



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Programa de doctorat de BIOMEDICINA
Bienni 2004-2006

Caracterització de la mort cel·lular induïda per prodigiosina i tricostatina A en línies de neuroblastoma humà

**Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Santiago
Ambrosio Viale a la Unitat de Bioquímica del Departament de
Ciències Fisiològiques II de la Universitat de Barcelona**

Roser Francisco Bordas

Dr. Santiago Ambrosio Viale

Memòria presentada per Roser Francisco Bordas
per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

*Los sueños son el norte de todo el mundo. Si
los cumplés tendrás que ir al sur.*

El mundo amarillo

Albert Espinosa

Als pares, Andreu i M^aDolors,
a la meva germana Mercè,
i als avis Ricardo, Lola,
Andreu i Montserrat

Abreviatures

3MA	3 -metiladenina
AMPK	AMP- Activated Kinase
ATGs	Autophagy-related gens
BCL-2-B	B cell Leukemia / Lymphoma-2
cdk	Quinasa dependent de ciclins
CED	Cell death abnormality
CisPt	Cisplatí
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CVT	Cytosol -to -vacuole - targeting
DAPK -1	Death-associated protein Kinase 1
DD	Domini de mort
DED	Domini efectors de mort
DISC	Death inducing signalling complex
DRAM	Damage - regulated modulator of autophagy
F-ATPases	Bombes de protons mitochondrials
FLIP	Fllice inhibitory proteïns
H3	Histona 3
H4	Histona 4
HAT	Histona acetilases
HDACs	Histona desacetilases
HDIs	Inhibidors de histona desacetilases
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
INCP	International Neuroblastoma pathology Commite
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
INRGSS	International Neuroblastoma Risk Group Staging System
INSS	International Neuroblastoma Staging System
JNK	c -Ju N-Terminal Kinase
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
NF-KB	Factor de neurosis tumoral -alfa
OLIG	Oligomicina
PARP	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa
PAS	Fosfatidil -inosital trifosfort
PCD	Programa de mort cel·lular
PG	Prodigiosina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 -quinasa
pRB	Proteïna del retinoblastoma
Rapa	Rapamicina
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results Program

TA	Taronja d'acridina
TSC1	Tuberous sclerosis complex 1
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
V-ATPases	bombes de protons vacuolars
INSS	International Neuroblastoma Staging System
JNK	c -Ju N-Terminal Kinase
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
NF-KB	Factor de neurosis tumoral -alfa
OLIG	Oligomicina
PARP	Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa
PAS	Fosfatidil -inosital trifosfort
PCD	Programa de mort celular
PG	Prodigiosina
PI3K	Fosfatidilinositol 3 -quinasa
pRB	Proteïna del retinoblastoma
Rapa	Rapamicina
SEER	Survillance, Epidemiology and End Results Program
TA	Taronja d'acridina
TSC1	Tuberous sclerosis complex 1
TSC2	Tuberous sclerosis complex 2
V-ATPases	bombes de protons vacuolars

Índex de continguts

Introducció

Programes de mort cel·lular.....	-3-
Apoptosi.....	-4-
Autofàgia.....	-16-
El neuroblastoma.....	-33-
Les prodigionines i la prodigiosina.....	-52-
Inhibidors de les histona desacetilases.....	-66-

Objectius.....	-89-
-----------------------	-------------

Material i mètodes

Tècniques de cultiu cel·lular.....	-93-
Tècniques d'anàlisi de proteïnes.....	-98-
Tècniques de biologia molecular.....	-105-
Tècniques histològiques.....	-109-
Determinacions bioquímiques.....	-112-

Resultats

Capítol I . Caracterització de la mort cel·lular induïda per prodigiosina

en línies de neuroblastoma humà

Introducció.....	-117-
Resultats.....	-118-
La PG disminueix la viabilitat cel·lular en cèl·lules de neuroblastoma humà.....	-118-
Aturada del cicle cel·lular després del tractament amb PG.....	-121-
En la mort cel·lular induïda per PG s'activen marcadors apoptòtics.....	-126-
Activació tardana de la via apoptòtica extrínseca en la mort induïda per PG.....	-130-
PG inhibeix l'activació de NF-κB.....	-131-
Distribució intracel·lular de la PG.....	-133-
PG indueix acidificació citoplasmàtica.....	-134-
Acumulació mitocondrial de PG en cèl·lules de neuroblastoma humà.....	-135-
La PG produeix afectació de la cadena respiratòria en cèl·lules de neuroblastoma.....	-138-
PG inhibeix la síntesi d'ATP.....	-139-
Discussió.....	-141-

**Capítol 2. Caracterització de la mort cel·lular induïda per tricostatina A
en línies de neuroblastoma humà**

Introducció.....	-159-
Resultats.....	-161-
El TSA afecta la viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma.....	-161-
El TSA disminueix el creixement cel·lular.....	-163-
El TSA induïx apoptosi en línies cel·lulars de neuroblastoma.....	-165-
Caracterització de la mort cel·lular induïda per TSA.....	-167-
El TSA induïx autofàgia cel·lular.....	-171-
L'activació de l'autofàgia induïda pel TSA no té la mateixa finalitat en totes les cèl·lules de neuroblastoma.....	-176-
El HDI TSA induïx un retard en la transició G2/M en cèl·lules de Neuroblastoma.....	-178-
Activació de la via supressora de tumors del RB.....	-179-
Afectació de la viabilitat cel·lular per altres HDIs.....	-180-
Discussió.....	-183-
Discussió general.....	-199-
Conclusions.....	-207-
Annex. Obtenció de models animals de neuroblastoma.....	-211-
Bibliografia.....	-223-
Publicacions	-230-

Introducció

Programes de mort cel·lular

L'equilibri entre la divisió cel·lular i la mort cel·lular és de vital importància per al desenvolupament i manteniment d'organismes multicel·lulars. Desordres en qualsevol d'aquests dos processos tenen conseqüències que poden conduir a la pertorbació de l'embriogènesi, a malalties neurodegeneratives, o al desenvolupament del càncer. Per aquest motiu, l'equilibri entre la vida i la mort està altament controlat, i els elements erronis poden ser efectivament eliminats per un procés anomenat programa de mort cel·lular (PCD). En les darreres dècades la PCD ha estat sinònim d'apoptosi (PCD I), un programa de mort cel·lular controlat i inherent a les cèl·lules a través del qual aquestes s'autoeliminen. La seva parella equivalent, la necrosi, és una forma més caòtica de mort cel·lular resultat de circumstàncies externes a la cèl·lula. Recentment però, ha esdevingut evident que la clàssica dicotomia entre el procés genèticament regulat apoptosi, vers el procés no regulat necrosi, ha quedat obsolet (Duprez et al., 2009). La PCD és un procés molt més dinàmic del que es pensava, en el qual, en funció d'un context particular (ex. estímuls de mort, tipus cel·lular o de teixit, condicions de l'entorn), la cèl·lula pot decidir quin mecanisme utilitzar per a morir, havent-se descrit diversos processos alternatius de PCD (Bras et al., 2005; Broker et al., 2005; Duprez et al., 2009). Les diferents vies de PCD operen en paral·lel o seqüencialment, amb múltiples punts d'interconnexió entre elles, i totes tenen en comú que són executades per processos cel·lulars actius, que poden ser interceptats mitjançant la interferència de la senyalització intracel·lular. Característica que els diferencia de la necrosi, una mort descrita com a accidental.

A continuació revisarem els dos tipus principals de mort cel·lular, l'apoptosi (PCD I) i l'autofàgia (PCD II).

Apoptosi

L'apoptosi és un procés fisiològic de mort cel·lular, essencial pel desenvolupament embrionari i l'homeòstasi tissular dels organismes pluricel·lulars (Kerr et al., 1972). A través d'aquest procés s'eliminen de manera controlada les cèl·lules lesionades, velles, ectòpiques, i potencialment perilloses. Aquest via de mort programada està conservada evolutivament i respón tant a estímuls fisiològics com patològics (Danial and Korsmeyer, 2004). En condicions d'homeòstasi en un organisme adult, cada duplicació cel·lular ha de ser compensada per l'eliminació d'una altra cèl·lula. En el cos humà aquest procés es dona milions de vegades per segon, i està àmpliament regulat per senyals tant positives com negatives. Però a vegades es desregula, donant lloc a l'aparició de patologies (Figura 1). L'excés d'apoptosi pot donar lloc a malalties neurodegeneratives, immunodeficiències i infertilitat, mentre que la resistència o la disminució de l'apoptosi pot donar lloc a malalties autoimmunes o a l'aparició de càncer (Danial and Korsmeyer, 2004).

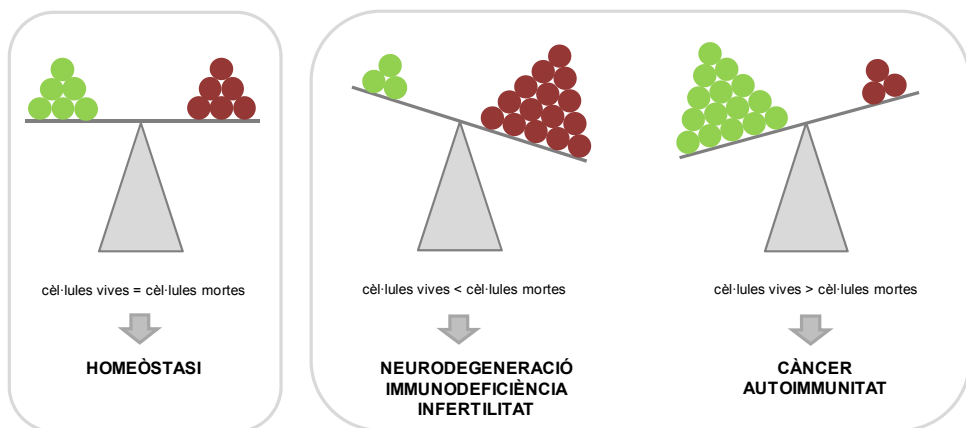


Figura 1. L'apoptosi manté l'homeòstasi en els teixits equilibrant la proliferació i la mort de les cèl·lules. La desregulació en l'apoptosi provoca un desequilibri, el que resulta en patologies per pèrdua prematura de cèl·lules o excés de supervivència cel·lular. Adaptat de Walensky (2006).

Si bé l'alteració de l'apoptosi no és l'únic element necessari pel desenvolupament d'un tumor, la resistència a la seva inducció és una característica comú en tots els càncers (Figura 2) (Hanahan and Weinberg, 2000; Spurgers et al., 2006). A més, la majoria dels quimioterapèutics actuals utilitzen els mecanismes d'inducció d'apoptosi per la seva acció antitumoral (Blagosklonny, 2005).

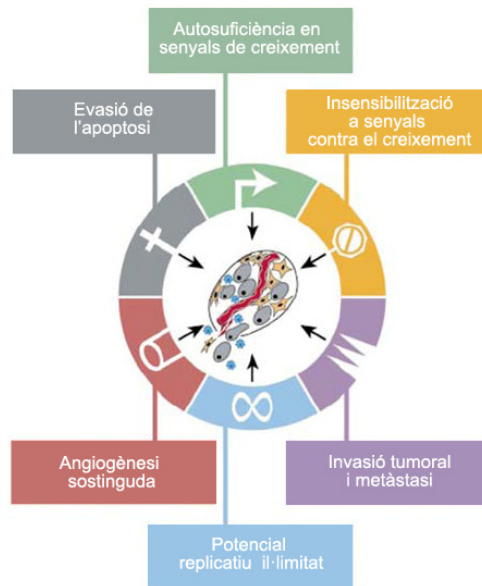


Figura 2. Capacitats adquirides en càncer. Hanahan i Weinberg van descriure les sis característiques distintives que s'acumulen durant el procés tumoral. Els mecanismes i l'ordre cronològic d'aparició d'aquestes característiques poden variar segons el tipus o subtipus de càncer. A més, en alguns casos una lesió genètica en particular pot conferir diverses capacitats simultàniament, reduint el nombre de passos necessaris per completar la generació del tumor. L'adquisició de resistència a l'apoptosi és un esdeveniment comú en la tumorigènesi. Modificat de Hanahan i Weinberg (2000).

Durant el procés apoptòtic, la morfologia cel·lular s'altera (Figura 3). En el nucli, la cromatina es condensa, els nuclèols es desintegren i es redueix la mida del nucli. També es redueix el volum total de la cèl·lula, que es torna més densa. Els orgànuls es condensen i el reticle endoplasmàtic es dilata, però els mitocondris es mantenen morfològicament intactes. En les etapes finals del procés, el nucli i el citoplasma es fragmenten i s'encapsulen en vesícules envoltades de membrana, formant els cossos apoptòtics. En el procés d'apoptosi, a diferència de la necrosi, la membrana plasmàtica es manté íntegra durant tot el procés, evitant el vessament del material citoplasmàtic al espai intercel·lular. Així s'assegura un procés de mort cel·lular sense inflamació. L'apoptosi finalitza amb el reconeixement i fagocitosi dels cossos apoptòtics pels macròfags (Rodenburg et al., 2000).

De manera paral·lela a aquests canvis morfològics, la cèl·lula apoptòtica experimenta una sèrie de canvis bioquímics. Es produeix una pèrdua de potencial de membrana mitocondrial i es perd l'asimetria de la membrana plasmàtica. La fosfatidilserina, un fosfolípid que en condicions

normals es troba exclusivament a la cara interna de la bicapa lipídica, sofreix l'anomenat “*Flip-flop*”, quedant exposat també en la cara externa. Aquest és un esdeveniment primerenc (Fadok et al., 1992) i forma part de les senyals que permeten als macròfags reconèixer i fagocitar les cèl·lules apoptòtiques *in vivo* (Fadok et al., 2000; Savill and Fadok, 2000). A més, s'activen endonucleases que tallen l'ADN genòmic pels espais nucleosomals generant fragments d'ADN múltiples de 180 parells de bases (Danial and Korsmeyer, 2004; Nagata, 2000; Wyllie et al., 1980). Aquests canvis bioquímics s'utilitzen com marcadors de les diferents etapes de l'apoptosi.

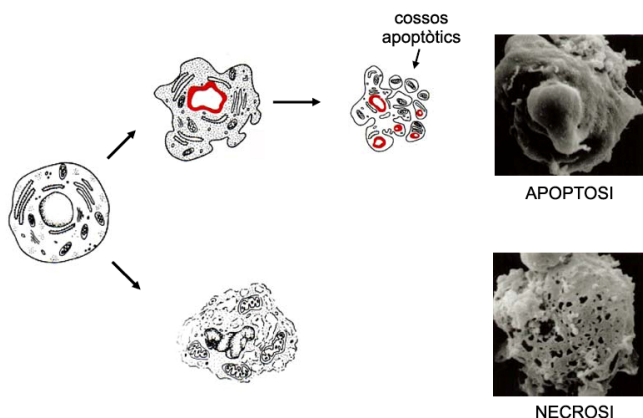


Figura 3. Diferències morfològiques entre cèl·lules apoptòtiques i necròtiques. L'apoptosi és un procés de mort cel·lular regulat per evitar que el contingut intracel·lular es vessi a l'exterior, evitant la inflamació. En les imatges de microscopia electrònica s'observa, a dalt, la integritat de la membrana citoplasmàtica i l'aparició de cossos apoptòtics en el procés d'apoptosi, i a baix l'aparició de lesions i la ruptura de la membrana citoplasmàtica durant la necrosi (Modificat de www.cyto.purdue.edu).

L'apoptosi es troba bloquejada en les cèl·lules viables. Quan reben senyals inductores d'apoptosi, tant fisiològiques (falta de factors de creixement o atacs immunològics per interacció lligand-receptor) com externes (drogues quimioterapèutiques, estrès osmòtic, químic o tèrmic, i radiacions ionitzants o no ionitzants), les cèl·lules inicien la maquinària d'apoptosi.

En el procés apoptòtic poden distingir-se tres fases:

1. Fase iniciadora. Els factors inductors d'apoptosi entren en contacte amb la cèl·lula i desencadenen una sèrie de respostes intracel·lulars, diferents per cada estímul, que transmeten la senyal a la maquinària apoptòtica. S'han definit tres mecanismes d'iniciació d'apoptosi: (i) per receptors de mort, (ii) per dany cel·lular (com estrès o irradiació) i (iii) per acció de les cèl·lules T citotòxiques.

2. Fase executora. Un cop integrada la resposta als estímuls, la cèl·lula pren la decisió de morir. En aquest punt, a partir del que el procés és irreversible, s'activen en forma de cascada les proteïnes efectores de l'apoptosi, les caspases, que són proteases encarregades de la destrucció cel·lular. Aquest és el punt de convergència de gairebé totes les senyals inductores d'apoptosi.

3. Fase de destrucció. L'activació de la maquinària efectora de mort fa que la cèl·lula perdi la seva integritat i presenti els canvis bioquímics i morfològics típics de l'apoptosi.

Descobriments de l'apoptosi en *C.elegans*

Inicialment, els estudis en apoptosi es van realitzar en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* (Brenner, 1974), on es va descriure com 131 de les seves 1090 cèl·lules morien de manera programada durant el seu desenvolupament (Sulston, 1976). Posteriorment, es van descobrir proteïnes CED-3 i CED-4 (*cell death abnormality*), responsables del procés apoptòtic, CED-9 que les antagonitza (Shaham, 1996), i EGL-1, que actua dissociant CED-9 de CED-4, possibilitant l'activació de CED-3, i per tant, la inducció d'apoptosi.

Els estudis realitzats en aquest model han permès definir les característiques de l'apoptosi i demostrar que aquest procés depèn de la interacció directa entre proteïnes reguladors i proteïnes efectores. El primer homòleg de les proteïnes CED trobat en animals vertebrats va ser BCL-2 (*B cell leukemia/lymphoma-2*) (Hengartner and Horvitz, 1994), una proteïna que havia estat descrita prèviament (Tsujimoto et al., 1984), que és estructuralment i funcionalment similar a CED-9, i per tant, un regulador negatiu del procés apoptòtic. Actualment, cadascun dels gens *ced* i *egl* de *C.elegans* tenen com a mínim un homòleg funcional en mamífers. L'homòleg de CED-3 són les caspases, n'hi ha 14 membres; el de CED-4 és Apaf-1; el de CED-9 són els membres de la família de BCL-2; i el de EGL-1 són els membres BH3-*only* de la família de BCL-2.

Maquinària executora del procés apoptòtic: caspases i IAPs

La maquinària executora de l'apoptosi està constituïda per una família de proteases d'aspartat i cisteïna. Aquests enzims proteolitzen proteïnes vitals per la cèl·lula, així com proteïnes que contribuiran a la destrucció cel·lular produint els canvis morfològics i bioquímics característics de l'apoptosi (Thornberry and Lazebnik, 1998). Es coneixen més de 400 substrats de les caspases, que inclouen proteïnes del citoesquelet, quinases, enzims de reparació de l'ADN i proteïnes involucrades en el tall de l'ARNm (Meier and Vossen, 2007).

Les caspases són sintetitzades en forma de zimògens o proenzims i s'activen en resposta a senyals apoptòtics. Es poden classificar en tres grups, segons la seva funcionalitat (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Així, trobem les caspases iniciadores (caspases 2, 8, 9 i 10), que són les primeres en activar-se al rebre l'estímul apoptòtic i s'activen per dimerització de les formes zimògenes mitjançant l'ajut de proteïnes adaptadores; i les caspases executores (caspases 3, 6 i 7), que per ser actives han de ser clivellades per una de les caspases iniciadores. Finalment hi ha les caspases inflammatòries, no relacionades amb l'apoptosi.

Degut a la irreversibilitat de la mort un cop s'han activat les caspases, la seva activitat està subjecta a una complexa regulació. Les proteïnes inhibidores fisiològiques de les caspases són les IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*). Els principals membres d'aquesta família són XIAP, hIAP1, hIAP2 i Survivina. Actualment, es considera que només XIAP és realment un inhibidor específic de les caspases 3, 7 i 9 (Eckelman and Salvesen, 2006), mentre que hIAP1 i hIAP2 s'unirien a Smac/DIABLO (Verhagen et al., 2000) i Omi/HtrA2 (Suzuki et al., 2001b) dues proteïnes que s'alliberen del mitocondri. Així, la funció de hIAP1 i hIAP2 seria unir-se a aquestes molècules per evitar que aquestes s'unissin a XIAP i activessin les caspases (Eckelman and Salvesen, 2006).

Vies d'apoptosi

En mamífers s'han descrit diferents vies de senyalització que porten a l'activació de caspases iniciadores diferents, però que convergeixen en les caspases efectores i que actuen a diferents nivells per al final induir apoptosi. Les principals vies d'activació de les caspases són analitzades a continuació.

Via extrínseca o de receptors de mort

La via apoptòtica de receptors de mort s'inicia per unió de lligands extracel·lulars a receptors de la superfície cel·lular (Danial and Korsmeyer, 2004). Es tracta de lligands de la superfamília del Factor de Necrosi Tumoral (TNF) com TNF α , FasL/CD95L, TWEAK i TRAIL, que s'uneixen a receptors de mort (TNFR, Fas/CD95, DR3/Apo2 i DR4/5, respectivament) induint canvis conformacionals que inicien la cascada de senyalització. A través dels anomenats dominis de mort (DD, *death domain*), aquests receptors recluten una sèrie de proteïnes adaptadores no enzimàtiques com TRADD i FADD. Aquestes proteïnes adaptadores recluten la procaspasa 8 (en humans també pot tractar-se de la procaspasa 10), per unió a dominis efectors de mort (DED), i es forma un complex anomenat DISC (*death-inducing signaling complex*). L'alta concentració de procaspasa 8 al DISC estimula l'activació per autoproteòlisi per proximitat, i així, la caspasa 8 actua sobre altres caspases i desencadena la senyal apoptòtica (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004) (Figura 4).

