I y la fosforilación de smad-2 se han descrito como procesos necesarios, aunque no suficientes, para la inducción de p21 tras el tratamiento con prodigiosina. Por lo tanto, otras proteínas deben interactuar con el promotor de p21 para provocar su expresión (Figura 32). Distintas rutas de señalización, independientes de smads, se han visto implicadas tras la activación de los receptores de TGF- $\beta$ , incluyendo algunas vías de MAPK quinasas (Derynck R, et al., 2003). En concreto, la MAPK quinasa p38 es activada en respuesta a señales de estrés y media respuestas celulares como la inducción de apoptosis o la maduración de algunos tipos celulares (Tibbles LA y Woodgett JR, 1999). El tratamiento con prodigiosina provoca, en células Jurkat, la activación de esta quinasa tras 15 minutos de exposición (Montaner B y Pérez-Tomas R, 2002). Además, se ha descrito recientemente que el miembro de la familia de TGF- $\beta$  NAG-1, el cual es inducido por prodigiosina, también puede activar rutas de señalización de las MAPK (Nazarova N, et al., 2004). Por lo tanto, NAG-1 podría estar activando a p38 a través de los receptores de TGF- $\beta$  y con ello podría provocar la transcripción de p21 mediada por sp1 (Moon SK, et al., 2006), en respuesta al tratamiento con prodigiosina. Por último, otro mecanismo que podría explicar la inducción de p21 en respuesta a prodigiosina, sería la participación del factor de transcripción FoxO. Prodigiosina causa activación de la quinasa GSK-3 $\beta$  gracias a la desfosforilación de AKT. Esta quinasa es un regulador negativo de la actividad transcripcional de FoxO, ya que provoca su salida del núcleo (Seoane J et al., 2004). Al desfosforilarse AKT, FoxO podría entrar en el núcleo y colaborar con los smads para inducir la transcripción de p21.



**Figura 32.** Esquema de los posibles mecanismos de acción de prodigiosina para la inducción de parada del ciclo celular.

### POSIBLES MECANISMOS DE MAYOR SELECTIVIDAD POR LAS CÉLULAS CANCEROSAS

Hemos visto que prodigiosina y AT514 muestran una ligera selectividad por las células cancerosas a la hora de ejercer sus actividades citostáticas y citotóxicas. Una posible explicación sería las diferencias presentes en la vía de supervivencia regulada por la quinasa AKT entre células no cancerosas y cancerosas. Éstas últimas expresan más cantidad de esta proteína y, en muchas ocasiones, tienen activada de forma constitutiva esta vía de señalización (McCubrey JA, et al., 2006). La activación de esta proteína induce señales de supervivencia y además regula, de forma positiva, el metabolismo celular (Plas DR y Thompson CB, 2005). Como hemos visto, ambas sustancias tienen como mecanismo de acción la interacción con esta ruta celular. Esto podría hacer que las células cancerosas fueran más susceptibles a sufrir los efectos de AT514 y prodigiosina, ya que éstas encuentran mayor cantidad de su diana molecular en estas células. Además, la activación constitutiva de esta vía hace que estas células sean más agresivas, pero a

su vez, las hace vulnerables ya que tienen una gran dependencia de ella (Cheng JQ, et al., 2005). Por lo tanto, tras la inhibición de esta vía serán más propicias a sufrir un proceso de muerte celular que las células no cancerosas, las cuales no dependen de esta vía para sobrevivir.

Por otro lado, nuestro grupo ha demostrado cómo prodigiosina causa rotura del ADN de forma dependiente de la concentración del ión cobre (Montaner B, et al., 2005). Los iones metálicos juegan un papel importante en los sistemas biológicos, ya que sin su presencia muchas reacciones bioquímicas no tendrían lugar. Éste es el caso del ión cobre, el cual por su capacidad de movilización y actividad redox, se ha relacionado con fenómenos de rotura de ADN (Theophanides T y Anastassopoulou J, 2002). En tejido de mama no canceroso, la concentración media de cobre (II) es 23  $\mu\text{M}$  (1,47 ppm), mientras que en tejido canceroso la concentración media incrementa a 80  $\mu\text{M}$  (5,12 ppm). Asimismo, el índice de  $\text{Cu}^{2+}$  -  $\text{Zn}^{2+}$  es también considerablemente superior en pacientes con cáncer (Poo JL, et al., 2003). Estas observaciones sugieren que prodigiosina podría promover el daño al ADN de forma más eficiente en células cancerosas, ya que tienen más cantidad de Cu (II) y prodigiosina es más eficaz a altas concentraciones de este ión (Montaner B, et al., 2005), explicando así, en parte, su mayor citotoxicidad.