La via extrínseca està regulada a diferents nivells de manera que les cèl·lules puguin respondre de manera més o menys contundent a la unió de lligands als receptors de mort. Així, l'expressió de lligands i el seu transport a la membrana són processos altament regulats. A més de la regulació per part de les proteïnes XIAP, aquest via de senyalització apoptòtica poden ser inhibida per la família de FLIP (de *FLICE-inhibitory proteins*) (Deveraux et al., 1998; Irmeler et al., 1997), que actua desplaçant a la procaspasa 8 del DISC. c-FLIP_L pot ser proteolitzada per l'activitat residual de la procaspasa 8, però al no tenir activitat caspasa no s'activa la cascada proteolítica. Recentment s'han descrit nous papers per la proteòlisi de c-FLIP_L, com l'activació de NF- κ B (Budd et al., 2006; Lamkanfi et al., 2007). A més, la caspasa 8 proteolitza a Bid, i la forma proteolitzada tBid és capaç d'induir la sortida de factors mitocondrials proapoptòtics. Amb això es permet la sortida de Smac/DIABLO o de Omi/HtrA2 del mitocondri, que inhibeixen a XIAP permetent l'activació completa de la via. Així, la proteòlisi de Bid a tBid enllaça aquesta via extrínseca amb la via intrínseca o mitocondrial.

Via intrínseca o mitocondrial

La via intrínseca, en la que el mitocondri juga un paper essencial, està regulada per proteïnes de la família de BCL-2, i es desencadena en resposta a una gran varietat d'estímuls interns o externs, generalment independents de lligand, com radiacions, agents quimioterapèutics, oxidants, activació d'oncògens, virus i bacteries, falta d'unió a la matriu extracel·lular, o deprivació de citocines, neutrofines o factors de creixement (Danial and Korsmeyer, 2004).

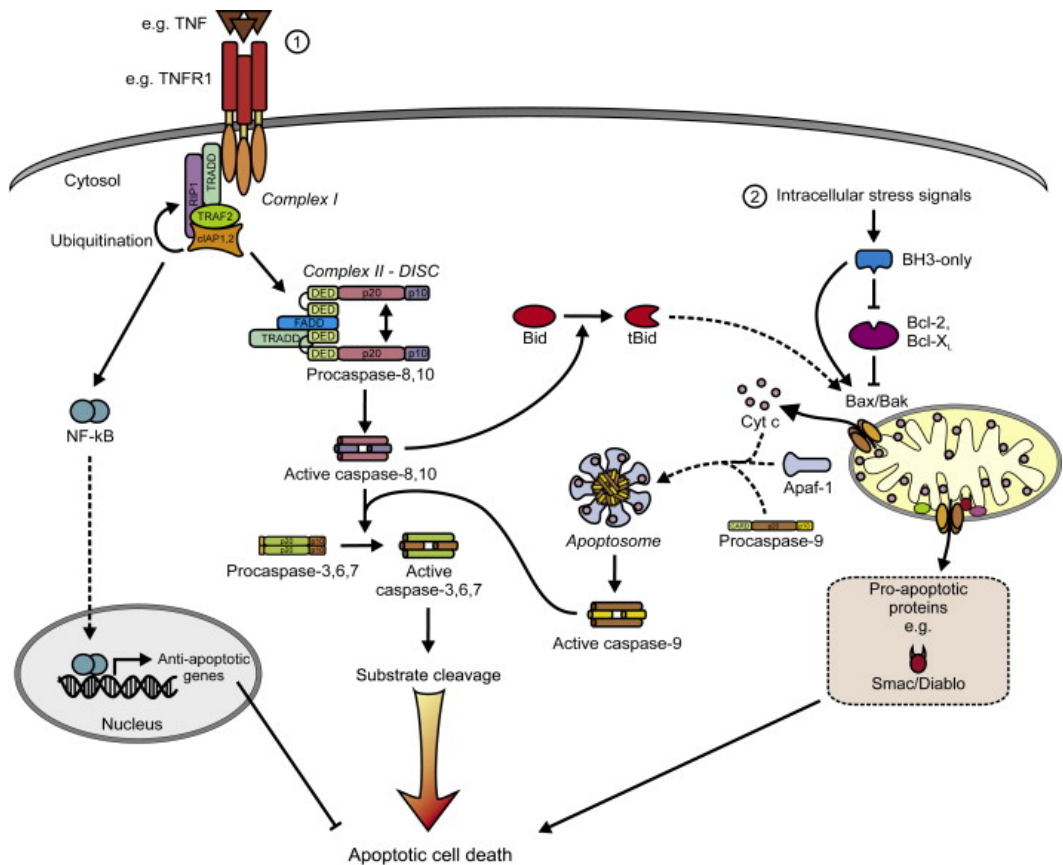


Figura 4. Representació esquemàtica de la via extrínseca i intrínseca de l'apoptosi. En l'esquema de la via extrínseca (1) es mostra la composició del DISC i l'activació per proximitat de caspasa-8. c-FLIP_L actua com a inhibidor al desplaçar la caspasa 8. En la via intrínseca (2) la permeabilització de la membrana mitocondrial externa permet la sortida de citocrom c, que junt amb APF-1 forma l'apoptosoma, permeten l'activació successiva de les caspases iniciadores i efectores. Adaptat de Duprez et al. (2009).

De manera general, la via mitocondrial d'apoptosi s'activa en resposta a l'estrès cel·lular. Aquests estímuls propapotòtics modifiquen diversos components cel·lulars que actuen com sensors i que transmeten la senyal de mort al mitocondri (Figura 4). Un cop la senyal arriba al mitocondri s'inicia la permeabilització de la membrana mitocondrial externa o MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*), provocant la sortida de diferents proteïnes de l'espai mitocondrial intermembranós al citosol, com citocrom c, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, endonucleasa G, AIF i les caspases 2, 3 y 9 (Van Loo et al., 2002). El citocrom c (Danial and Korsmeyer, 2004; Liu et al., 1996) és un component fonamental de la

fosforilació oxidativa i de la formació d'ATP al mitocondri. En el citosol, el citocrom c s'uneix als dominis autoinhibitoris de la proteïna APAF-1, activant-la. En conseqüència, de manera dependent d'ATP, APAF-1 oligomeritza junt a la procaspasa 9 formant un complex heptamèric anomenat apoptosoma (Pop et al., 2006). L'apoptosoma està format per varies molècules de citocrom c, APAF-1 i procaspasa 9, i indueix la reorganització del centre actiu i l'activació de la caspasa 9 que activa les caspases efectores (Acehan et al., 2002). Les cèl·lules deficientes en citocrom c, APAF-1 (Yoshida et al., 1998) o caspasa 9 (Kuida et al., 1998) presenten defectes en l'apoptosi en resposta a senyals internes, demostrant la importància d'aquests elements en aquesta via.

Regulació de la via mitocondrial d'apoptosi: la família de BCL-2

El mitocondri és un orgànel intracel·lular vital, i entre les seves funcions s'inclouen la producció d'ATP, la regulació de l'apoptosi i la regulació i biosíntesi de diversos metabòlits. També és el principal productor d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i la seva diana immediata. Les proteïnes de la família de BCL-2 regulen la formació del MOMP, a través del que diverses proteïnes del espai intermembranós, entre elles el citocrom c, surten del mitocondri per activar la maquinària apoptòtica del citosol, les caspases.

Les proteïnes de la família de BCL-2 constitueixen el principal punt de control de la via intrínseca d'apoptosi (Walensky, 2006; Youle and Strasser, 2008). El membre fundador de la família va ser l'oncogen *BCL-2*, que es va identificar en la translocació t(14; 18) del limfoma folicular humà (Bakhshi et al., 1985; Tsujimoto et al., 1984). A diferència d'altres oncògens identificats, es va identificar que *BCL-2* era capaç de promoure la supervivència cel·lular més que d'induir-ne la proliferació (Vaux et al., 1988). Actualment sabem que la família de BCL-2 està formada per membres pro i antiapoptòtics que comparteixen uns dominis d'homologia anomenats BH (*BCL-2 homology*). Aquests dominis permeten la interacció entre els diferents membres per poder activar o inhibir l'apoptosi. Els membres proapoptòtics poden subdividir-se segons la seva estructura i funció (Figura 5).

1. Membres antiapoptòtics (*BCL-2-like*)

BCL-2 és el membre més representatiu d'aquest grup. Junt amb altres membres similars estructuralment com *BCL-X_L*, *BCL-W* i *BOO/DIVA/BCL-B*, i membres més divergents com *MCL-1* i *A1/BFL-1*, protegeixen les cèl·lules d'un ampli ventall d'agressions citotòxiques, com són la privació de citoquines, la radiació UV o γ , ROS o agents quimioterapèutics (Danial and Korsmeyer, 2004). Tots ells contenen 3 o 4 dominis BH, excepte *MCL-1*, que en té només 2. Els

dominis BH1, BH2 i BH3 formen una butxaca hidrofòbica que permet la interacció amb el domini BH3 dels membres proapoptòtics.

2. Membres proapoptòtics multidomini (BAX-like)

Dins aquest grup trobem BAX, BAK, BOK/MTD, BCL-G_L i BCL-X_s (variant de *splicing* del gen *BCL-X*), que són molt similars en seqüència i estructuralment a BCL-2, i conserven 2 o 3 dominis BH (BH1, 2 i 3). Quan s'activen actuen perturbant les membranes intracel·lulars, formant, suposadament, porus en la membrana mitocondrial externa, que induïrien el MOMP que permetria la sortida dels factors mitocondrials (Danial and Korsmeyer, 2004).

3. Membres proapoptòtics amb només el domini BH3 (BH3-only)

Aquest grup de membres proapoptòtics té una seqüència més divergent als altres membres de la família de BCL-2, ja que només mantenen el domini BH3, que sembla indispensable per la seva funció proapoptòtica. Dins d'aquest grup s'inclouen BAD, BCL-G_s (variant de *splicing* del gen *BCL-G*), BID, BIM/BOD, BIK/NBK/BLK, BNIP3/NIX, NIP3, BMF, HRK/DP5, NOXA, PUMA i MCL-1_s (variant de *splicing* del gen *MCL-1*).

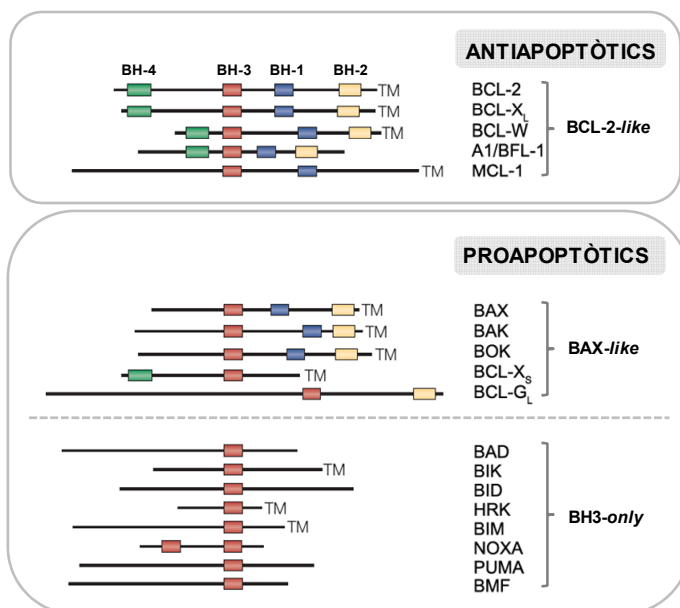


Figura 5. Representació dels membres de la família de BCL-2. Es mostren les 3 famílies: en general, els membres de BCL-2-like promouen la supervivència cel·lular, mentre que els membres BAX-like i els BH3-only promouen l'apoptosi. Es mostren els dominis BH i el TM, que correspon al domini lipídic transmembrana. Modificat de Strasser (2005).

4. Formes de *splicing* alternatiu.

S'han descrit varies formes de *splicing* alternatiu de moltes proteïnes de la família. Per exemple, proteïnes antiapoptòtiques que el seu *splicing* tindria una funció proapoptòtica, com el cas de MCL-1s, variant de MCL-1L. O al contrari, Bid_s, *splicing* alternatiu de Bid_{EL} o Bid_L, té un paper antiapoptòtic, ja que no disposa de domini BH3, i és proteolitzat per caspasa 8. Així, podria actuar com competidor de l'activació de Bid_{EL} i Bid_L. De la proteïna BIM s'han descrit 19 variants de *splicing* (Akgul et al., 2004).

La majoria de membres antiapoptòtics (BCL-2-*like*) i proapoptòtics (BAX-*like*) i alguns dels BH3-*only* tenen un domini transmembrana (TM), important pel seu direccionament cap a les diferents membranes cel·lulars. Estudis de localització en cèl·lules sanes col·loquen a BCL-2 a les membranes del mitocondri, de l'embolcall nuclear i del reticle endoplasmàtic; a BCL-X_L i MCL-1 en el citosol (Hsu et al., 1997; Nijhawan et al., 2003) i a BCL-W principalment en el mitocondri (Krajewski et al., 1993). Els membres BAX-*like* proapoptòtics també difereixen en la seva localització: BAK es troba associat a les membranes del mitocondri i del reticle endoplasmàtic, mentre que BAX es troba al citosol i transloca a membrana mitocondrial quan s'activa (Hsu et al., 1997). Els membres BH3-*only*, degut a la seva capacitat d'interacció amb altres membres, es poden trobar localitzats allà on interaccionin.

Interaccions entre els membres de la família de BCL-2

Les proteïnes de la família de BCL-2 s'associen entre si a través dels seus dominis BH per formar homo- i/o heterocomplexes que juguen diferents papers en el procés de MOMP i la sortida del citocrom c. S'ha descrit que BAX i BAK són essencials per la formació del MOMP i l'apoptosi, tot i que es desconeix com BAX i BAK porten a terme la permeabilització de la membrana mitocondrial externa (Antignani and Youle, 2006). Les proteïnes BH3-*only* tenen una funció anterior a la de BAX/BAK, ja que la seva expressió en el doble *knock-out* (DKO) no restaura la resistència a la sortida de citocrom c, i la sobreexpressió de BCL-2 o BCL-X_L bloqueja el MOMP induït per l'expressió de les proteïnes BH3-*only*. Així, els membres de la família de BCL-2 són crucials per determinar la resposta mitocondrial a diversos estímuls apoptòtics (Chipuk et al., 2006; Garrido et al., 2006).

Existeixen diferents models per explicar el funcionament dels membres de la família de BCL-2, com interaccionen entre si i quina és la seva funció en la regulació de l'apoptosi. Els membres BH3-*only* funcionen com sensors cel·lulars que inicien la cascada que desencadenarà l'apoptosi, integrant les diferents senyals de supervivència o de dany

intracel·lular. Existeixen dos models per l'activació de BAX i BAK: el model d'activació directa i el model d'activació indirecta, tots dos resumits a la figura 6.

En el **model d'activació indirecta**, totes les proteïnes BH3-only inactiven les antiapoptòtiques BCL-2-like, tot i que la especificitat de les interaccions varia. Algunes BH3-only, com BID, BIM i PUMA poden inhibir totes les proteïnes antiapoptòtiques BCL-2-like, i són les més potents, mentre que NOXA, BMF i BAD només s'uneixen a algunes proteïnes BCL-2-like. En aquest model, la unió de les proteïnes BH3-only allibera i activa BAX i BAK per tal que pugui induir la permeabilització de la membrana mitocondrial. En el **model d'activació directa**, les proteïnes BH3-only es divideixen en dos grups: les proteïnes BH3-only "activadores", BID, BIM i PUMA activen directament BAX i BAK, i s'inactiven a través de la interacció amb les proteïnes antiapoptòtiques BCL-2-like. Les proteïnes BH3-only "sensibilitzadores" funcionen desplaçant les "activadores" d'aquestes unions, alliberant BAX i BAK (Meier and Vousden, 2007). Estudis recents demostren que les unions entre els membres antiapoptòtics i els BH3-only és específica, amb afinitats d'unió que entre els membres que poden variar fins a 10.000 vegades (Adams and Cory, 2007) (Figura 6).

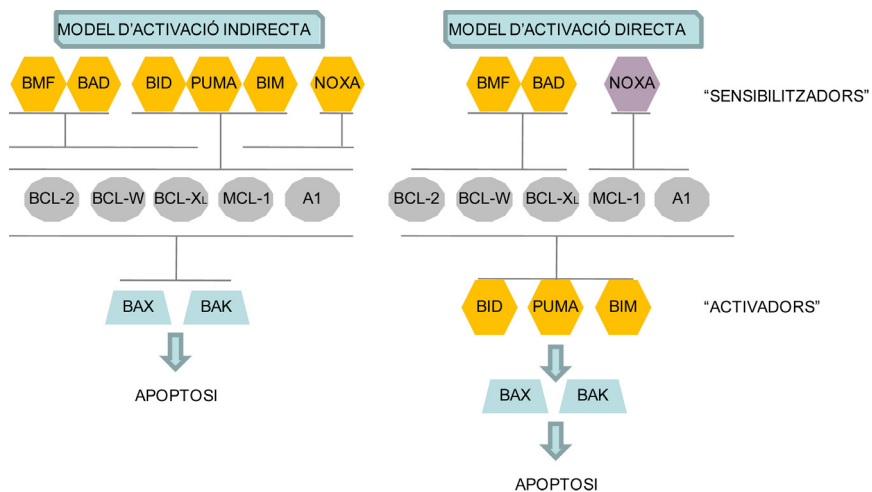


Figura 6. Dos models per l'activitat de les proteïnes BH3-only en l'apoptosi. A l'esquerra, el model d'activació indirecta i a la dreta, el model d'activació directa. Modificat de Meier i Vousden (2007).

Les proteïnes BH-only com sensors cel·lulars

El gran nombre de proteïnes BH3-only pot donar un control més gran i específic del inici del procés de mort cel·lular, en funció del estímul desencadenat (Strasser, 2005). Algunes BH3-only només s'expressen en certs tipus cel·lulars i altres semblen controlar un compartiment subcel·lular específic. Cada un dels membres BH3-only respon a un tipus d'agressió concreta (Figura 7), i els seus nivells es poden regular a nivell transcripcional o posttranscripcional. Per exemple, els gens *NOXA* i *PUMA* són induïts pel gen supressor de tumors TP53 en resposta a dany a l'ADN, i són dos gens clau per la inducció d'apoptosi per agents genotòxics, i la transcripció de *BIM* s'indueix per FoxO3a en cèl·lules B després de la privació de citocines *in vitro*. Mentre que BAD s'activa per defosforilació en resposta a privació de factors de creixement, BID té un paper important en la mort induïda a través de receptor de mort activant-se per proteòlisi mitjançada per la caspasa 8 (Strasser, 2005; Youle and Strasser, 2008).

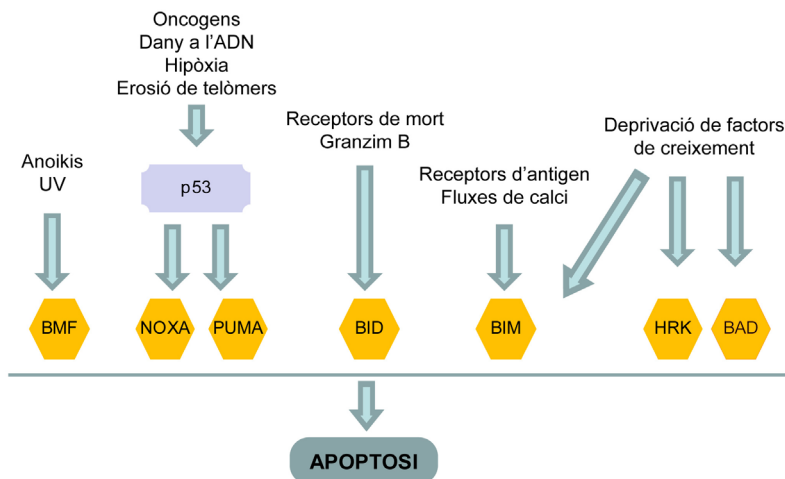


Figura 7. Cada un dels membres BH3-only respon front a un tipus d'agressió fisiològica molt concreta, tot i que existeix solapament de funcions entre els diferents membres Adaptat de Weinberg (2007).

Autofàgia

L'autofàgia és un mecanisme pel que la cèl·lula passa a autodigerir parts de sí mateixa, ja sigui com a resposta a la manca de nutrients o com a resposta a un procés tòxic.

Sistemes proteolítics

Pel desenvolupament i creixement d'una cèl·lula és necessari un equilibri entre la síntesi i la degradació de proteïnes i orgànuls. Per realitzar aquesta funció, les cèl·lules eucariotes han desenvolupat dues vies principals de degradació de proteïnes intracel·lulars, el proteosoma i l'autofàgia. L'autofàgia és responsable de la degradació de proteïnes de vida llarga i d'orgànuls, mentre el proteosoma degrada de forma específica proteïnes de vida curta que han estat marcades amb ubiquitina (Martinez-Vicente and Cuervo, 2007) (Figura 8). Nosaltres ens centrarem en la descripció de la via autofàgica, per esta aquesta també implicada en processos de PCD.

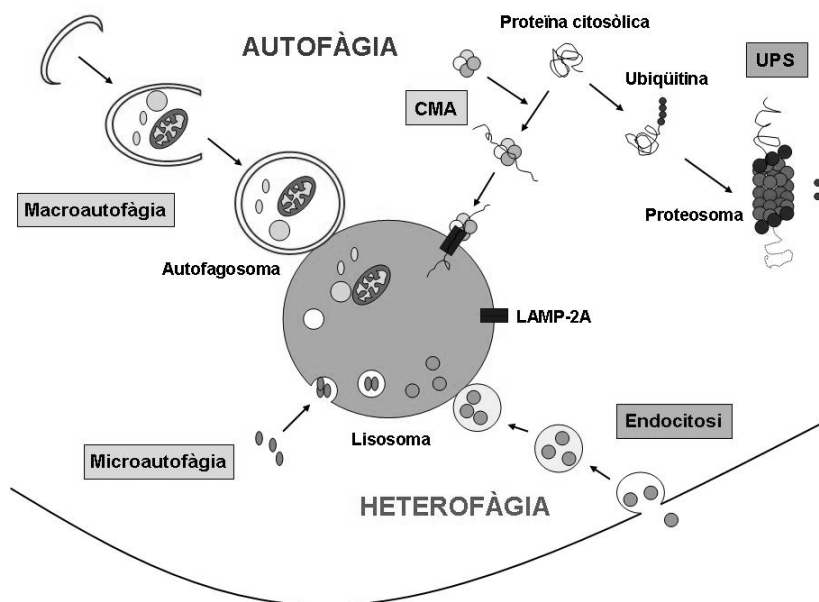


Figura 8. Vies de degradació de proteïnes a mamífers. Les proteïnes poden ser transportades al lisosoma des del medi extracel·lular (heterofàgia) o des de l'interior cel·lular (autofàgia). La via heterofàgica més estudiada és l'endocitosi. El proteosoma (UPS, *Ubiquitin proteasome system*) és l'altre principal via de degradació de proteïnes a l'interior cel·lular. Adaptat de Martinez-Vicente and Cuervo (2007).

Hi ha tres tipus principals d'autofàgia. L'autofàgia mediada per txaperones (CMA, *chaperone-mediated autophagy*) és responsable de la degradació de proteïnes citosòliques que contenen una determinada seqüència d'aminoàcids. En aquest procés intervé la proteïna lisosomal LAMP-2A. Els altres dos tipus d'autofàgia són la macroautofàgia i la microautofàgia. La microautofàgia involucra el segrest directe de citoplasma a la superfície lisosomal, mentre la macroautofàgia implica el segrest de citoplasma a l'interior d'una vesícula autofàgica, o autofagosoma, i la posterior fusió d'aquesta amb un lisosoma. En la literatura normalment quan es parla d'autofàgia es fa referència a la macroautofàgia, per aquest motiu a partir d'ara nosaltres també ens referirem a la macroautofàgia amb el terme autofàgia.

L'autofàgia és un procés conservat en l'evolució d'autodigestió lisosomal, responsable de la renovació d'òrgànuls i macromolècules. Addicionalment a les importants funcions de manteniment, l'autofàgia promou la supervivència cel·lular en cèl·lules sotmeses a estrès o en condicions de deprivació nutricional, proporcionant aminoàcids mitjançant la degradació de proteïnes per promoure la supervivència cel·lular quan hi ha escassetat de nutrients (Mortimore and Poso, 1986), i eliminant macromolècules i òrgànuls danyats. No obstant, les cèl·lules autofàgiques sotmeses a un estrès excessiu poden acabar cometent suïcidi mitjançant el desencadenament de la mort cel·lular autofàgica, o PCD tipus II. Així doncs l'autofàgia juga un paper vital en molts processos fisiològics, havent-se trobat una vinculació entre deficiències en l'autofàgia i diverses patologies humanes, entre elles el càncer.

Encara que l'autofàgia va ser inicialment descrita a mamífers, els seus mecanismes moleculars s'han elucidat en llevats, degut en gran part, a la fàcil aplicació d'anàlisis genètics en aquest organismes. Nombrosos experiments han portat a la identificació de les molècules que participen en aquest procés i que es coneixen amb el nom d'ATGs (AuTophagy-related gens). La nomenclatura ATG es va establir per unificar totes les anteriors, com per exemple APG, AUT o CVT, que havien estat descrites per diferents laboratoris (Klionsky et al., 2003). Els llevats presenten una via pròpia de maduració i recanvi de proteïnes que es coneix amb el nom de CVT (cytosol-to-vacuole-targeting). Moltes de les ATGs identificades formen part d'aquesta via. La via CVT, a diferència de l'autofàgia, es troba activa quan hi ha nutrients al medi. La seva funció és el transport de l' α -manosidasa i del precursor de l'aminopeptidasa-1 a la vacuola (Hutchins and Klionsky, 2001; Scott et al., 1997). Per realitzar aquesta funció utilitza la mateixa maquinària que l'autofàgia (Khalfan and Klionsky, 2002). Actualment s'han identificat nombrosos homòlegs de les ATGs de llevat a cèl·lules eucariotes (Reggiori and Klionsky, 2002).

El procés cel·lular de l'autofàgia

L'autofàgia pot ser induïda per diferents processos com la privació de nutrients, la infecció de determinats patògens o per l'efecte d'agents ambientals. El procés autofàgic (Figura 9) es caracteritza per la presència d'unes estructures de doble membrana a l'interior de la cèl·lula. Inicialment es pensava que aquestes estructures s'originaven a partir del RE (Dunn, 1990), no obstant, avui en dia es pensa que podrien ser originades a partir d'una estructura membranosa anomenada fagòfor (*phagophore*) (Stromhaug et al., 1998), o podrien ésser sintetitzades de *novo* (Mizushima et al., 2001). Aquestes estructures membranoses creixen i maduren. La proteïna LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*), homologa d'Atg8 en mamífers, és reclutada cap a la membrana durant aquest procés. Finalment es forma una estructura anomenada autofagosoma, que conté al seu interior proteïnes citosòliques i/o orgànuls cel·lulars. La formació de l'autofagosoma pot ser inhibida mitjançant la 3-metiladenina (3-MA) (Punnonen and Reunanen, 1990). L'autofagosoma posteriorment madura i es fusiona amb un lisosoma donant lloc a una estructura anomenada autofagolisosoma o autolisosoma. El procés de fusió pot ser inhibit mitjançant la bafilomicina A1, inhibidor de les H⁺-ATPasas, o mitjançant compostos que alteren els microtúbuls com la vinblastina o el nocodazol (Punnonen and Reunanen, 1990). El contingut dels autolisosomes serà finalment degradat per al seu reciclatge.

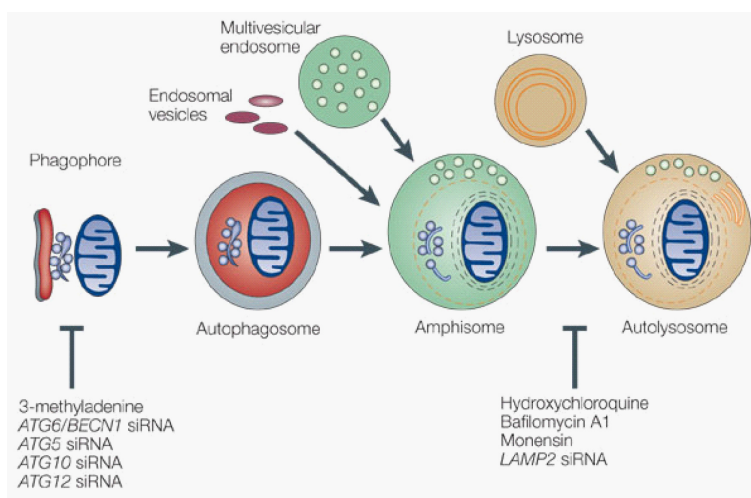


Figure 9. Representació bàsica del procés autofàgic. Adaptat de Kondo et al. (2005).

Formació de l'autofagosoma

Els primers passos en la formació de la vacuola autofàgica estan mediat per la **PI3K classe III**, l'ortòleg de Vps34, l'única PI3K present en llevats (Corcelle et al., 2009; Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009; Xie and Klionsky, 2007). Entre el jugadors claus de la maquinària autofàgica trobem aquells que formen un complex amb Vps34 i regulen la seva activitat, com la Beclina 1 (l'ortòleg en mamífers de la Atg6) i la cinasa serina miristilat Vsp15/p150. Les proteïnes UVRAG i Bif-1 són reguladors positius de la interacció entre la Beclina 1 i Vps34, promovent l'activació de Vps34. La Vps34 també s'uneix a la Atg4 que és la que dirigeix el complex-Vps34, també anomenat complex I, als centres organitzadors de la formació de l'autofagosoma, coneguts com les estructures pre-autofagosomals o PAS (*phagophore assembly site*). L'etapa de la nucleació de la biogènesi autofagosomal requereix de l'activació de Vps34, que produeix fosfatidil-inositol trifosfat (PI3P). El PI3P presumiblement actua reclutant proteïnes que contenen els dominis d'unió PI3P FYVE i PX, els quals es creu que són els encarregats de controlar la formació i l'elongació de la membrana (Figura 10B). Per exemple el complex Atg 18-Atg2 és reclutat al PAS via la unió a fosfolípids.

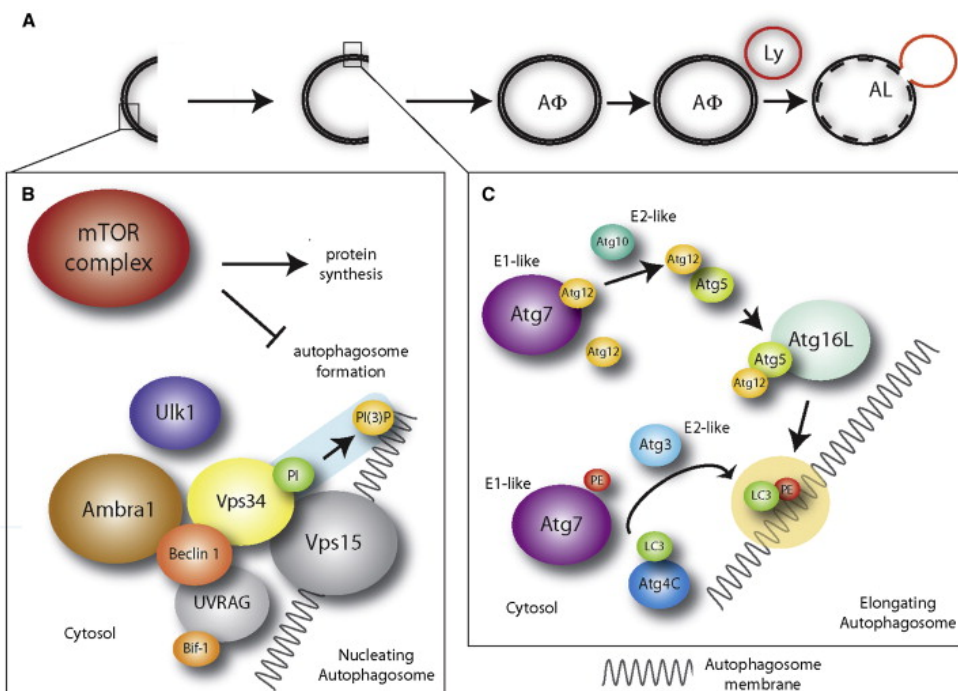


Figura 10. Formació dels autofagosomes en vertebrats. A | Nucleació del autofagosoma. **B** | Elongació del autofagosoma. Adaptat de Cecconi i Levine (2008).

La PI3K de classe III forma un complex amb la Beclina-1 que està involucrat en la formació dels autofagosomes i l'inici de l'autofàgia (Kihara et al., 2001). La 3-MA, la wortmanina i l'LY294002, interfereixen amb aquest procés (Blommaert et al., 1997). El complex PI3K-III/Beclina-1 es localitza majoritàriament a la xarxa trans-Golgi (TGN, *trans-Golgi network*), no obstant pot trobar-se també als endosomes tardans. Aquesta distribució fa pensar que aquest complex participa en la distribució dels components de l'autofagosoma.

En mamífers la PI3K de classe I també participa en la regulació de l'autofàgia. Quan és activada per receptors Tyr-quinasa localitzats a la membrana plasmàtica converteix PI(4,5)P₂ a PI(3,4,5)P₃, formant part d'una cascada que activa mTOR i inhibeix l'autofàgia.

La Ser/Thr-cinasa **Atg1** és essencial per a la inducció de l'autofàgia. En llevats l'Atg1 per activar-se necessita interaccionar altres Atgs, formant un complex que inclou l'Atg13 i l'Atg17. TOR regula negativament aquesta etapa mitjançant la fosforilació de l'Atg13, reduint la seva afinitat d'unió a l'Atg1 (Stromhaug and Klionsky, 2001). La funció específica en l'autofàgia de l'Atg1, o del seus homòlegs en mamífers ULK1 i ULK2, encara no ha estat definida, tampoc el mecanisme que encadena la seva funció amb la del complex Beclina 1/Vps34, no obstant, sembla tenir un paper clau en la formació de l'autofagosoma (Corcelle et al., 2009; Longatti and Tooze, 2009).

L'etapa d'elongació de la membrana vacuolar autofàgica es du a terme per l'acció de dos sistemes amb mecanismes d'activació ubiqüitina-like, l'Atg12/Atg5 i Atg8/fosfatidiletanolamina (PE) (Figura 10C) (Cecconi and Levine, 2008). Aquests dos sistemes estan relacionats entre ells i bastant conservats en cèl·lules eucariotes (Levine and Klionsky, 2004; Xie and Klionsky, 2007).

En el **complex Atg12/Atg5**, la proteïna ubiqüitina-like Atg12 s'uneix covalentment a l'Atg5 (Mizushima et al., 1999). Per a que aquesta unió tingui lloc són necessàries dues proteïnes, l'Atg7 que actua com a enzim activador de l'ubiqüitina (E1) (Kim et al., 1999b) i l'Atg10, que actua com a conjugador de l'ubiqüitina (E2) (Shintani et al., 1999). L'Atg7 activa l'Atg12, que és transferida a l'Atg10 per ser finalment unida a l'Atg5. El **complex Atg8/PE**, de manera similar al sistema Atg12/Atg5, és conjugat mitjançant els enzims Atg7 (E1) i Atg3 (E2). Els dos complexos, Atg12/Atg5 i Atg8/PE, són necessaris per a la formació de l'autofagosoma (Suzuki et al., 2001a), no obstant, només el complex Atg8-PE forma part de l'estructura d'aquest (Kirisako et al., 1999). En mamífers han estat descrits almenys tres homòlegs de l'Atg8, GATE-16, GABARAP i LC3. Tots ells són modificats lipídicament i es localitzen a l'autofagosoma (Kabeya et al., 2004). El complex Atg12/Atg5 és reclutat a la membrana autofagosomal externa, presumptament via interacció amb l'Atg16, un proteïna que té la capacitat d'oligomeritzar,

formant un complex multimèric format per l'Atg5, l'Atg12 i l'Atg16 (Mizushima et al., 1999). El lloc d'inserció de LC3 bé determinat per la localització en la membrana d'Atg16. El dímer Atg12/Atg5 recentment s'ha mostrat que també té activitat enzimàtica (E3) en la conjugació del sistema Atg8/PE (Hanada et al., 2007). Aquest és un pas crític en l'expansió de l'autofagosoma, i es produeix mitjançant la formació d'una unió amida entre el grup amino del PE i el residu glicina carboxi-terminal de l'Atg8, el qual queda exposat després del trencament per la proteasa Atg4 de l'extrem C-terminal de l'Atg8. La modificació lipídica de l'Atg8, la qual només té lloc quan s'estimula l'autofàgia, converteix la forma soluble citoplasmàtica (LC3-I), en la forma conjugada a membrana (LC3-II), que es troba associada a l'autofagosoma (Xie and Klionsky, 2007). El complex Atg8/PE permet l'anclatge a la membrana i la hemifusió, determinant la quantitat d'Atg8 i de PAS la mida de l'autofagosoma. Un cop l'autofagosoma s'ha expandit completament, l'Atg8 es desconjuga de PE per acció de la Atg4 i és alliberat de nou al citosol. De la mateixa manera, el complex Atg5/Atg16 es dissocia de la membrana de l'autofagosoma després de la seva maduració (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009).

L'autofagosoma madur es fusiona amb orgànuls del compartiment endocític (endosomes primerencs o tardans i lisosomes, donant lloc a l'autolisosoma (Corcelle et al., 2009; Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009; Longatti and Tooze, 2009). En llevats aquest procés precisa de Ypt7p (l'homòleg en mamífers és Rab7), Vamp3p (un homòleg de la syntaxina), Sec18p (homòleg de NSF, *N-ethylmaleimide sensitive factor*), i Vti1p (una proteïna SNARE). En cèl·lules de mamífer s'ha demostrat una funció semblant per Rab7 i Vti1p. La UVRAG, en aquestes darreres etapes de la formació de l'autofagosoma torna a participar en el procés, regulant la maduració de l'autofagosoma de manera independent de la Beclina 1. UVRAG facilita el reclutament del complex de la proteïna vacuolar classe C (C-Vps) als autofagosomes. Aquesta interacció entre UVRAG i C-Vps estimula l'activitat de la GTPasa Rab7, resultant en la fusió del autofagosoma amb el lisosoma. Aquesta fusió té lloc a la regió perinuclear, rica en lisosomes. Per a que això tingui lloc, els autofagosomes s'han de desplaçar des del citosol cap al nucli. Aquest moviment té lloc per microtúbuls, i està mediat per les dineïnes. Finalment, les proteïnes i orgànuls contingudes en l'autolisosoma són degradats per les proteïnes lisosomals.

Model de la formació de l'autofagosoma

La formació de l'autofagosoma s'iniciaria a partir de l'Atg9 i el complex I de la PI3K que posarien en marxa els complexos Atg12/Atg5/Atg16 i Atg8/PE formant l'estructura preautofagosomal anomenada PAS, que es pot definir com una estructura híbrida entre la vesícula membranosa que s'està formant (fagòfor) i el nucli de la maquinària proteica que hi participa (Figura 11) (Xie and Klionsky, 2007). El PAS aniria augmentant de mida mitjançant el

reclutament d'altres complexos Atg12/Atg5/16 i Atg8/PE. El complex Atg12/Atg5/Atg16 tindria un paper estructural, afavorint la unió dels complexos Atg8/PE. Els lípids necessaris pel creixement de la membrana serien aportats per l'Atg9 que aniria ciclant entre els mitocondris i el PAS. Al final del procés l'Atg9, el complex I de la PI3K i el complex Atg12/Atg5/16 es separarien de l'autofagosoma.

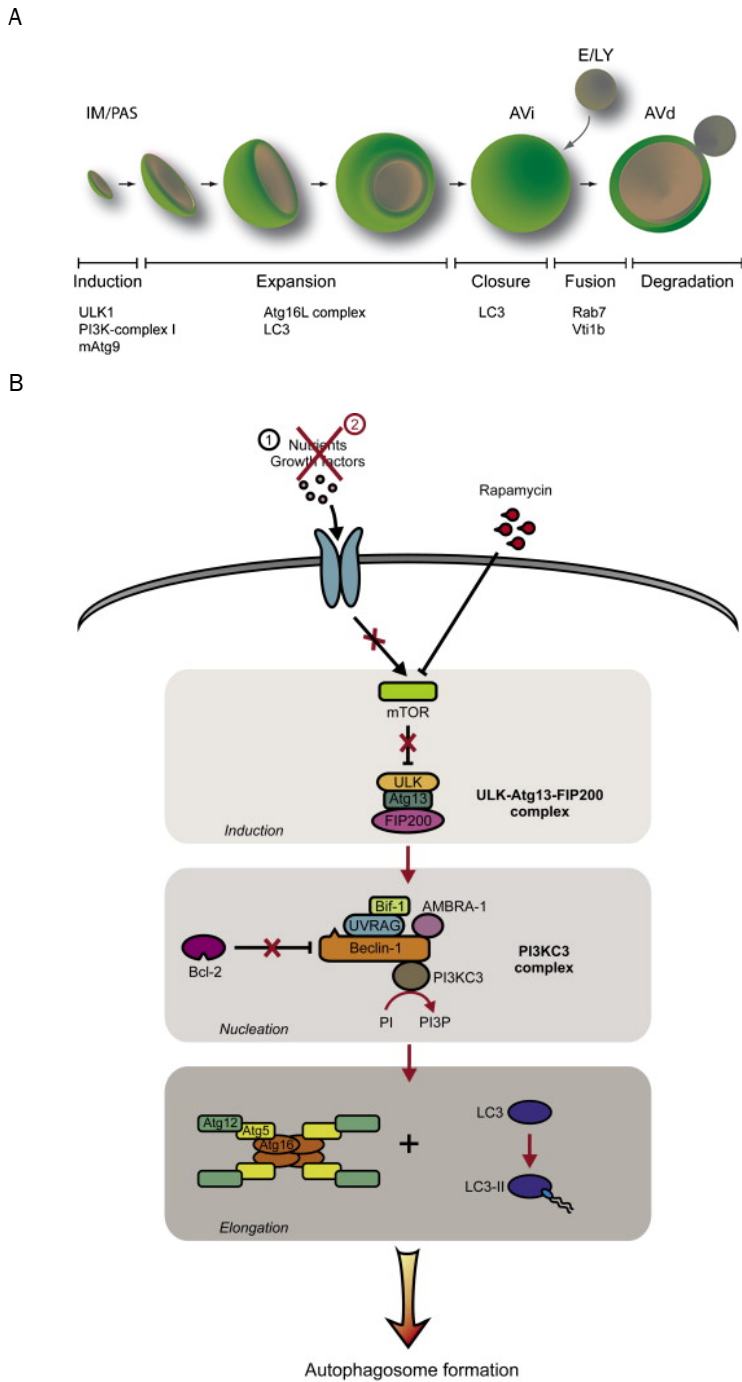


Figura 11. Representació de la possible biogènesi de l'autofagosoma. A | Durant la fase d'expansió del PAS creix segregant components citosòlics en el seu interior, components que no s'han il·lustrat per tal de simplificar l'esquema. Adaptat de Longatti and Tooze, (2009). **B** | Esquema on es resumeix es esdeveniments més importants en cadascuna de les etapes de formació de l'autogasoma. Adaptat de Duprez et al. (2009).

Regulació de l'autofàgia

L'autofàgia pot ser iniciada per un gran número d'estímuls extracel·lulars i intracel·lulars. Han d'existir doncs, uns mecanismes que permetin captar aquests estímuls i transmetre'ls als factors reguladors, afavorint o inhibint l'autofàgia segons les necessitats de la cèl·lula.

mTORC1, el principal punt de control en la senyalització de l'autofàgia

Hi ha un gran nombre de senyals i vies involucrades en l'inici i control de l'autofàgia, però el principal regulador d'aquest procés és la diana de la rapamicina, TOR. TOR és una Ser/Thr-quinasa que actua com un sensor de factors de creixement, nutrients i disponibilitat d'energia, i la seva activació s'associa a la síntesi proteica, al creixement cel·lular i a la inhibició de l'autofàgia, actuant doncs com a regulador del metabolisme i el creixement cel·lular. En condicions normals TOR inhibeix l'autofàgia mitjançant dos mecanismes: (i) formant part d'una cascada de transducció de senyals amb uns efectors *down-stream* que controlen la transcripció i la traducció de proteïnes (Cardenas et al., 1999), (ii) inhibint directament o indirectament a les ATGs, i en conseqüència la formació de l'autofagosoma (Levine and Klionsky, 2004).

TOR es pot trobar en dos complexos multiproteics diferents, TORC1 i TORC2, que es troben conservats de llevats a mamífers. TORC1 de mamífers (mTORC1) conté GβL i raptor, mentre mTORC2, conté GβL, rictor, SIN1 i protor. No obstant, només TORC1 és sensible a la inhibició per rapamicina (Wullschleger et al., 2006). TORC1 regula la síntesi de proteïnes i l'autofàgia, en canvi, TORC2 regula la formació del citoesquelet d'actina i la polaritat cel·lular.

Substrats principals de mTORC1

Els dos substrats principals de mTORC1 són dos factors que regulen la traducció de les proteïnes, 4E-BP1 i p70S6K (Fingar et al., 2002). 4E-BP1 és un factor que inhibeix la traducció de les proteïnes. La seva fosforilació per mTORC1 inhibeix la seva acció potenciant la traducció. La proteïna p70S6K en canvi, estimula la traducció de proteïnes que formen part de l'aparell traduccional, i aquest mecanisme es veu afavorit quan la p70S6K és fosforilada per mTORC1.

Hi ha evidències que indiquen que durant l'autofàgia hi ha una inhibició parcial de la síntesi de proteïnes. La fosforilació de la proteïna ribosomal S6, un substrat de la p70S6K, té un efecte inhibitori sobre l'autofàgia (Blommaert et al., 1995). A aquest efecte cal afegir que dues quinases d'eIF2α, GCN2 i PKR, afavoreixen el procés autofàgic inhibint la síntesi proteica (Talloczy et al., 2002). No obstant, la inhibició global de la síntesi proteica no estimula el procés autofàgic, encara que s'observen processos de vacuolització i petits autofagosomes en el citoplasma (Abeliovich et al., 2000).

Regulació de mTOR

L'activació de mTOR està directament estimulada per Rheb, una proteïna petita d'unió a GTPases que s'uneix i activa mTOR quan es troba en la seva forma unida a GTP, induint un canvi conformacional que permet a mTOR formar complexos amb altres efectors que es troben per sota de la via, activant-los. Aquesta senyal finalitza mitjançant les proteïnes activadores de GTPases que afavoreixen la hidròlisi del GTP, tornant Rheb al seu estat inactiu. La TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) presenta homologia amb les proteïnes activadores de GTPases i inhibeix Rheb. Perquè aquesta inhibició es dugui a terme TSC2 ha d'heterodimeritzar amb TSC1, formant el complex TSC1/TSC2 (Castro et al., 2003). Aquest complex integra senyals de múltiples vies, adquirint un paper central en el control de la senyalització de mTOR. La fosforilació del complex TSC1/TSC2 per AKT, ERK o RSK, tots ells estimulats per **factors de creixement**, inhibeix el complex permetent l'activació de mTOR per Rheb inhibint l'autofàgia. La fosforilació per AMPK (AMP-activated kinase), activada en situacions de **deprivació de nutrients i energia** per ràtios AMP/ATP elevats, activa en canvi el complex TSC1/TSC2, conduint a la inactivació de mTOR i a l'activació de l'autofàgia. Addicionalment, mTOR pot ser directament fosforilada per Akt i AMPK. La fosforilació de mTOR mediada per Akt estimula l'activitat de mTORC1, mentre la fosforilació de raptor per AMPK condueix a la dissociació de raptor de mTORC1, inhabilitant a mTORC1 en el reconeixement de substrats (Figura 12) (Corcelle et al., 2009).

El paper inhibitori de mTOR sobre l'autofàgia es troba conservat de llevats a humans. En els llevats, en condicions on s'està bloquejant TOR, com la deprivació de nutrients o el tractament amb rapamicina, l'Atg13 desfosforilada s'uneix a Atg1 i s'indueix l'autofàgia. El mecanisme precís pel qual mTOR inhibeix l'autofàgia en les cèl·lules de mamífer encara no es coneix bé. S'ha suggerit que la p70S6K podria estar involucrada en la regulació de l'autofàgia induïda per TOR mitjançant la inhibició de la retroalimentació de la via de senyalització

Altres vies que regulen l'autofàgia

Són múltiples les vies descrites que regulen a un nivell o altre l'autofàgia. Nosaltres a continuació descrivim aquelles més rellevants, totes elles connectades amb l'apoptosi.

Bcl-2

Les proteïnes anti-apoptòtiques de la família de Bcl-2 són importants oncògens, mentre els membres proapoptòtics d'aquesta família són proteïnes supressores de tumors. La família Bcl-2, tot i haver estat inicialment descrita com a reguladora de la mort cel·lular, ara es sap que

també controla el procés autofàgic. Les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-X, Bcl-w i Mcl-1 poden inhibir l'autofàgia, mentre els membres BH3-only proapoptòtics BNIP3L, Noxa, Puma, BimEL i Bik, l'estimulen. El mecanisme a través del qual els membres de la família de Bcl-2 inhibeixen l'autofàgia està relacionat amb la seva capacitat d'unió a la Beclina 1. La Beclina 1 conté un domini BH3 que s'uneix al solc d'unió BH3 present en les proteïnes Bcl-2/Bcl-XL (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Maiuri et al., 2009b). La unió de la Bcl-2 a Beclina 1 inhibeix l'autofàgia mitjançant la regulació negativa del complex promotor de l'autofàgia Beclina 1/Vps34. Aquesta regulació negativa es du a terme mitjançant la capacitat de Bcl-2 i Bcl-XL de reduir la capacitat d'unió de la UVRAG a la Beclina 1, evitant així la seva monomerització, possiblement necessària per a la unió d'aquesta amb Vps34 (Noble CG et al, 2008).

L'associació de Bcl-2 amb la Beclina 1 està regulada de manera dependent de l'estrès. En condicions riques en nutrients (condicions inhibidores de l'autofàgia) s'observen elevats nivells d'interacció, mentre després de la privació de nutrients (condicions que estimulen l'autofàgia) la interacció es troba reduïda als nivells mínims, correlacionant amb l'activació de l'autofàgia (Patingre et al., 2005). A més a més, recentment s'ha descrit que la fosforilació de Bcl-2 per JNK (c-Jun N-terminal kinase) en residus del seu *loop* no estructural, regula positivament l'autofàgia, alliberant la Beclina 1 de la seva unió inhibidora amb Bcl-2 (Wei et al., 2008).

p53

La relació entre p53 i autofàgia és molt complexa, degut a que p53 sembla tenir un paper dual en la regulació de l'autofàgia (Figura 12) (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009; Eisenberg-Lerner et al., 2009; Maiuri et al., 2009a). El supressor de tumors p53 és un punt de control crític en les cèl·lules de mamífer, que s'activa en condicions d'estrès genotòxic que inclouen el dany a l'ADN, la hipòxia i l'activació oncogènica, i respon iniciant mecanismes supressors de tumors, com l'aturada del cicle cel·lular, la senescència i l'apoptosi. En aquestes condicions p53 també transactiva gens inductors d'autofàgia, i estimula l'autofàgia mitjançant la inhibició de mTOR de manera dependent d'AMPK i del complex TSC1/TSC2, fet que es du a terme gràcies a l'activació de l'AMPK, mediada per LKB1 com a conseqüència d'un augment del ràtio AMP/ATP. Addicionalment, p53 també pot activar l'autofàgia actuant sobre la seva diana directa DRAM (damage-regulated modulator of autophagy), una proteïna altament conservada en eucariotes que es localitza en la membrana lisosomal. No obstant, recentment també s'ha observat que la inactivació genètica o farmacològica de p53 també condueix a l'activació de l'autofàgia, indicant que la població citoplasmàtica de p53 és una potent repressora de l'autofàgia.

Així doncs, per una banda la p53 nuclear pot induir autofàgia a través d'efectes transcripcionals, mentre la p53 citoplasmàtica sembla estar exercint un important paper com a repressora del mateix procés. Les circumstàncies i les vies moleculars involucrades en la decisió d'utilitzar p53 com a activador o com a inhibidor de l'autofàgia en les cèl·lules canceroses encara no es coneix. Probablement, en els primers estadis tumorogènics l'activació de p53 i la conseqüent activació de l'autofàgia, estiguin relacionats amb la funció supressora de tumors d'aquesta proteïna, actuant com un mecanisme de mort per a eliminar les cèl·lules defectuoses. Un cop el tumor format però, la inactivació de p53 i l'activació de l'autofàgia probablement sigui un mecanisme avantatjós per a la cèl·lula, proporcionant energia contínua a les cèl·lules tumorals.

DAPK

DAPK-1 (*death-associated protein kinase-1*) és una proteïna dependent de calci comunament silenciada en càncers humans per metilació, amb propietats supressores de tumors i metàstasi (Gozacik and Kimchi, 2006). DAPK-1 també indueix autofàgia i apoptosi, a través de mecanismes independents (Figura 12) (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009; Maiuri et al, 2009). DAPK-1 interacciona amb la proteïna associada a microtúbuls MAP1B, especialment en condicions de deprivació de nutrients. La sobreexpressió de DAPK-1 indueix autofàgia, inducció que disminueix al suprimir MAP1B, fet que suggereix que la interacció de DAPK1 amb MAP1B (que a la vegada pot interaccionar amb LC3) podria ser responsable de la inducció de l'autofàgia. No obstant són necessaris més estudis, ja que alguns treballs semblen indicar que MAP1B podria inhibir l'autofàgia. A més a més, DAPK-1 és una molècula extremadament pleiotròpica, poden activar el sistema de p53, afectant possiblement la propensió de les cèl·lules a desencadenar l'autofàgia.

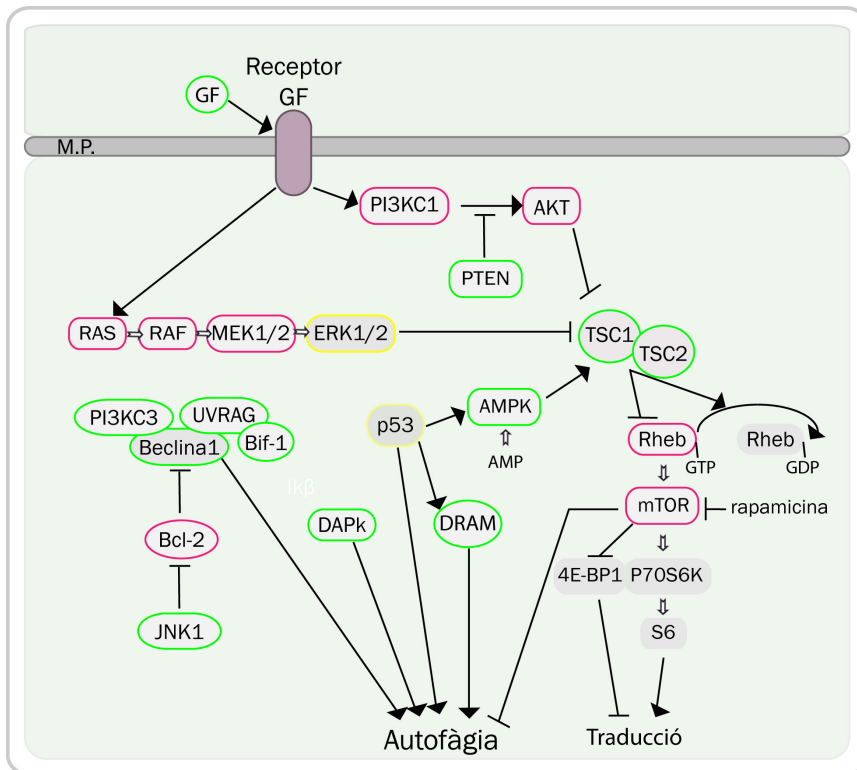


Figura 12. Vies de senyalització que regulen l'autofàgia. Els reguladors positius de l'autofàgia es mostren en verd, mentre els reguladors negatius en fucsia. Els reguladors que poden fer ambdues funcions estan marcats amb groc. Modificat de Eisenberg-Lerner and Kimchi, (2009).

Autofàgia i càncer

El paper i la regulació de l'autofàgia en el càncer és força complex, fent de l'autofàgia un potencial, però important, mecanisme en la prevenció i el tractament del càncer. En els tumors, l'autofàgia es troba activada en àrees hipòxiques i manté la supervivència cel·lular en condicions d'estrès metabòlic. Així doncs, la inducció de l'autofàgia majoritàriament representa un mecanisme de supervivència activat per a contrarestar els efectes deleteris de l'estrès metabòlic, i possiblement també vers el tractament de les cèl·lules tumorals. D'altra banda, quan l'autofàgia arriba al seu fi la mort cel·lular continua, potenciant la possibilitat que l'autofàgia excessiva induïda per drogues pugui potencialment resultar en l'eliminació de les cèl·lules tumorals (Figura 13).

Evidències protumorigèniques. La inducció de l'autofàgia i la maduració dels autofagosomes es troba molt alterada en els teixits tumorals. El microambient tumoral és freqüentment pobre en nutrients i oxigen, afavorint la inducció d'autofàgia. A més a més els lisosomes, essencials en la degradació autofàgica, veuen molt potenciada la seva activitat i el seu trànsit durant la tumorigènesi (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009; Corcelle et al., 2009; Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Evidències antitumorigèniques. Els càncers humans sovint contenen mutacions que inactiven gens proapoptòtics (ex. PTEN, p53, TSC1, TSC2, Beclina 1, UVRGG, Bif-1) i l'activació de gens antiautofàgics (ex. PI3KC1, Akt, Ras, Bcl-2), suggerint que l'autofàgia actua com una important barrera contra la transformació cel·lular, suprimint la formació de tumors. Aquesta hipòtesi s'avalua principalment en les dades que mostren que ratolins deficients en Atg4C, Bif-1, TSC1/2, UVRAG i p53, o que presenten heterozigosi de Beclina 1, són propensos a la tumorigènesi, recolzant el impacte negatiu de l'autofàgia en la transformació (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009; Corcelle et al., 2009; Eisenberg-Lerner et al., 2009). White i col·laboradors van proposar al 2007 dos hipòtesis alternatives, però no excloents, per explicar com la pèrdua de l'autofàgia podria estimular l'oncogènesi (Mathew et al., 2007): (i) la supressió de l'autofàgia podria estar potenciant la necrosi, empitjorant la inflamació local i estimulant en conseqüència el creixement tumoral; (ii) la inhibició de l'autofàgia podria promoure la inestabilitat genòmica en cèl·lules sotmeses a estrès metabòlic, conduint a l'activació oncogènica i a la supressió de tumors. Els mecanismes a través dels quals la deficiència de l'autofàgia pot conduir a la inestabilitat genòmica no estan clars (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009). Una possibilitat és que l'autofàgia simplement sigui necessària per al manegament òptim del flux bioenergètic, facilitant els nivells mínims d'ATP necessàries per a la reparació de l'ADN. També és possible que l'autofàgia indirectament contribueixi al reforç dels punts de control del cicle cel·lular mitjançant la degradació d'òrgànuls específics, com els mitocondris, que són essencials per a la regulació del creixement cel·lular. A més a més, l'autofàgia podria ser requerida per a remoure òrgànuls danyats, i per tant regular el nivell d'estrès endogen, significant que la deficiència d'autofàgia podria afectar la inestabilitat genòmica d'una manera més aviat indirecta.

Per tal d'englobar el que acabem d'exposar, s'ha suggerit que el paper de l'autofàgia en el càncer pot variar considerablement en concordança amb l'estadi de malignitat, limitant la formació dels tumors en els processos primerencs i promovent la supervivència i la invasió de les cèl·lules transformades un cop el càncer s'ha format (Gozuacik and Kimchi, 2004).

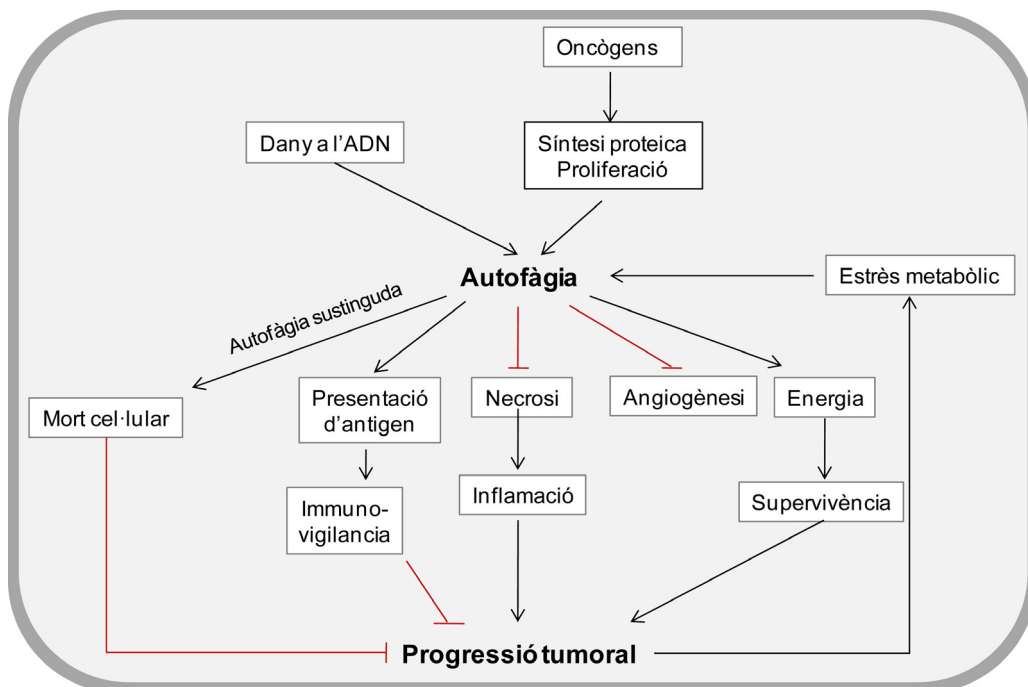


Figura 13. La paradoxa de l'autofàgia. Esquema on es representen les connexions entre autofàgia i tumorigènesi. Modificat de Eisenberg-Lerner i Kimchi (2009).

Autofàgia i apoptosi i la teràpia contra el càncer

La desregulació de la mort cel·lular, per activació de vies de supervivència i/o inactivació de vies de senyalització de mort, és crítica en l'aparició del fenotip tumoral. En general, les teràpies que restauren la sensibilitat a la mort cel·lular intervenen selectivament en les vies de les que depèn la supervivència del tumor. Així, els tractaments no quirúrgics del càncer, fonamentalment quimioteràpia i radioteràpia, actuen induint parada de cicle i/o programes de mort cel·lular, especialment apoptosi, en les cèl·lules tumorals (Bellosillo et al., 1997; Bellosillo et al., 1998; Spurgers et al., 2006). Les radiacions, els fàrmacs que actuen sobre el citoesquelet, els agents genotòxics que danyen l'ADN, i molts altres utilitzen (a part dels efectes sobre cicle cel·lular i proliferació) els mecanismes d'inducció de mort cel·lular per realitzar la seva activitat antitumoral.

En qualsevol situació de mort cel·lular la cèl·lula decideix quin mecanisme utilitzar, en funció de la natura de l'estímul i de les particularitats de l'escenari cel·lular. Els programes de mort cel·lular apoptosi (PCDI) i autofàgia (PCDII) s'ha observat que no són dues vies mútuament excloents (Tan et al., 2009). A nivell molecular les connexions entre aquests dos programes de mort cel·lular s'evidencien per l'elevat nombre de gens que comparteixen, entre els quals trobem tant gens reguladors, com p53, com gens bàsics en la maquinària d'execució d'aquests processos. Així doncs, els estímuls que actuen sobre aquests gens afectaran tant a l'apoptosi com a l'autofàgia. Per aquest motiu, en clínica per a poder predir el desenllaç de la inhibició o l'activació d'un programa de mort cel·lular hauríem de considerar l'efecte que exercirà en l'altre.

En base a les múltiples publicacions recents sobre les interdependències entre autofàgia i apoptosi, s'han descrit tres tipus d'interconnexions, totes elles vàlides en funció de les particularitats del tipus cel·lular, de l'estímul i de l'escenari cel·lular (Figura 14) (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Tan et al., 2009):

Col·laboració entre apoptosi i autofàgia. Els dos mecanismes cooperen en la mort cel·lular. Quan un dels dos programes és bloquejat, per defectes genètics o per inhibició farmacològica, l'altre du a terme la mort cel·lular, assegurant l'eficiència del procés. Poden actuar simultàniament o de manera cooperativa, tot i que un pot predominar sobre l'altre, ocultant la participació de l'altre. O alternativament, activant-se la segona via només quan falla la primera, és a dir que la primera quan és funcional bloqueja a la segona, tot i que les dues tenen com a finalitat eliminar la cèl·lula.

L'autofàgia permet l'apoptosi. L'autofàgia participa en el procés sense induir mort per ella mateixa, permeten l'execució de l'apoptosi. Per exemple mantenint els nivells cel·lulars d'ATP durant la deprivació de nutrients, permetent l'exposició de la PE que permet el reconeixement per part del fagocits dels cossos apoptòtics. En aquests casos la inhibició de l'autofàgia només afectarà aquelles característiques directament relacionades amb l'ATP, sense afectar altres respostes apoptòtiques.

L'autofàgia antagonitza l'apoptosi. En aquest cas l'apoptosi i l'autofàgia són dos processos diferents amb finalitats dispars. L'autofàgia en aquest cas no condueix a la mort cel·lular, sinó tot el contrari, actua com a atenuador de l'apoptosi creant un ambient on s'afavoreix la supervivència cel·lular.

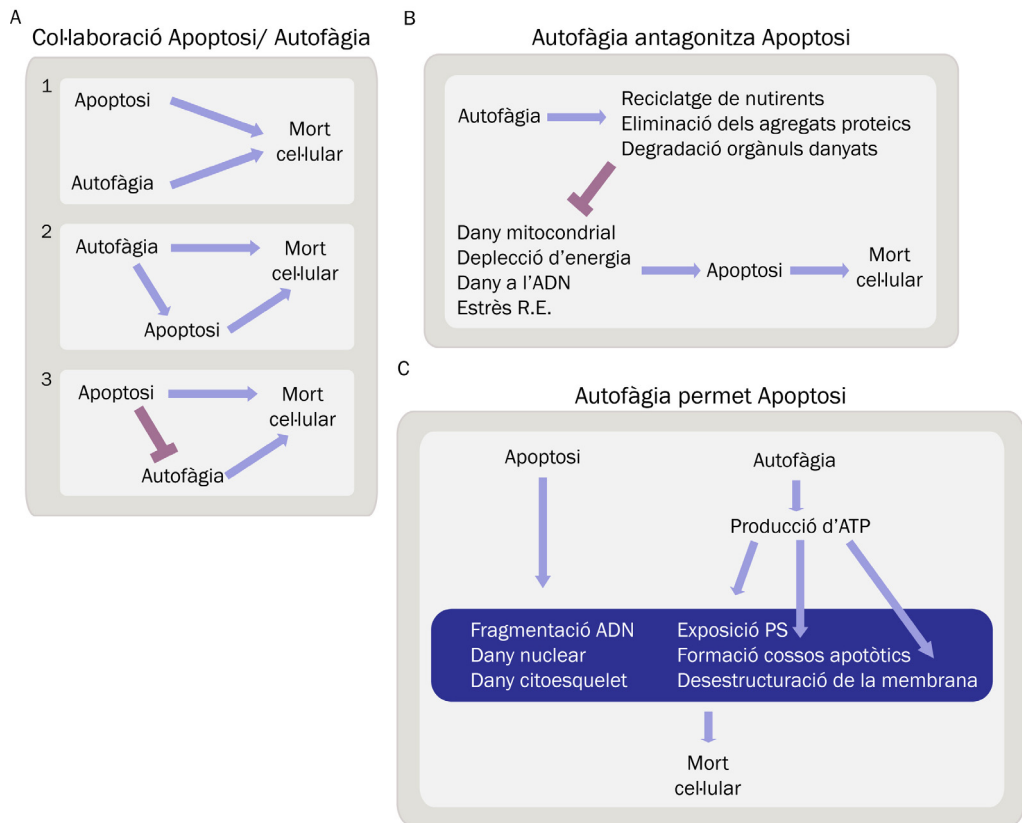


Figura 14. Representació esquemàtica de les interdependències entre apoptosi i autofàgia. **A** | L'apoptosi i l'autofàgia són parella, ambdós conduïnt a la mort cel·lular. Poden actuar de manera independent per vies paraleles (1), o influenciant l'altre. L'autofàgia és necessària per a la mort apoptòtica, situant-se per sobre de l'apoptosi, estímul alhora per sí sola la mort (2). O l'apoptosi pot suprimir l'autofàgia, sent aquest darrer només evident quan s'inhibeix l'apoptosi (3). **B** | L'autofàgia antagonitza l'apoptosi promovent la supervivència, per exemple extraient orgànuls danyats o proporcionant energia a les cèl·lules en situacions de deprivació de nutrients. Aquestes funcions bloquegen l'estímul que desencadenaria l'apoptosi. **C** | L'autofàgia, tot i no conduir per ella mateixa a la mort, permet que tingui lloc el programa apoptòtic, participant en els canvis morfològics, com per exemple els esdeveniments dependents d'ATP com l'exposició de la PS. Adaptat de Eisenberg-Lerner et al. (2009).

Les radiacions, els fàrmacs que actuen sobre el citoesquelet, els agents genotòxics que danyen l'ADN, i molts altres utilitzen (apart dels efectes sobre el cicle cel·lular i proliferació) els mecanismes d'inducció de mort cel·lular per realitzar la seva activitat antitumoral. Això implica que les alteracions en la maquinària reguladora i efectora d'aquest mecanisme poden provocar resistència front a la quimioteràpia i radioteràpia, i aquestes alteracions en l'expressió i/o funció de proteïnes són freqüents en càncer. Així doncs, el coneixement d'aquestes alteracions i de les connexions entre l'autofàgia i l'apoptosi permetria l'ús de fàrmacs de manera racional en el tractament del càncer.

El Neuroblastoma

Avui dia la majoria de nens amb càncer es curen amb diferents combinacions de quimioteràpia, sovint utilitzades simultàniament amb la cirurgia i irradiació. El major índex de curació en nens amb càncer en comparació amb les malignitats adultes es deu a que els tumors pediàtrics són més susceptibles a l'apoptosi utilitzant drogues citotòxiques corrents, i degut a que els infants són capaços de suportar dosis superiors de quimioteràpia que els adults. No obstant, tot i el recent progrés, **el càncer segueix liderant la causa de mort deguda a malalties en la infància** en els països occidentals, i en tot el món després de les malalties infeccioses, que tenen una elevada prevalença en els països subdesenvolupats (Scotting et al., 2005).

El neuroblastoma va ser descrit per primer cop fa més d'un segle per tres metges, Robert Hutchinso, William Pepper i James Homer Wright, els quals van reconèixer la natura neuronal d'aquests tumors, sent la seva prevalença aproximada d'un cas cada 7.000- 10.000 naixements vius (Janoueix-Lerosey et al, 2010). És el tumor sòlid extracranial més comú en la infància i la neoplàsia més freqüentment diagnosticada durant la primera infància, essent la majoria d'aquests tumors (90%) diagnosticats en els primers 5 anys de vida (Friedman and Castleberry, 2007) (Figura 15 B). El neuroblastoma és responsable del 7 % de totes les neoplàsies diagnosticades en pacients menors de 15 anys, i d'aproximadament el 15 % de totes les morts pediàtriques oncològiques (National Cancer Institute. Surveillance. <http://www.seer.cancer.gov>), presentant un elevat índex de mortalitat respecte el nombre de casos diagnosticats, esdevenint la neoplàsia infantil amb pitjor pronòstic (Figura 15 A).

Es tracta d'un tumor embriològic del sistema nerviós simpàtic, únic entre els tumors pediàtrics degut a la seva elevada heterogeneïtat biològica. Durant els darrers anys s'ha aconseguit una millora substancial dels resultats terapèutics d'alguns grups ben definits d'aquests pacients, però les conseqüències per als infants amb el fenotip clínic de risc elevat només han millorat de forma modesta, amb una supervivència a llarg termini encara inferior al 40% tot i l'intensa teràpia multimodal (Maris et al., 2007).

Així doncs, el neuroblastoma segueix sent avui dia un repte mèdic complex, amb un curs clínic imprevisible i un pronòstic poc esperançador en estadis avançats de la malaltia.

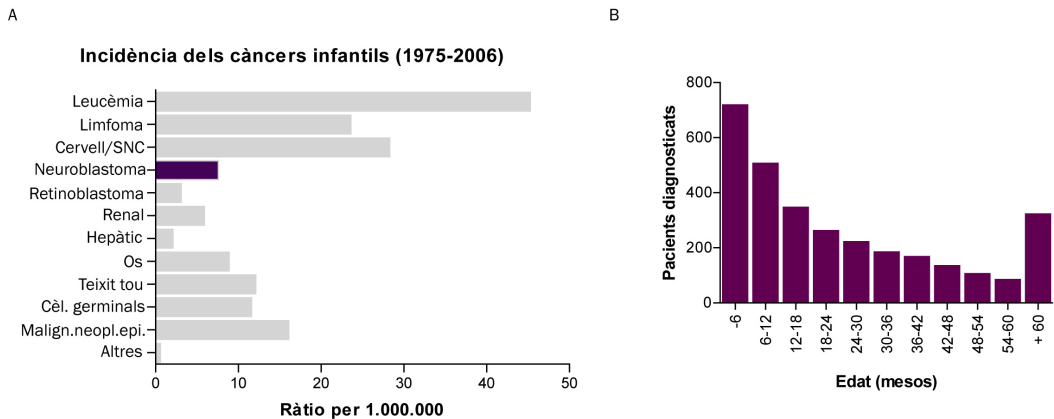


Figura 15. A | Càncers infantils. Ràtios d'incidència SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results program*) del *National Cancer Institute* durant 1975-2006. **B | Edat en el moment del diagnòstic.** Edat dels pacients en el moment del diagnòstic. Dades del *Children's Oncology Grup*. Adaptat de Friedman i Castleberry (2007).

Coneixements actuals sobre el desenvolupament del neuroblastomes

El neuroblastoma és considerat un dels tumors embrionaris per excel·lència. És una neoplàsia neuroectodèrmica que s'origina durant l'etapa fetal o postnatal primerenca, desenvolupant-se a partir de cèl·lules derivades de la cresta neural encara immadures, però la diferenciació de les quals ja es troba restringida. La cresta neural és una estructura embrionària transitòria que sorgeix de l'ectoderm durant el procés de tancament del tub neural (Figura 16). Està formada per una població de cèl·lules progenitores multipotents que es diferenciaran durant l'embriogènesi i el desenvolupament dels òrgans, donant origen a les cèl·lules neuronals del sistema nerviós simpàtic i de la medulla adrenal, així com a les cèl·lules de Schwann, melanòcits, alguns tipus de cèl·lules neuroendocrines, i inclús a teixit tipus mesènquima en la regió del cap i el coll.

El delicat equilibri entre mort cel·lular, proliferació, autorenovació, migració i diferenciació és crucial per a un desenvolupament neuronal correcte. Defectes en qualsevol dels mecanismes que controlen aquests processos poden promocionar la transformació, esdevenint les cèl·lules en desenvolupament propenses a la tumorigènesi. Durant els darrers anys, s'ha evidenciat que les neoplàsies pediàtriques del sistema nerviós estan lligades a mecanismes alterats del desenvolupament normal, donant suport a un model de tumorigènesi embrional (Grimmer and Weiss, 2006; Johnsen et al., 2009).

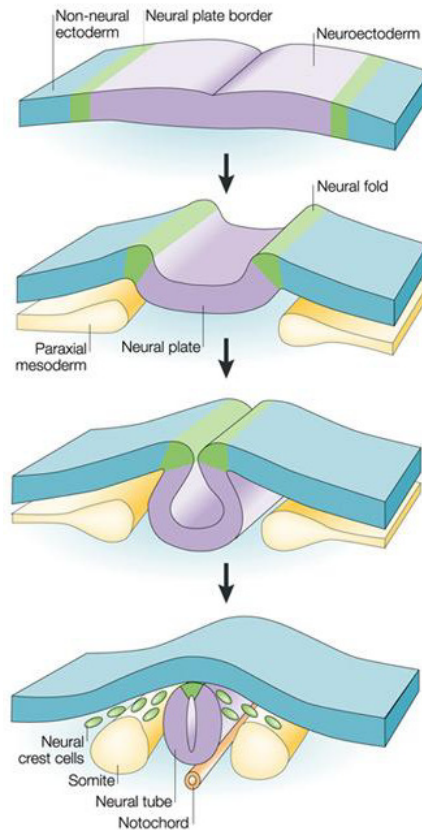


Figura 16. Esquema del procés de neurulació. Adaptat de Gammill i Bronner-Fraser (2003).

En comparació amb els tumors adults, els tumors embrionaris tenen un període de latència extremadament curt i generalment contenen poques aberracions genètiques que causin l'activació d'oncògens o la pèrdua de reguladors de l'apoptosi. La raó per a aquestes diferències és que les malignitats embrionàries sorgeixen de cèl·lules progenitores que ja es troben en proliferació com a part normal del procés de desenvolupament (Scotting et al., 2005). De fet molts dels gens expressats pels neuroblastomes són importants en el desenvolupament normal de la cresta neural, com l'oncogen NMYC del que parlarem més endavant (Brodeur, 2003; Grimmer and Weiss, 2006). Estudis recents del perfil transcripcional d'aquests tumors mostren a més a més, que els diferents estadis clínics del neuroblastomes són reflex d'una aturada en la maduració a diferents estadis de la diferenciació simpatico-adrenal, mostrant els tumors més agressius un estat de maduració inferior (Nakagawara et al., 2004).

Presentació clínica

El neuroblastoma és una malaltia del llinatge simpatico-adrenal de la cresta neural, podent desenvolupar-se els tumors en qualsevol lloc del sistema nerviós simpàtic (Figura 17A). La majoria dels tumors primaris es localitzen en l'abdomen, i d'aquests més del 50% s'originen en la cavitat abdominal (molts d'ells en la medulla adrenal) (Figura 17B i C). El coll, el pit i la pelvis són altres de les localitzacions més comuns d'aquestes neoplàsies (Figura 17D) (Ishola and Chung, 2007; Maris et al., 2007; Mullassery et al., 2009; Scotting et al., 2005).

Depenent de la localització del tumor primari, així com de la presència o absència de metastasi i de síndromes paraneoplàsics, els signes i símptomes de la malaltia són extremadament variables. Els símptomes primerencs, quan són presents, són típicament signes no específics, com malestar general, pèrdua de pes i febre inexplicable. En alguns casos però el tumor pot sagnar de forma espontània, produint dolor abdominal agut acompanyat de malestar degut a la conseqüent anèmia. En general però, els símptomes no apareixen fins que el tumor ha adquirit una mida crítica i/o desenvolupat metastasi.

Els **neuroblastomes locoregionals** tenen generalment característiques biològiques favorables i la majoria d'ells són tractats amb èxit únicament amb cirurgia. És més, són múltiples els estudis que suggereixen que un subgrup dels tumors localitzats reverteixen espontàniament (al voltant del 5%), emprant-se en aquets casos l'anomenada teràpia de "*wait and see*", basada en una acurada observació del pacient però sense cap tractament (Nishihira et al., 2000; Oue et al., 2005).

Els síndromes paraneoplàsics són poc freqüents en els neuroblastomes locoregionals, però fàcilment distingibles quan es troben presents. Els dos més habituals en aquests pacients són: (i) la secreció del pèptid intestinal vasoactiu, que produeix el desenvolupament d'una diarrea intractable, amb la conseqüent deshidratació i hipopotasèmia, i (ii) el síndrome psoclonus-myoclonus, que consisteix en moviments oculars ràpids, atàxia i moviments musculars irregulars, probablement conseqüència d'una disfunció del cervellet causada per anticossos contra el teixit neuronal del tumor.

Aproximadament el 50 % dels pacients presenten però **metàstasi** en el moment del diagnòstic, especialment a os cortical, medulla òssia, fetge, nòduls limfàtics i pell. A diferència dels malalts amb tumors localitzats que pràcticament manquen de simptomatologia en el moment del diagnòstic, aquest pacients presenten múltiples símptomes derivats de l'extensiva càrrega tumoral. Per exemple s'ha observat que aquests tumors tenen una inexplicable tendència a metastatitzar en l'os de la conca ocular, produint un hematoma subcutani periorbital (aspecte

d'ulls d'ós rentador), proptosi, o ambdós, sent aquests signes clàssics de la disseminació de la malaltia. La metàstasi a os i medul·la òssia pot produir dolor ossi, dificultats per a caminar o irritabilitat en l'infant, podent ésser necessari un transplantament de medul·la òssia en alguns pacients. La disseminació al sistema nerviós central és poc freqüent en el moment del diagnòstic, però pot produir-se amb la progressió de la malaltia o en recidives.

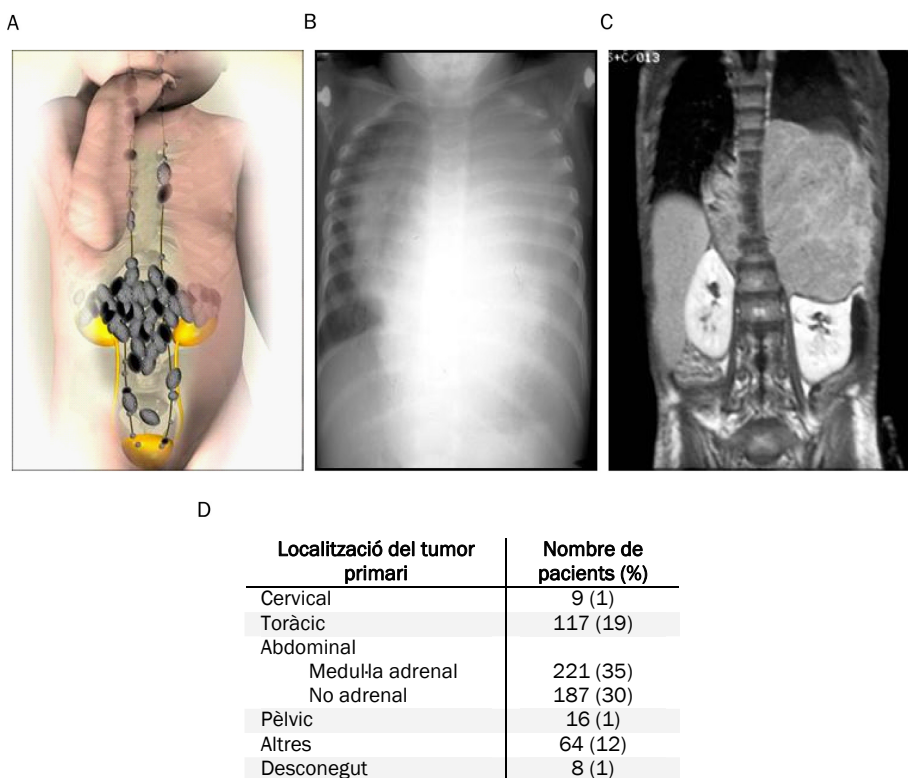


Figura 17. Localització dels neuroblastomes. **A** | Els tumors primaris de neuroblastoma deriven de la cresta neural i s'originen en el sistema nerviós simpàtic, que està format per les cadenes laterals simpàtiques i pels ganglis simpàtics, els quals recorren la columna vertebral i la medul·la adrenal. Adaptat de Johnsen et al. (2009). **B** | Radiografia de tòrax on s'observa un tumor en la cavitat abdominal. **C** | Ressonància magnètica d'un tumor de grans dimensions originat en la medul·la adrenal. **D** | Taula on es mostren els llocs d'origen de 622 tumors primaris de neuroblastoma. Adaptat de Friedman i Castleberry (2007) (dades originals del *Children's Oncology Group Statistical Office*).

Existeix a més a més una relació directa entre l'edat en el moment del diagnòstic i la localització i extensió de la malaltia. Els infants diagnosticats abans de l'any mostren majoritàriament tumors localitzats, originats per igual en la cavitat toràcica com en l'abdominal, mentre que en nens més grans és més freqüent la presència de metàstasi i la localització adrenal del tumor primari (Sano et al., 2006). Existint doncs una correlació entre l'edat del diagnòstic i el pronòstic de la malaltia (Figura 18).

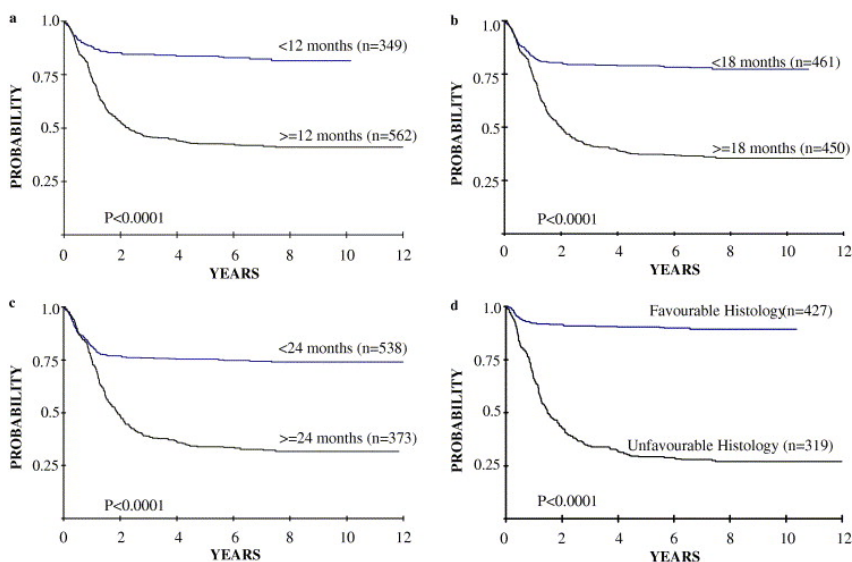


Figura 18. Corbes de supervivència Kaplan-Meier segons l'edat. A | 12 mesos en el moment del diagnòstic. **B** | 18 mesos en el moment del diagnòstic. **C** | 24 mesos en el moment del diagnòstic. **D** | Segons la classificació Patològica internacional del Neuroblastoma (INPC). Adaptat de (Sano et al., 2006).

Degut a que el pronòstic dels pacients amb neuroblastoma és significativament millor en els infants de menor edat, es van iniciar programes de cribatge massiu a Japó, Europa i Amèrica del Nord, amb el propòsit de detectar primerencament aquests pacients. No obstant, aquests programes de prevenció van produir un augment en el nombre de deteccions de tumors clínic i biològicament favorables, però no va produir una disminució de la prevalença dels nens majors d'un any amb malaltia avançada, ni de la ràtio de morts totals (Maris et al., 2007). Resultats que suggereixen que els tumors detectats pertanyen a una classe de tumors que probablement haurien remès de forma espontània abans de que es produís simptomatologia clínic. També

sembla indicar que els tumors d'elevat risc, normalment en infants en edats superiors a l'any, no s'originen de l'evolució de tumors de baix risc, sinó que sorgeixen com a tals (van Noesel et al., 2003).

Comportament biològic dels tumors neuroblàstics

Aquests tumors es caracteritzen per tenir comportaments biològics únics, que són:

1. *Involució/regressió espontània*

La involució o regressió espontània, és un procés que s'ha observat durant la vida embrionària, especialment en el desenvolupament del sistema nerviós perifèric i central, que es caracteritza per una mort cel·lular massiva de neuroblasts encara immadurs abans de que pugui finalitzar el procés de diferenciació.

L'existència de regressió espontània en neuroblastomes clínicament evidents ha estat descrita en articles des de principis del S.XX, però no va ser fins al 1971 que va ser descrita com a estadi 4-S, de l'anglès *special* (aquest i els demés estadis es descriuen en l'apartat Classificació dels neuroblastomes) (Hass D et al, 1988). Són varies les hipòtesis postulades per a donar explicació a aquest fenomen, basades en mecanismes immunològics, i en la manca de factors neurotròfics que podrien estar contribuint a la mort cel·lular en aquests casos (Redlinger et al., 2004). No obstant, actualment encara no és coneix amb certesa el mecanisme biològic que induïx aquesta involució. Semblen existir però requisits genètics que permetrien el procés de regressió, com el braç curt del cromosoma 1 intacte, manca d'amplificació d'NMYC i contingut d'ADN pròxim a la triploïdia (Brodeur, 2003). La incidència de regressió espontània en els neuroblastomes és entre 10 i 100 cops superior que en qualsevol altre tipus de càncer humà (Brodeur, 2003).

2. *Maduració*

La maduració espontània de tumors neuroblàstics és un fenomen àmpliament documentat (Shimada et al., 1984). Els tumors neuroblàstics estan formats per dues poblacions cel·lulars majoritàries, les cèl·lules neuroblàstiques/ganglionars i les cèl·lules de Schwann (Ciccarone et al., 1989; Ross and Spengler, 2007; Walton et al., 2004). Inicialment es pensava que ambdues s'originaven d'un únic clon neuroblàstic neoplàstic, però estudis més recents semblen indicar que les cèl·lules de Schwann podrien ser reclutades del teixit no neoplàstic de l'entorn per les

cèl·lules tumorals ((Ambros et al., 2002; Coco et al., 2005). En base a aquests resultats i als coneixements sobre l'interacció que es produeix entre neuroblasts normals i cèl·lules de Schwann o cèl·lules glials (Reynold et al, 1993), es suggereix que els neuroblasts neoplàsics podrien estar produint mitògens i factors quimiotàctics que actuarien reclutant les cèl·lules de Schwann. En retorn, les cèl·lules de Schwann, un cop en el teixit tumoral, alliberarien factors antiproliferatius i inductors de diferenciació cel·lular, crucials per a la diferenciació neuronal (Ambros et al., 1996). No obstant, aquests resultats entren en contradicció amb els publicats per Gerald i col·laboradors, els quals han descrit anomalies en el l'ADN de les cèl·lules de Schwann que suggereixen que ambdues cèl·lules, neuroblàstiques i Schwann, són malignes i deriven d'una cèl·lula progenitora pluripotent comú (Mora et al., 2001a).

3. Proliferació agressiva

La majoria dels neuroblastomes detectats clínicament no pateixen regressió espontània ni maduració, i es presenten com a tumors en estadis avançats (estadi 3 o 4). S'ha suggerit l'existència d'una connexió entre l'agressivitat del tumor i aberracions cromosòmiques específiques, com l'amplificació de l'oncogen NMYC, delecions del braç curt del cromosoma 1 i la di/tetraploidia del contingut d'ADN. A més a més hi ha una proporció poc definida de neuroblastomes localitzats o en estadi 4-S que potencialment poden evolucionar a estadi 4. (van Noesel and Versteeg, 2004; Van Roy et al., 2009).

Classificació dels neuroblastomes

Classificació histològica

Al 1984, Shimada i col·laboradors (Shimada et al., 1984) van idear una classificació que relacionava les característiques histopatològiques dels tumors amb el seu comportament clínic, la Classificació de Shimada. Els tumors eren classificats en favorables o no favorables depenent del **grau de diferenciació neuroblàstica, el contingut en cèl·lules de Schwann, l'índex mitosi-karyorrhexis i l'edat de pacient en el moment del diagnòstic**. Posteriorment, l'any 1994, en un esforç cooperatiu internacional per a desenvolupar els Grups de Risc Internacionals del Neuroblastoma, el *International Neuroblastoma Pathology Commite* (INCP), en base al model proposat per Shimada, va iniciar les seves activitats per a crear una classificació morfològica internacional dels tumors neuroblàstics. La seva finalitat era estandarditzar els criteris morfològics i la terminologia, establint una classificació morfològica que fos significativa a nivell

pronòstic, biològicament rellevant, i reproduïble. El resultat va ser la Classificació Patològica Internacional del Neuroblastoma (les seves sigles en anglès són INPC), la qual diferencia els tumors neuroblàstics en 4 categories morfològiques, principalment en base als canvis morfològics associats a la seqüència de maduració (actualment encara no hi ha indicadors fidedignes per a predir la involució) (Peuchmaur et al., 2003; Sano et al., 2006; Shimada et al., 1999a; Shimada et al., 1999b):

1. Neuroblastoma (estroma pobre en cèl·lules de Schwann)

Són tumors poc diferenciats, amb abundants neuroblasts i poques cèl·lules de Schwann (Figura 19 Dreta). Dins d'aquest grup existeixen tres subtipus: (i) el neuroblastoma indiferenciat, format per cèl·lules indiferenciades, de mida petita a intermèdia, amb molt poc citoplasma, i amb un nucli arrodonit o allargat, amb la cromatina amb aparença de "salt i pebre" i podent contenir més d'un nuclèol; (ii) el neuroblastoma pobrament diferenciats, on només el 5 % o menys de la població cel·lular tumoral presenta característiques de diferenciació cel·lular cap a cèl·lules ganglionars, tenen una major mida i morfologia estranya, amb un gran nucli que conté un o varis nuclèols prominents; (iii) el neuroblastoma en diferenciació, conté un 5 % o més de les cèl·lules amb característiques de diferenciació. Són cèl·lules que presenten un nucli engrandit, excèntric, amb la cromatina vesicular i normalment un únic nuclèol.

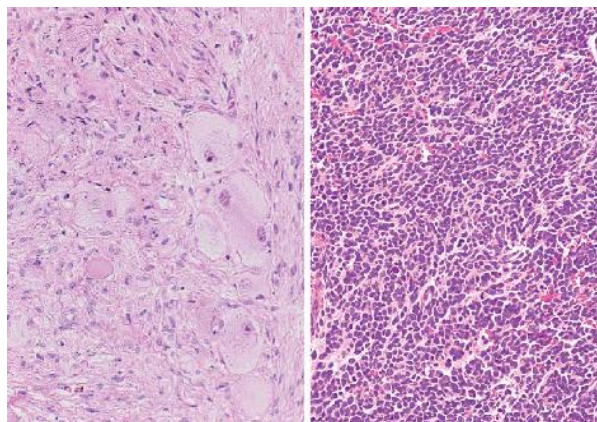


Figura 19. Els tumors neuroblàstics varien en grau de diferenciació. **Esquerra** | Neuroblastoma, estroma-ric amb cèl·lules de Schwann i ganglionars prominents. **Dreta** | Neuroblastoma, estroma-pobre format per petites cèl·lules arrodonides densament compactades i amb escàs citoplasma. Adaptat de (Maris et al., 2007).

2. Ganglioneuroblastoma intermedi (estroma ric en cèl·lules de Schwann)

Es tracta d'una categoria intermèdia que posseeix característiques d'ambdós, neuroblastomes i ganglioneuromes ben diferenciats, i on la proporció del component ganglionar respecte el neuroblàstic ha de ser superior al 50 % del volum total de la secció del tumor observada (Figura 19 Esquerra). Els focus de cèl·lules neuroblàstiques, formats per una barreja de cèl·lules en diferents estadis de diferenciació estan ben definits i es troben repartits de forma aleatòria pel teixit ganglioneuromatós.

3. Ganglioneuroma (estroma on dominen les cèl·lules de Schwann)

Existeixen dos subtipus de ganglioneuromes: (i) el ganglioneuroma en maduració està format per un estroma ganglioneuromatós dominant i focus de neuroblasts diferenciats i/o de cèl·lules ganglionars en maduració, acompanyat de cèl·lules ganglionars madures. En el total del teixit tumoral predomina l'estroma ric en cèl·lules de Schwann. (ii) el ganglioneuroma madur és un subtipus caracteritzat per un estroma format per cèl·lules de Schwann i cèl·lules ganglionars, sense component neuroblàstic.

4. Ganglioneuroblastoma nodular (barreja d'estroma ric/estroma dominant /estroma pobre)

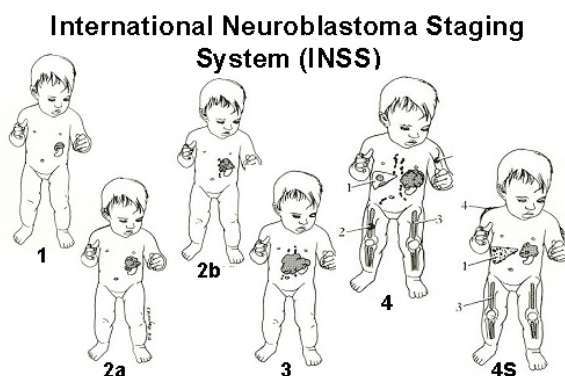
Es caracteritza per la presència de nòduls neuroblàstics macroscòpics (d'estroma pobre en cèl·lules de Schwann) i freqüentment hemorràgics, coexistent amb ganglioneuroblastoma intermedi o ganglioneuroma. L'estroma es defineix com a barreja per estar el tumor format per clons biològicament diferents. Existeixen quatre variants de ganglioneuroblastomes nodulars: (i) clàssic, amb les característiques que acabem de d'escriure; (ii) de múltiples nòduls, visibles macroscòpicament; (iii) gran, quan el teixit macroscòpicament s'assembla al neuroblastoma, però microscòpicament s'observa que està envoltat per teixit ganglioneuromatós; (iiii) sense nòdul, quan el tumor primari és un ganglioneuroblastoma però s'ha produït metàstasi amb característiques neuroblàstiques.

Classificació clínica i biològica

Per tal de facilitar la comparació dels processos clínics en tot el món, la Fundació de Recerca Wiliam Guy Forbeck va promocionar una conferència internacional ara fa més de 20 anys. Els resultats de la conferència van publicar-se com el **Sistema de Classificació Internacional dels Neuroblastomes** (*International Neuroblastoma Staging System (INSS)*), adquirint aquesta

classificació gran rellevància internacional (Brodeur et al., 1993; Kushner et al., 1996). En l'actualitat és el mètode més utilitzat en termes de documentació de l'estadi i extensió de la progressió de la malaltia, tant en el moment del diagnòstic com per a establir un protocol de tractament adequat (Ishola and Chung, 2007; Maris et al., 2007).

El INSS classifica els neuroblastomes en diferents estadis d'acord amb la localització i extensió del tumor primari, i l'absència o presència de metàstasi, tal i com s'especifica en la Taula 1.



Taula 1

Sistema Internacional de Classificació dels Neuroblastomes (INSS)	
Estadi	Definició
1	Tumor localitzat amb resecció complerta amb o sense malaltia residual microscòpica; nòduls limfàtics ipsolaterals negatius per tumor (els nòduls enganxats al tumor poden ser positius)
2A	Tumor localitzat amb resecció incompleta; nòduls limfàtics ipsolaterals no adjacents negatius
2B	Tumor localitzat amb o sense resecció complerta amb nòduls limfàtics ipsolaterals no adjacents positius per tumor; nòdul limfàtics contralaterals negatius
3	Tumor unilateral sense possible resecció infiltrat a través de la línia mitja, amb o sense implicació dels nòduls limfàtics regionals; o tumor unilateral localitzat amb implicació dels nòduls limfàtics de la regió contralateral; o tumor en la línia mitja amb extensió bilateral per infiltració (impossible la resecció) o per implicació de nòdul limfàtics
4	Qualsevol tumor primari amb disseminació a nòduls limfàtics distants, os, medulla òssia, fetge, pell o altres òrgans (excepte els definits en estadi 4S)
4S	Tumor primari localitzat (com està definit per als estadis 1, 2A o 2B), en infants amb edat inferior a l'any amb disseminació limitada a pell, fetge o medulla òssia (<10% cèl·lules malignes)

Adaptat de Maris et al. (2007)

Endemés de la constatada importància pronòstica de la classificació histològica i clínica, estudis simultanis han evidenciat una bona correlació entre la diversitat en comportament clínic dels neuroblastomes i algunes característiques biològiques d'aquests tumors. Des de llavors múltiples combinacions de variables pronòstiques han estat utilitzades per a la classificació en grups de risc i de tractament. No obstant, els factors seleccionats per a l'assignació dels tumors en aquests grups no són uniformes; l'amplificació de NMYC com a factor de pronòstic desfavorable és emprada per tots en la classificació en grups de risc i decisions terapèutiques, però altres característiques genètiques pronòsticament significatives no han estat incorporades en tots els esquemes de classificació, i només alguns grups inclouen la histologia tumoral (Ambros et al., 2002; Mora et al., 2001b; Umehara et al., 2000).

Amb la finalitat de desenvolupar una aproximació consens dels pacients amb neuroblastoma de tot el món que també inclogués marcadors biològics, es va dissenyar un nou sistema de classificació, el Sistema de Classificació Internacional dels Neuroblastomes en Grups de Risc (*International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System (INRGSS)*). Un equip de treball format per representants de les majors cooperatives pediàtriques de tot el món es va trobar al 2005 per tal d'analitzar les dades obtingudes de 11054 pacients. L'esquema consensuat de classificació resultant d'aquest esforç inclou en l'esquema de classificació: l'estadi INRG (descriu a continuació), l'edat, la categoria histològica, el grau de diferenciació, l'estat de NMYC, la presència o absència d'aberracions en 11q i la ploïdia cel·lular. Com a resultat de la utilització d'aquests criteris s'obtenen 16 grups pretractament de pacients estadística i/o clínicament diferents (l'listats de la A a la R) (Taula 2) (Figura 20) (Maris et al., 2007; Monclair et al., 2009; Mullasery et al., 2009).

En el INRGSS, l'extensió de la malaltia locoregional es determina per l'absència o presència de factors de risc, **L1** i **L2** respectivament, sent aquests generalment tumors de baix risc. L'estadi **M** s'utilitza per la malaltia àmpliament disseminada (tumors de pronòstic nefast), i el **MS** descriu aquells neuroblastomes que metastatitzen únicament a pell, fetge i medulla òssia sense implicació de l'os cortical, i en infants de 0 a 18 mesos amb tumors primaris L1 o L2 (en aquest darrer grup s'englobaria aquells neuroblastomes que es caracteritzen per regressió espontània o diferenciació, inclús sense cap tipus de tractament).

En aquestes classificacions, cada cop són més utilitzades les tècniques d'imatge, que ajuden tant en el diagnòstic com en l'avaluació de la progressió i extensió de la malaltia a òrgans adjacents. Les radiografies, els ultrasons, la tomografia computaritzada, la ressonància magnètica i l'escàner ossi, es troben entre les més utilitzades ((Castleberry, 1997) (Figura 21). Existeixen a més a més evidències de que les característiques radiològiques del tumor primari són útils a l'hora de predir el succés i seguretat de la cirurgia (Cecchetto et al., 2005).

Taula 2

Sistema de Classificació Internacional dels Neuroblastomes en Grups de Risc							
Estadi INRG	Edat (mesos)	Categoria Histològica	Grau de diferenciació tumoral	NMYC	Aberració 11q	Ploidia	Pretactament de Grup de Risc
L1/L2		GN en maduració; GNB intermitg					A Molt baix
L1		Qualsevol, excepte el GN en maduració; GNB intermitg		NA			B Molt baix
				Amp			K Elevat
L2	< 18	Qualsevol, excepte el GN en maduració; GNB intermitg		NA	No		D Baix
					Si		G Intermedi
	≥ 18	GNB nodular; NB	Diferenciat Pobrament diferenciat o indiferenciat	NA	No		E Baix
					Si		H intermedi
M	< 18			NA		Hiperdiploid	F Baix
	< 12			NA		Diploid	I intermedi
	De 12 a < 18			NA		Diploid	J Intermedi
	< 18			Amp			O Elevat
	≥ 18						P Elevat
MS				NA	No		C Molt Baix
					Si		Q Elevat
				Amp			R Elevat

GNB: ganglioneuroblastoma; GN: ganglioneoroma; NB: neuroblastoma; NA: no amplifica; Amp.: amplificant
Adaptat de Cohn et al. (2009)

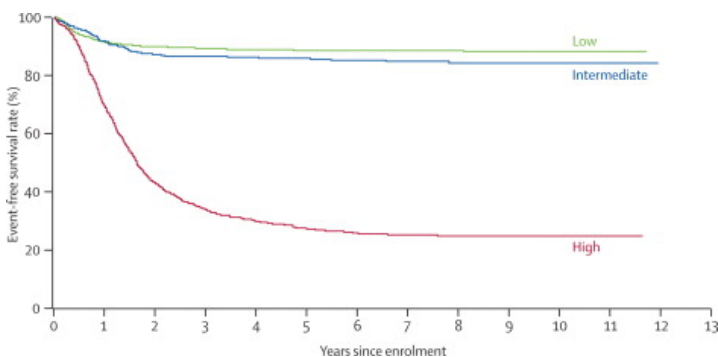


Figura 20. Supervivència dels pacients amb neuroblastoma en base al seu grup de risc. Adaptat de Maris et al. (2007).

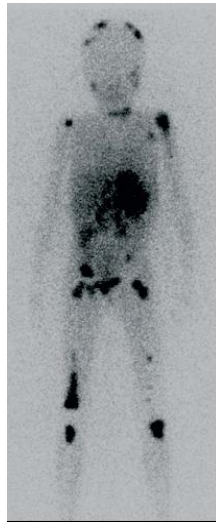


Figura 21. Diagnòstic per l'imatge. L'escintigrafia amb el marcador metaiodobenzilguanidina (MIBG) (es concentra selectivament en més del 90 % dels neuroblastomes) permet visualitzar els múltiples focus de malaltia, incloent os i teixit tou. Adaptat de Maris et al. (2007).

La genètica dels neuroblastomes

En les darreres dècades, diverses aberracions genètiques s'han identificat en tumors neuroblàstics i línies cel·lulars tumorals de neuroblastoma. Els patrons emergents de múltiples defectes genètics, com l'aneuploïdia, guanys i pèrdues cromosòmiques i l'amplificació de material cromosòmic, semblen reflectir les diferents entitats clíniques i han conduït a una millor classificació terapèutica dels pacients. A continuació resumirem breument aquelles aberracions genètiques clínicament més rellevants (Janoueix-Lerosey et al., 2010; van Noesel and Versteeg, 2004; Van Roy et al., 2009).

L'aberració genètica més habitualment associada a mal pronòstic en el neuroblastoma és **l'amplificació genòmica de l'oncogen NMYC** (de 50-500 còpies). NMYC pertany a la família d'oncogens MYC, i actua com a activador transcripcional formant heterodímers d'unió a l'ADN amb la proteïna MAX, un membre de la família MAX/MAD (Wenzel and Schwab, 1995). Aquest factor oncogènic es troba àmpliament expressat en la perifèria de la cresta neural i té funcions crítiques en la regulació de la progressió pel cicle cel·lular, la diferenciació i l'apoptosi (Johnsen et al., 2009). Dades recents suggereixen que l'expressió gènica elevada de NMYC/c-MYC és un marcador de progressió maligne en els neuroblastomes, i que c-MYC probablement tingui un paper important en aquells tumors agressius que no tenen NMYC amplificat (Janoueix-Lerosey et al., 2010). L'amplificació de NMYC es produeix en més del 20 % dels tumors primaris i

correlaciona fortament amb estadis avançats de la malaltia i poc èxit terapèutic (van Noesel and Versteeg, 2004; Van Roy et al., 2009). La seva associació amb mal pronòstic en pacients que si no fos per aquest motiu tindrien bon pronòstic, com tumors locoregionals o malaltia en estadi 4S segons la classificació INSS, posa de manifest la seva importància biològica, tot i que la seva participació en el fenotip agressiu encara no es ben coneguda. Actualment l'amplificació de NMYC s'utilitza en la identificació dels pacients d'elevat risc i forma part de tots els criteris internacionals per a la classificació d'aquests pacients en grups de tractament (Maris et al., 2007; van Noesel and Versteeg, 2004).

L'amplificació de l'oncogen NMYC s'associa a més a més a la sobreexpressió del factor de transcripció H-TWIST (Puisieux et al., 2006). Es pensa que la cooperació entre aquestes dues oncoproteïnes participa en el desenvolupament del neuroblastoma, N-Myc promovent la proliferació cel·lular i H-Twist contrarrestant les propietats proapoptòtiques de la sobreexpressió de N-Myc mitjançant el bloqueig de la via ARF/p53 (Puisieux et al., 2006; Valsesia-Wittmann et al., 2004).

Delecions de braç curt del cromosoma 1 (1p) s'han identificat en un 25-35 % dels neuroblastomes primaris. Aquestes delecions correlacionen amb l'amplificació de NMYC i amb estadis avançats de la malaltia. No obstant, el gen o gens en el cromosoma 1p involucrats en la patogènesi dels neuroblastomes no han pogut ser identificats tot i la intensa recerca. Si la pèrdua d'heterozigosi deguda a la deleción dels al·lèls de 1p és un indicador independent de pronòstic, segueix sent controvertit. No obstant, algunes evidències suggereixen que la pèrdua d'al·lèls en 1p36 prediuen un risc incrementat de recaiguda en pacients amb tumors localitzats (Maris et al., 2007; van Noesel and Versteeg, 2004; Van Roy et al., 2009).

La pèrdua al·lèlica del braç llarg del cromosoma 11 (11q) es troba present en més d'un 22 % dels tumors primaris. Aquesta aberració genètica rarament s'observa en tumors amb NMYC amplificat, tot i que si es manté associada a altres característiques indicatives d'elevat risc (Guo et al., 2000; Spitz et al., 2003). Les dades suggereixen que un o més gens supressors de tumors es localitzen en 11q, trobant-se inactivats en els tumors malignes d'elevat risc sense amplificació de l'oncogen NMYC (Maris et al., 2007; van Noesel and Versteeg, 2004; Van Roy et al., 2009).

El guany de 1-3 còpies addicionals de 17q, sovint a través d'una translocació amb el cromosoma 1 o 11, també correlaciona amb un fenotip més agressiu (Bown et al., 1999). Aquesta és l'aberració genètica més comú, produint-se aproximadament en el 80 % dels neuroblastomes. Els punts de trencament de 17q varien, però el guany d'una regió que es troba entre 17q22-qter suggereix que l'efecte dosi d'un o més gens proporciona avantatges selectius. Els gens

candidats inclouen BIRC5 (survivina), NME1 i PPM1D, els qual es troben sobreexpressats en aquest subgrup de tumors (Maris et al., 2007; van Noesel and Versteeg, 2004; Van Roy et al., 2009).

L'índex de DNA o ploïdia també és un marcador pronòstic per a pacients amb edats inferiors als 2 anys amb malaltia disseminada. L'aneuploïdia (guanys i/o pèrdues d'un o més cromosomes d'un genoma diploïd) és una forma d'instabilitat gènica freqüentment observada en els neuroblastomes. El contingut en ADN d'aquests tumors pot separar-se en dos grups: propers a la diploïdia (aproximadament el 45 %) o hiperdiploïds, sovint propers a la triploïdia (aproximadament el 55 %). Els mecanismes que condueixen a aquestes formes d'instabilitat genètica en els càncers humans i en els neuroblastomes són encara poc clares. Models genètics de neuroblastomes suggereixen que els tumors menys agressius tenen un defecte fonamental en la mitosi associada al global de guanys i pèrdues cromosòmiques, que podrien explicar perquè la proximitat a la triploïdia sembla ser favorable (Kaneko, 1990; Look et al., 1991). Pel contrari, els més malignes tenen un defecte fonamental en la seva estabilitat genòmica que resulta en reorganitzacions cromosòmiques, translocacions desequilibrades i manteniment d'un contingut d'ADN proper a la diploïdia (Brodeur, 2003). En general, podríem dir que lesions genètiques encara no identificades serien la causa dels defectes en la ploïdia observats en els neuroblastomes (van Noesel and Versteeg, 2004; Van Roy et al., 2009).

La predisposició hereditària als neuroblastomes únicament s'ha observat en un 1% dels pacients, però les seves causes són encara molt poc conegudes. Recentment s'han identificat mutacions en els gens PHOX2B i ALK com a factors que predisposen a aquesta neoplàsia, estant ambdós gens implicats en el desenvolupament del sistema nerviós, podent ésser el nexa d'unió entre aquest procés i l'origen d'aquest càncer (Janoueix-Lerosey et al., 2010).

Tractament

Els mètodes de tractament emprats en la teràpia contra el neuroblastoma inclouen la cirurgia, la quimioteràpia, la radioteràpia i la immunoteràpia, així com únicament l'observació en alguns casos cuidadosament seleccionats. Tot i que la malaltia localitzada pot ésser tractada únicament per cirurgia, la teràpia estàndard per als pacients amb metàstasi normalment inclou quimioteràpia intensa, cirurgia local i quimioteràpia mieloablative, seguida de transplantament de cèl·lules mare autòlogues, radioteràpia externa i tractament amb àcid retinoic. El rang de supervivència global pels infants amb neuroblastoma metastàtic és aproximadament del 40%, tot i l'intensa teràpia multimodal (Ishola and Chung, 2007; Mullasery et al., 2009).

Els agents quimioterapèutics més comunament utilitzats són la ciclofosfamida, l'ifofosfamida, la vincristina, la doxorubicina, el cisplatí, el carboplatí, l'etoposid i el melfalan. Per als tumors d'estadis més avançats però, la combinació terapèutica resulta inefectiva per a erradicar la malaltia, no obstant sovint redueix la mida del tumor primari en estadis avançats, permetent la seva resecció. Tot i que la teràpia combinada intensa produeix una millora en la supervivència a llarg termini, aproximadament el 50 % dels pacients amb neuroblastoma d'elevat risc acaben desenvolupant recidives, i les toxicitats secundaries segueixen sent un problema crucial. Nous adjuvants i/o agents terapèutics són necessaris per a millorar els efectes beneficiosos de la quimioteràpia i reduir els efectes secundaris adversos. Entre els potencials tractaments i/o adjuvants terapèutics futurs trobem la teràpia amb àcid retinoic, la inhibició de les vies activades per NMYC, la modulació de pèptids pro-angiogènics i la manipulació epigenètica (Ishola and Chung, 2007; Mullasery et al., 2009).

Característiques dels diferents tipus cel·lulars presents en cultius cel·lulars i tumors primaris

Són varis els treballs que des del 1973 han revelat la presència de tres tipus cel·lulars en les línies cel·lulars de neuroblastoma humà, les anomenades tipus N, semblants a cèl·lules precursors simpaticoadrenals, les tipus S, cèl·lules no neuronals, adherents a substrat, que representen cèl·lules precursors glials/melanoblàstiques, i el fenotip anomenat I, d'intermedi, per presenta una morfologia intermèdia entre les N i les S, amb característiques que resembren aquelles de les cèl·lules mare (Figura 21) (Ciccarone et al., 1989; Ross et al., 2003; Ross and Spengler, 2007; Walton et al., 2004).

En cultiu cel·lular els tres tipus cel·lulars tenen diferents patrons de creixement i morfologia. Les **tipus N** (neuroblàstic/neuroendocrí), provinents de llinatges específics de la cresta neural, tenen aparença de neuroblasts immadurs, amb cossos cel·lulars petits i un elevat ràtio nucli/citoplasma, neurites curtes, i en ocasions nombroses. La majoria de cultius cel·lulars tipus N tenen una elevada densitat de saturació i es caracteritzen per la formació d'agregats i una baixa adhesió a substrat. Les cèl·lules **tipus S** en canvi tenen el seu origen en cèl·lules precursors de les cèl·lules de Schwann i melanoblàstiques, caracteritzant-se per la seva mida, força més gran que la de les anteriors, la no presència de processos neurítics i la capacitat d'adherir-se fortament a substrat. Són cèl·lules planes i llargues, amb un nucli ovalat prominent i abundant citoplasma. Poden presentar fil·lopodis però no processos neurítics. En cultiu formen monocapes i mostren inhibició per contacte. El tercer fenotip, les cèl·lules **tipus I**, mostren una

morfologia i característiques intermèdies entre les N i les S. S'adhereixen igual de bé a substrat que a altres cèl·lules, tenen un nucli rodó i prominent com les cèl·lules N, però una major quantitat de citoplasma, i poden o no tenir neurites ocasionals. En cultiu creixen en múltiples capes amb agregats multifocals. Aquestes cèl·lules semblen representar una cèl·lula mare més primitiva, amb capacitats de diferenciació bidireccional i d'autorenovació. (Ross and Spengler, 2007; Walton et al., 2004).

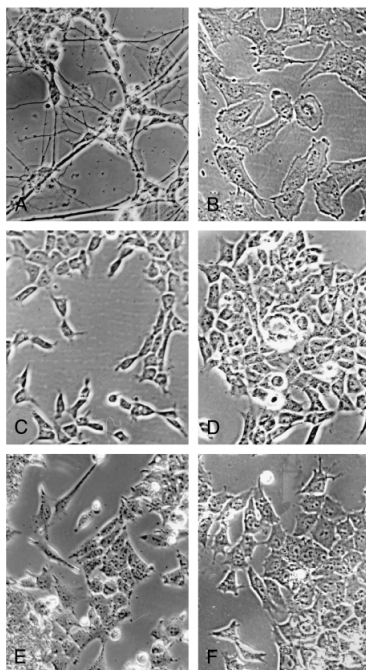


Figura 22. Fotografies de microscopia de contrast dels tres fenotips presents en les cèl·lules de neuroblastoma. A | Cèl·lules tipus N, SK-N-CH. **B** | Cèl·lules tipus S, SH-EP1. **C** | Cèl·lules tipus I, SK-N-JD; **D** | SK-N-LP; **E** | SK-N-HM; i **F** | SK-N-ER. Adaptat de Walton et al. (2004).

Aquests tres tipus fenotípics presents en la majoria de línies cel·lulars tenen diferents potencials tumorigènics ((Spengler et al., 1997). Mentre les tipus S semblen no ser malignes, al mostra nul o mínim creixement independent d'ancoratge en agar tou i no formar tumors en ratolins atímics, les N formen tumors en un 30- 100 % dels ratolins atímics inoculats, i tenen eficiències de creixement en agar tou força superiors a la de les S. Per últim, el fenotip I és el que mostra una major capacitat per formar tumors i les millors eficiències de creixement dels tres tipus cel·lulars.

Estudis bioquímics han confirmat aquests tres tipus cel·lulars. Les cèl·lules N contenen tirosina hidroxilasa, dopamina- β -hidroxilasa i les tres proteïnes del neurofilament (NF68, NF100 i NF200) entre d'altres. Mentre que les cèl·lules tipus S tenen un fenotip similar al de les cèl·lules precursors de Schwann/glials/melanobàstiques i mostren marcadors comuns amb aquestes, el filament intermedi vimentina, la proteïna receptora de membrana involucrada en les interaccions cèl·lula/matriu CD44, la proteïna d'unió actina ACTN i la proteïna nuclear S100A6 (calciolina), junt amb l'absència de marcadors neuronals. Les cèl·lules tipus I expressen marcadors d'ambdós tipus cel·lulars, suggerint que aquest fenotip podria correspondre al d'una cèl·lula precursora que podria originar els fenotips més diferenciats N i S. De moment s'han suggerit com a marcadors proteics d'aquestes cèl·lules CD133 i c-kit (CD117), ambdós presents en cèl·lules mare (Ross and Spengler, 2007; Walton et al., 2004).

Tots tres tipus cel·lulars són multipotents, mostrant ser cèl·lules precursors capaces de diferenciar-se seguint diferents rutes de diferenciació de la cresta neural (Ross and Spengler, 2007). Les cèl·lules I poden convertir-se tan en les S com en les N (Ross et al., 2002). Les N poden diferenciar-se en cèl·lules neuronals o glials, mentre les S poden diferenciar-se en melanòcits, cèl·lules de múscul llis o cèl·lules de Schwann (Sugimoto et al., 2000). En cultiu a més a més les S poden transdiferenciar en N i a l'inversa (Sugimoto et al., 1988; Tsunamoto et al., 1988).

Aquesta heterogeneïtat cel·lular també s'ha observat en tumors primaris de neuroblastoma, on el marcatge histològic ha mostrat la presència de neuroblasts en diferents estadis de diferenciació (cèl·lules N), de cèl·lules estromals (S), d'origen tumoral o no, i cèl·lules intermèdies I (Mora et al., 2001a; Ross et al., 2003). Així doncs les línies cel·lulars de neuroblastoma no són artefactes del cultiu *in vitro*, sinó que molt probablement representin l'heterogeneïtat cel·lular present en un tumor *in vivo*, i per tant els resultats dels estudis de resposta a agents morfògens i quimioterapèutics realitzats en cultiu en les diferents variants cel·lulars del neuroblastoma, poden servir com a guia directe del que podria produir-se en el pacient.

Les Prodiginines i la Prodigiosina

Introducció

La natura és una inesgotable font de compostos químics amb activitats biològiques interessants per a aplicacions mèdiques (Newman and Cragg, 2007). Aquest va ser el motiu pel qual el grup del Dr. Ricardo Pérez-Tomás, amb el qual varem col·laborar durant la realització d'aquesta tesi doctoral, es va interessar en la identificació de substàncies d'origen natural amb propietats anticanceroses. La recerca elaborada en el seu grup a partir del sobrenedant obtingut de la cepa bacteriana *Serratia marcescens* 2170, va permetre identificar una substància química amb propietats anticanceroses, el tripirrol conegut com a prodigiosina (PG). La realització d'alguns estudis amb aquest compost va proporcionar resultats prometedors en línies canceroses humanes, dades que ens van animar a estudiar el seu efecte en el nostre model de treball.

Història del bacteri *Serratia marcescens* (*S.marcescens*)

En el pa conservat en determinades condicions de temperatura i humitat poden desenvolupar-se unes colònies de bacteris que li proporcionen una coloració vermellosa i un aspecte viscos, una aparença que les creences populars relacionaven amb “pa ensagat”. És impossible saber amb exactitud quan va ser la primera vegada que algú va veure, aparentment, un aliment “ensagat”. El primer relat del que es té constància referent a aquest fet data del 332 a.C., quan Alexandre Magne i les seves tropes estaven assetjant la ciutat de Tiro, en plena conquesta d'Àsia. Aquesta és probablement la primera referència a una contaminació deguda a *S.marcescens*. Les colònies d'aquest bacteri, a l'arribar a la seva madures, adquireixen un aspecte vermellós i viscos que es pot confondre amb el de la sang. Aquest fet deuria succeir en molt llocs del món, però és en la societat occidental on es troba el major testimoni escrit, degut a la gran controvèrsia religiosa que va causar (Gaughran, 1969).

Durant l'edat mitja, es van succeir en Europa diversos casos de “miracles” consistents en l'aparició de sang en el pa consagrat utilitzat en la cerimònia cristiana de l'Eucaristia. No seria fins molt més tard que es va atribuir aquest fet al creixement de la bactèria *S.marcescens*. El més famós d'aquests successos va ocórrer al 1263 durant la celebració d'una missa en una petita església prop del llac Bolsena, a Itàlia. El sacerdot que oficiava la missa patia una crisi de fe i a l'anar a beneir els elements de la comunió, va veure com des del pa consagrat “gotejava

sang” fins a tacar el seu hàbit. Aquest succés fou anomenat “El Miracle de Bolsena”, essent la causa de l’institució de la celebració religiosa del Corpus Cristi (Figura 23).



Figura 23. El Miracle de Bolsena. Pintura realitzada per Rafael que es troba en una de les parets del Vaticà. El mossèn Pere de Praga es mostra preparant la comunió en l'església de Santa Cristina a Bolsena, Itàlia. La imatge mostra a un Pere sorprès al descobrir “sang” en el pa consagrat.

Les aparicions de sang possiblement atribuïbles a *S.marcescens* han estat moltes durant el curs de l'història, però no va ser fins al 1819 que una sèrie de successos foren clau per a desvetllar dit misteri. En un petit poble anomenat Pione di Sacco va saltar l'alarma al aparèixer, en molt poc temps, nombrosos casos d'aliments sanguinolents en las cases de molts veïns. Va ser llavors quan, per primera vegada, es va dur a terme una investigació oficial sota la direcció del Dr. Vincenzo Sette per tal de descobrir que era el causant de dites taques vermelloses en el menjar. En Sette va concloure què un fong era el causant de d'aquest fenomen, anomenant a l'organisme *Zoogalactina imetropa*, del grec “limo/baba vivent situada en el menjar” (Bennett and Bentley, 2000).

Al mateix temps, i de forma independent, un farmacèutic anomenat Bartolomeo Bizio, que posteriorment seria professor de la Universitat de Pàdua, va examinar unes taques vermelloses sobre polenta, una sèmola de blat molt coneguda a Itàlia. Bizio també va classificar l'organisme

com un fong i el va anomenar amb el nom que s'utilitza en l'actualitat de *S.marcescens* (Bizio B, 1823). Va emprar el nom de *Serratia* en honor al físic italià Serafino Serrati, inventor de la màquina de vapor i *marcescens*, del llatí "macerat" per l'aspecte mucilaginos de la substància.

Ambdós van cometre l'error de catalogar-lo com a fong però foren els primers en donar explicació als anomenats "miracles" a l'evidenciar que el material rogenc que apareixia en el menjar era degut a un organisme viu, i que es podia transmetre per inoculació com si fossin llavors. Alhora, van contribuir en gran mesura a la microbiologia moderna al ser els primers en utilitzar un medi sòlid, la polenta, per a cultivar microorganismes.

El gènere *Serratia*

El gènere *Serratia* està classificat dins de la família de les *Enterobacteriaceae*. Són bacils de 0.5-0.8 µm de diàmetre i 0.9-2.0 µm de longitud, gram-negatiu, anaerobis facultatiu, quimioorganotròfics i generalment mòbils gràcies a flagels peritrics. Creixen bé de 30-37 °C i es poden trobar en ambients molt diversos, des de mostres clíniques, terra, aigua, superfície de plantes, tracte digestiu de rosegadors i insectes, etc. Algunes espècies poden estar involucrades en bacterièmies o poden ser aïllades a partir d'espurts sense cap importància clínica. Algunes causen mastitis en vaques i altres infeccions animals (Holt et al., 1994). En l'actualitat, dins del gènere *Serratia* podem trobar deu espècies diferents: *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans* y *S. rubidaea* (Holt et al., 1994). Algunes espècies i biotips de *Serratia* produeixen el pigment rogenc anomenat prodigiosina, que pot variar de tonalitat, dependent de l'edat de la colònia. La producció del pigment depèn d'unes condicions específiques del medi de creixement (Hearn et al., 1968; Quadri and Williams, 1974). De totes les espècies del gènere, només *S.marcescens* (Figura 24), *S.plymuthica* y *S.rubidaea* són productores de PG (Grimont and Grimont, 1978).

S.marcescens és un bacteri sapròfit que es troba en nínxols ecològics molt diversos, essent freqüent en aliments rics en midó, i endemés creix en condicions extremes, inclús en presència de desinfectants, antisèptics i aigua destil·lada (Grimont and Grimont, 1978). És un bacteri patogen oportunista que provoca infeccions nosocomials en pacients hospitalitzats, causant septicèmia, meningitis, infeccions del tracte respiratori i urinari, endocarditis i infecció de ferides (Holt et al., 1994). Existeix una elevada tendència entre les soques hospitalàries a ser no pigmentades, i difícilment diferenciables d'altres organismes coliforms, mentre que els biotips pigmentats són ubics (Hejazi and Falkiner, 1997).



Figura 24. *Serratia marcescens*. Esquerra | Placa de cultiu de colònies de la bactèria cromogènica *S. marcescens*. Degut al característic color vermell del metabòlit secundari prodigiosina les colònies semblen gotetes de sang. Dreta | Imatge de microscopia electrònica del bactèria *S. marcescens*.

Les prodiginines

La prodigiosina pertany a la família de les prodiginines, una família de pigments vermells que són metabòlits secundaris bioactius produïts tant per bacteris grampositius com gramnegatius, que es caracteritzen per compartir una estructura química bàsica tripirròlica, coneguda com a **prodigiosen**. Recentment, aquestes molècules han tornat a despertar interès degut a les seves propietats immunosupressores i anticanceroses.

En la natura, aquests metabòlits secundaris són produïts per un grup restringit d'eubacteris i actinomicets, havent-se aïllat majoritàriament de bacteris gramnegatius. Els organismes més rellevants són *Serratia* spp, *Streptomyces* spp i varies bactèries marines incloent *Hahella chejuensis* i *Pseudoalteromonas denitrificans*. De les deu espècies de *Serratia* només tres, *S. marcescens*, *S. plymuthica* i *S. rubidaea* han estat descrites com a productores de prodigiosina. Pigments similars a la prodigiosina han estat aïllats de diversos bacteris, incloent *Streptomyces coelicolor*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrus* i γ -*Proteobacterium* entre d'altres (Figura 25) (Bennett and Bentley, 2000).

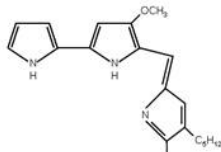
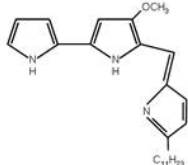
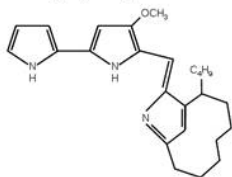
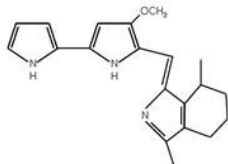
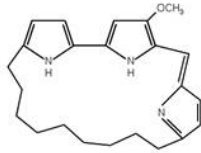
Prodigionina	Grup	Especie productora	Referències
<p>Prodigiosina</p> 	1	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia 390006</i> , <i>Serratia plymuthica</i> , <i>Hahella chejuensis</i> , <i>Pseudomonas magnesorubra</i> , <i>Vibrio psychroerythreus</i>	Hubbard, 1950 Williams, 1980 Jeong, 2005 Gerber, 1975
<p>Undecilprodigiosina</p> 	1	<i>Streptomyces longisporus ruber</i> , <i>Streptoverticillium rubrirelicul</i> , <i>Actinomadura maduroe</i> , <i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i> , <i>Saccharopolyspora sp. nov.</i>	Williams, 1980 Tsao, 1985 Stepkowski, 2002
<p>Butil-meta-cicloheptylprodigionina</p> 	2	<i>Saccharopolyspora sp. nov.</i> , <i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	Stepkowski, 2002
<p>Cicloprodigiosina</p> 	3	<i>Vibrio gazogenes</i> , <i>Alteromonas rubra</i> , <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	Gerber, 1979 Kawauchi, 1997
<p>Ciclononilprodigionina</p> 	4	<i>Actinomadura pelletieri</i> , <i>Actinomadura madurae</i>	Gerber, 1975

Figura 25. Exemples de prodigionines i bacteris productores. Estructura química d'algunes prodigionines pertanyents a diferents grups estructurals i els corresponents bacteries productors. Modificat de Williamson et al. (2006).

Les prodiginines poden ésser classificades en quatre grans grups a partir del nucli molecular, el prodigiosen, en base als substituents que en ell es troben i la seva estructura (Bennett and Bentley, 2000) (Figura 25):

1. **Tripirrols amb cadenes lineals.** Entre els que cal destacar la prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigiose) i l'undecilprodigiosina (cadena lateral undecil en el carboni 2).
2. **Derivats cíclics amb un anell format entre les posicions 2 i 4 de l'anell C del pirrol.** Com la butil-meta-cicloheptilprodiginina i la etil-metaciclonoilprodiginina (metacicloprodigiosina).
3. **Derivats cíclics amb un anell entre les posicions 3 i 4 de l'anell C del pirrol i un grup metil en el carboni 2.** Com la cicloprodigiosina hidroclore.
4. **Prodiginines macrocíclics o derivats cíclics amb un anell format entre la posició 2 del pirrol C i la posició 10 del pirrol A.** Com la ciclonoilprodiginina i la ciclometildecilprodiginina.

Activitat biològica de les prodiginines

Les prodiginines són una família de compostos químics amb propietats molt diverses. Moltes han estat descrites com potents agents **antimalàrics**, como és el cas de la cicloprodigiosina (Kim et al., 1999a), la ciclonoilprodiginina i la ciclometildecilprodiginina (Gerber, 1969).

També s'han caracteritzat propietats **antifúngiques** i **antibacterianes** atribuïdes a les prodiginines de ceps del gènere *Serratia* (Bennett and Bentley, 2000; Gerber, 1969), així com propietats **algicides** a algunes prodiginines com PGL-1, un pigment de la família produït per una bactèria marina (Kim et al., 2008; Nakashima et al., 2006).

Més recentment, las prodiginines han despertat un creixent interès por les seves propietats com a **immunosupressors** i agents anticancerosos (Montaner and Perez-Tomas, 2003; Pandey et al., 2007; Pandey et al., 2009). La capacitat d'inhibir específicament la proliferació de limfòcits T ha estat descrita àmpliament en estudis amb l'undecilprodigiosina, tant *in vitro* (Songia et al., 1997; Tsuji et al., 1992) como *in vivo* (Nakamura et al., 1989; Tsuji et al., 1992). La cicloprodigiosina hidroclore (Kawauchi et al., 1997) i la metacicloprodigiosina (Magae et al., 1996) també posseeixen propietats immunosupressores. PNU156804, un anàleg de l'undecilprodigiosina, inhibeix de manera eficaç la proliferació de limfòcits T y B evitant el rebuig de transplantaments humans (Stepkowski et al., 2002). Aquests estudis que suggereixen per a

les prodiginines un mecanisme d'acció diferent al dels coneguts immunosupressors ciclosporina A, FK506 i rapamicina, induint la inhibició de senyals mitogènics com a eix central d'aquest efecte (Pandey et al., 2007).

L'activació crònica del sistema immune per acció d'un agent patogen produeix una inflamació, que és nociva per a l'organisme infectat. Les espècies reactives d'oxigen, l'òxid nítric (NO) i el factor de necrosis tumoral (TNF- α), són les molècules inflamatòries més importants secretades pels macròfags. La PG-L-1, una molècula semblant a les prodigionines aïllada de *γ-Proteobacterium*, és capaç d'inhibir la generació de superòxids induïts per TPA en les cèl·lules promonocítiques U937 i en la línia cel·lular de macròfags RAW 264.7, mitjançant la inhibició de la NADPH-oxidasa, però efectes similars no s'han observat amb PG (Nakashima et al., 2005; Nakashima et al., 2008). Aquests resultats suggereixen que algunes prodiginines podrien tenir activitat antiinflamatòria i una possible aplicació en desordres inflamatoris.

Respecte a les propietats **anticanceroses** de les prodiginines, moltes d'elles tenen la capacitat d'induir mort cel·lular en diversos tipus de cèl·lules canceroses (Pandey et al., 2009; Perez-Tomas et al., 2003). Aquest és el cas de la cicloprodigiosina hidroclorete, la qual ha demostrat aquesta propietat *in vitro* en cèl·lules de leucèmia promielocítica (Yamamoto et al., 2000), i *in vitro* i *in vivo* en carcinoma hepatocel·lular (Yamamoto et al., 1999) i en càncer de mama (Yamamoto et al., 2002). La metacicloprodigiosina i l'undecilprodigiosina han mostrat propietats citotòxiques en diferents línies cel·lulars canceroses (Ho et al., 2007). La prodigiosina és capaç d'induir l'activació de processos de mort cel·lular o citostàtics en línies canceroses humanes d'origen hematopoètic i gastrointestinal (Campas et al., 2003; Castillo-Avila et al., 2005; Diaz-Ruiz et al., 2001; Montaner et al., 2000; Montaner and Perez-Tomas, 2001; Perez-Tomas and Montaner, 2003), i en cèl·lules de càncer de mama i de carcinoma de cèl·lules petites de pulmó (Ho et al., 2009; Llagostera et al., 2005; Soto-Cerrato et al., 2004). El seu efecte antimetastàtic s'ha demostrat, tan *in vitro*, en cèl·lules de carcinoma de pulmó humanes, com *in vivo*, en cèl·lules de melanoma de ratolí (Zhang et al., 2005b). L'anàleg N-alquilat de la prodigiosina 2,2'-[3-metil-1'amil-5'-metil-4-(1''-pirril)] dipirril-metà (MAMPDM), de recent identificació, disminueix la viabilitat tant de línies canceroses humanes com de ratolí (Deorukhkar et al., 2007; Deorukhkar et al., 2008).

Per últim també s'ha de destacar l'eficàcia anticancerosa del derivat de la prodigiosina anomenat Obatoclox mesylate (GX15-070MS), testat en línies cel·lulars humanes de mieloma i actualment en fase preclínica I per al tractament de la leucèmia limfocítica crònica (O'Brien et al., 2009; Trudel et al., 2007).

La prodigiosina

El nom prodigiosina (PG) es deu a Kraft, el qual va extreure “prodigiosine” de *Bacillus prodigiosus*, un antic sinònim de *S.marcescens*. Posteriorment, Gerber va proposar “prodiginina” com a nom trivial per a la porció aromàtica tripirròlica que conté el grup metoxi de l'estructura de la PG a l'identificar nous compostos de la família en actinomicets (Gerber, 1969). Un any més tard, Hearn va emprar el nom de “prodigiosen” per designar l'esquelet tripirròlic d'aquests pigments (Hearn et al., 1970). Els diferents compostos de la família de la prodigiosina tindran una nomenclatura o altre segons es considerin com esquelet el prodigiosen o la prodiginina, predominant com a nom general de la família el de prodiginines.

La prodigiosina (PG), 2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno ($C_{20}H_{25}N_3O$), és un pigment vermell amb estructura de tripirrol lineal i amb un pes molecular de 323.44 Dalton (Figura 26). És sensible a la llum, insoluble en aigua, moderadament soluble en alcohol i èter i soluble en cloroform, bromoform i benzè (Index Merck).

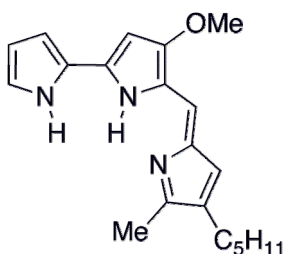


Figura 26. Estructura química de la prodigiosina

La PG té la capacitat de protonar-se, existint dues conformacions diferents, la α y la β , depenent de si es troba protonada o no, respectivament (Figura 27) (Manderville, 2001). Funciona como a indicador de pH (Hearn WR, et al., 1968), essent roja en soluciones àcides, amb una absorbància màxima de 537 nm, i groc-ataronjada en solucions alcalines, amb un màxim a 470 nm.

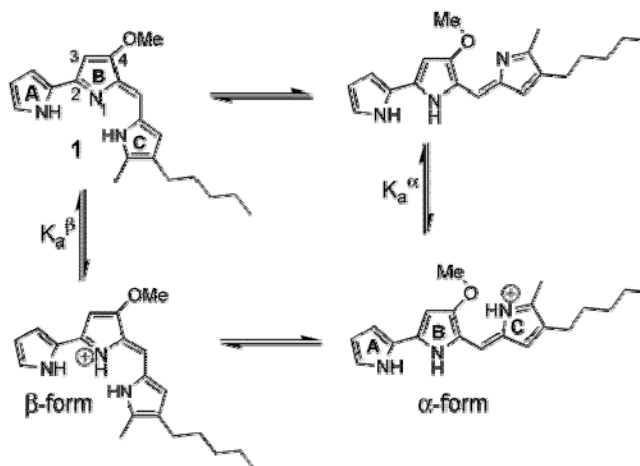


Figura 27. Protonació i equilibri d'interconversió dels rotàmers de la prodigiosina. Adaptat de Manderville (2001).

Tot i que el mecanisme per el qual la prodigiosina indueix la seva toxicitat encara no es coneix per complet, estudis realitzats relacionant la seva estructura amb la seva activitat han establert que l'anell A heterocíclic que conté nitrogen, i el grup metoxi que es troba en el C-4 són importants per a la seva potencia citotòxica (D'Alessio et al., 2000).

Mecanismes de toxicitat de les prodiginines

A partir d'alguns indicis experimentals s'ha especulat sobre els possibles mecanismes d'acció que podrien tenir les prodiginines a l'hora de produir els seus efectes farmacològics (Pandey et al., 2009; Perez-Tomas et al., 2003) (Figura 28):

1. Inhibidors del cycle cel·lular

Alteracions en la regulació del cycle cel·lular induïdes per les prodiginines es creu que podrien estar implicades en la seva citotoxicitat. Les prodiginines indueixen aturada del cycle cel·lular, tot i que les diferències existents en aquest procés suggereixen l'existència de diferents mecanismes d'acció depenent del membre de la família estudiat i el model utilitzat. Tot i així, al realitzar-se una valoració conjunta dels treballs fins al moment publicats en aquesta àrea, els resultats semblen indicar que les prodiginines inhibeixen el cycle cel·lular induint una aturada en la fase G1 del cycle cel·lular mitjançant el bloqueig dels senyals mitogènics primerencs que convergeixen en l'inhibidor del cycle cel·lular p21. No obstant, aquest efecte també ha estat observat en cèl·lules de càncer de colon tractades amb concentracions no apoptòtiques de prodigiosina, indicant un paper secundari d'aquest mecanisme en la citotoxicitat d'aquests

compostos, tot i contribuir en la seva activitat anticancerosa mitjançant la inhibició de la proliferació.

Les alteracions genètiques del gen supressor de tumors p53 es troben freqüentment associades als càncers humans i són un indicador de mal pronòstic. L'absència o expressió aberrant de p53 implica que l'apoptosi no es produeix en la cèl·lula tot i existir dany genètic. La prodiginosina indueix però apoptosi de manera p53-independent, la qual cosa pot representar un avantatge front a altres drogues quimioteràpiques.

2. Interacció i hidròlisi de l'ADN

La integritat genòmica és crucial per a la supervivència de l'organisme. Qualsevol dany a l'ADN inicia una cascada de senyalitzacions que culminen en l'aturada del cicle cel·lular per tal d'iniciar la seva reparació i, si el dany és molt greu i no és possible reparar-lo, la cèl·lula podria activar el programa apoptòtic (Ross WP et al, 2006). Les prodiginines són molècules molt hidròfobes que podrien difondre lliurement a través de les membranes i interaccionar amb l'ADN provocant ruptures en la doble cadena d'ADN. L'ADN pot patir trencaments de cadena senzilla, fàcilment reparables i generalment no tòxics per a la cèl·lula, o bé de doble cadena, més nocius, podent conduir la cèl·lula a la mort. L'estructura planar del nucli del tripirrol pot interaccionar amb l'ADN per intercalació, mentre que el grup metoxi i l'anell de nitrògens proporcionen llocs d'unió al hidrogen que faciliten encara més la unió l'ADN. La natura catiònica de les prodiginines en pHs neutres també proporciona una interacció electrostàtica amb els grups fosfat negatius de l'hèlix d'ADN. S'ha descrit també que les prodigionines poden reduir el Cu(II) a Cu(I), activant les DNases dependents de coure i provocant el trencament de la doble cadena de l'ADN (Manderville, 2001; Montaner and Perez-Tomas, 2003). Els nivells de coure són de fet generalment més elevats en cèl·lules canceroses (Theophanidis et al., 2002). Tots els estudis realitzats fins al moment però, s'han realitzat amb plasmidis d'ADN nus, fent difícil predir la seva contribució en els efectes citotòxics observats en la cèl·lula, on l'ADN es troba formant complexos amb les proteïnes i no és de tan fàcil accés.

3. Variació del pH intracel·lular

El pH en els orgànuls àcids s'ha descrit com a probable responsable d'una varietat important de funcions cel·lulars, com l'endocitosi, l'exocitosi i el trànsit intracel·lular, així com la diferenciació, el creixement i la mort cel·lular (Shrode et al., 1997). Endemés també genera un gradient electroquímic que proporciona la força necessària per al transport actiu. Les prodigionines s'han descrit com a desacobllants de les V-ATPases a través de la seva funció H⁺/Cl⁻ simport que condueix a la neutralització dels compartiments àcids, provocant

simultàniament l'acidificació del citoplasma i conduint les cèl·lules en alguns casos a l'apoptosi (Ohkuma et al., 1998; Yamamoto et al., 2001).

Així doncs, les prodiginines poden alterar el pH intracel·lular dels orgànuls, però la seva contribució a l'efecte citotòxic d'aquesta família de compostos encara no ha estat elucidat.

4. Acció sobre rutes de senyalització

Són varis el efectes induïts per les prodiginines en les rutes de senyalització de les proteïnes quinasa activades per mitògens (MAPK), conduint tant a la seva activació com a la seva inhibició. Les MAPK són proteïnes quinasa que responen a estímuls extracel·lulars, regulant múltiples activitats cel·lulars com la mitosis, l'expressió gènica, la proliferació, la diferenciació i la supervivència o la mort cel·lular. Els resultats obtinguts amb diferents anàlegs de la prodigiosina, en diferents tipus cel·lulars, ens mostren un ampli ventall de resultats que fan molt difícil el poder extreure conclusions de l'efecte d'aquests compostos sobre unes rutes amb una gran complexitat inherent, però posen de manifest l'afectació d'aquestes rutes de senyalització en tots els casos estudiats.

A més a més l'activitat de les MAPK està lligada a l'activació de factors de transcripció, tal i com es comenta en l'apartat següent.

5. Acció sobre factors de transcripció

L'expressió aberrant de diversos factors de transcripció ha estat implicada en el procés de carcinogènesi. Molts dels oncògens s'ha trobat que codifiquen per a factors de transcripció o per als seus activadors, com per exemple jun, fos, myc, NFκB i les proteïnes STAT. La seva activació aberrant contribueix a la proliferació de les cèl·lules tumorals i a evadir l'apoptosi. Les prodiginines poden actuar inhibint alguns factors de transcripció, fet que podria estar jugant un paper important en la seva activitat anticancerosa. Dels diferents treballs publicats podem extreure que les prodiginines poden inhibir l'activitat prosupervivència d'alguns factors de transcripció com la proteïna activadora 1 (AP-1) i el factor nuclear kappa B (NFκB). No obstant, no queda clar com exerceixen aquest efecte inhibitori ja que en alguns casos s'inhibeix l'activitat inclús quan el factor està unit a l'ADN. Una possibilitat és que la interacció de les prodiginines amb els factors de transcripció pugui estar modulant la seva activitat i/o habilitat per a associar-se amb altres coactivadors transcripcionals, un altre que les prodiginines estiguin alterant l'estructura de la cromatina al intercalar-s'hi, i en conseqüència inhibeixen la transcripció (Perez-Tomas et al., 2003).

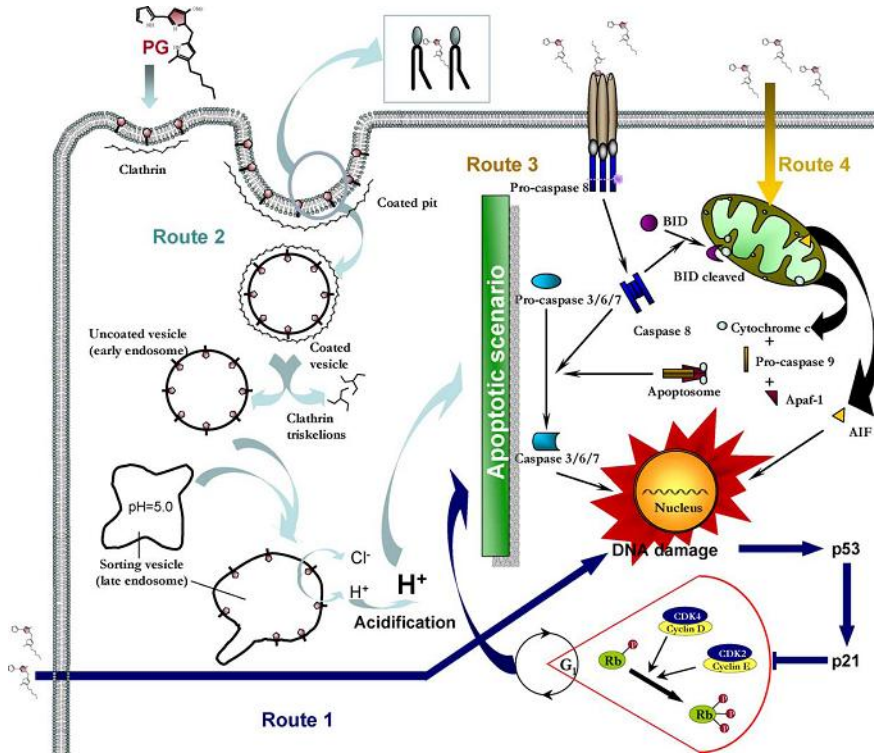


Figura 28. Esquema de les nombroses accions de la prodiginines sobre diferents rutes. Les prodiginines podrien estar actuant per mecanismes simples relacionats amb les seves propietats físiques o químiques. Les prodiginines són molècules hidrofòbiques, molt inestables en solucions aquoses, podent difondre lliurement per les membranes i interaccionar amb l'ADN. **Ruta 1** | Les cèl·lules poden respondre al dany a l'ADN activant l'aturada de cicle cel·lular, la reparació de l'ADN, i en algunes ocasions desencadenant apoptosi. **Ruta 2** | Poden incorporar-se en la bicapa lipídica de la membrana plasmàtica, on per endocitosis arriben als endosomes, on desacobllarien la H^+ -ATPasa (V-ATPasa) a través del flux H^+/Cl^- simport, induint la neutralització dels compartiments àcids de la cèl·lula i l'acidificació citoplasmàtica, podent desencadenar l'apoptosi. **Ruta 3** | La molècula podria inhibir/activar, de forma directa (no s'ha descrit cap receptor específic d'aquestes molècules fins al moment) o de forma indirecta, receptors de membrana clau en la regulació del cicle cel·lular o l'apoptosi de les cèl·lules. **Ruta 4** | Les prodiginines podrien difondre lliurement a través de les membranes plasmàtiques, interaccionar amb la membrana externa mitocondrial desacobllant la F_0F_1 -ATPasa i induir apoptosi. Adaptat de Perez-Tomas et al. (2003).

Localització cel·lular i funció de la prodiginiosina en *S.marcescens*

Respecte a la localització cel·lular precisa de PG en el bacteri, gran part dels estudis indiquen que la PG es troba associada a les membranes cel·lulars (Purkayastha and Williams, 1960). Estudis posteriors emprant el mètode de fraccionament cel·lular van permetre concretar encara més la localització de la PG (Lauferska et al., 1983); es van separar tres fraccions, la membrana

externa, la membrana interna i el citoplasma amb el periplasma, la PG es va trobar majoritàriament (88.5%) en la cara externa de la membrana citoplasmàtica, associada a una proteïna d'uns 100 kDa (Kobayashi and Ichikawa, 1989).

Com succeeix amb molts metabòlits secundaris, el paper fisiològic real de la PG en l'organisme que la produeix és avui dia encara motiu de debat. Una de les hipòtesis al respecte va sorgir arrel de l'observació que la PG canviava de color en funció del pH de les solucions, degut a que actua com a acceptor d'electrons autooxidable, especulant-se que podria estar participant en la respiració de *S.marcescens*, degut a la seva similitud amb molècules de la cadena respiratòria como els citocroms (Allen, 1967). Experiments posteriors intentant trobar diferències significatives entre cepes de *Serratia* pigmentades i no pigmentades sobre l'índex de respiració, l'eficiència metabòlica, la motilitat, mesures del catabolisme, etc..., van resultar infructuosos (Viñas et al., 2007).

També s'ha suggerit que els metabòlits secundaris puguin tenir algun paper en neutralitzar productes finals del metabolisme primari del bacteri que poguessin tenir un efecte nociu per a ella, actuant com a desaigna metabòlic eliminant l'excés de NAD(P)H i prolines (Hood et al., 1992). Fins l'actualitat no hi ha cap evidència però que indiqui que l'acumulació dels substrats que s'utilitzen per a la síntesis de la PG (prolina, alanina i acetat) siguin tòxics per al bacteri.

Possibles funcions ecològiques de la prodigiosina

Durant molt de temps s'ha discutit sobre les possibles avantatges que la PG podia proporcionar al seu organisme productor, sobretot respecte a una major capacitat de dispersió ecològica. En la dècada dels 80, es van realitzar estudis en els que es demostrava que les soques de bacteris pigmentades tenien una hidrofobicitat més elevada que els no pigmentats (Burger and Bennett, 1985). Uns anys més tard això va ser rebutat, ja que altres investigadors van demostrar que soques clíniques de *S.marcescens* tenien propietats hidrofòbiques en absència de la PG i que la hidrofobicitat només es mostrava al créixer el bacteri a 30°, temperatura poc favorable per a la síntesis de la PG (Rosenberg et al., 1986).

Uns anys més tard va quedar demostrat que la hidrofobicitat de la superfície cel·lular de *S.marcescens* no era deguda per complet a la PG, al identificar-se una proteïna responsable d'aquesta qualitat en soques no pigmentades de *Serratia marcescens* (Mallick, 1996).

Algunes de les propietats farmacològiques de la PG, com l'antibacteriana, l'antifúngica i l'algicida també poden conferir-li avantatges a l'hora de colonitzar el medi. S'ha vist que la PG

pot produir la mort d'altres bacteris funcionant com a fotosensibilitzador, permetent així que *S.marcescens* colonitzi amb major facilitat nous nínxols (Roth, 1967).

Activitats farmacològiques de la prodigionina

A la PG se li han atribuït totes les propietats farmacològiques descrites en la família de les prodiginines. És un potent agent **antimalàric**, ja que mostra una elevada toxicitat contra *Plasmodium falciparum*, el protozou causant de dita malaltia (Castro, 1967). Així mateix, PG ha estat descrita en altres ocasions com a agent **antiprotozoic**, concretament contra *Entamoeba histolytica* (Balamuth and Brent, 1950). També se li han atribuït propietats **antifúngiques** a diverses cepes productores de PG obtingudes de rizosferes (Kalbe et al., 1996), així como propietats **algicides** al pigment produït pel bacteri marí *Hahella chejuensis*, identificat com PG, el qual posseeix activitat lítica contra dinoflagelats (Jeong et al., 2005). És igualment remarcable l'efecte **antibacterià** que PG posseeix contra un ampli grup de bacteris grampositius (Williams et al., 1967). PG és un **immunosupressor** amb mecanismes d'acció diferents al de les drogues comunament utilitzades com la ciclosporina A, FK506 i rapamicina, essent selectiu de limfòcits T (Han et al., 1998), acció que desenvolupa principalment inhibint l'expressió d'interleukina-2R α sense provocar toxicitat *in vivo* (Han et al., 2001). Per últim, les seves propietats **anticanceroses** han estat provades en varies ocasions, tant en cèl·lules canceroses hematopoètiques (Campas et al., 2003; Montaner et al., 2000), com en cèl·lules de càncer d'estomac i càncer de colon (Diaz-Ruiz et al., 2001; Montaner and Perez-Tomas, 2001), i en cèl·lules de càncer de mama i de carcinoma de cèl·lules petites de pulmó (Ho et al., 2009; Llagostera et al., 2005; Soto-Cerrato et al., 2004). També hi ha dades que demostren la seva capacitat antimetastàsica *in vivo* ja que inhibeix la capacitat invasiva de las cèl·lules tumorals (Zhang et al., 2005b).

Inhibidors de les Histona Desacetilases

Teràpia epigenètica

En l'actualitat l'epigenètica ha sorgit com una àrea important per a entendre com el genoma tradueix la seva informació, sobretot després d'haver-se completat el projecte del Genoma Humà. L'epigenètica és un terme emprat per a descriure les modificacions genètiques que afecten els patrons d'expressió genètica sense alterar la seqüència de nucleòtids de l'ADN subjacent, i que són heretables d'una generació cel·lular a la següent. Els canvis epigenètics estan implicats en molts aspectes de la biologia cel·lular. Es tracta d'un procés dinàmic que proporciona un mecanisme a partir del qual un organisme pot respondre a estímuls ambientals mitjançant canvis en l'expressió gènica durant el creixement cel·lular i la diferenciació. Principalment s'han identificat dos mecanismes essencials en la regulació epigenètica de la transcripció gènica, la modificació d'histones i la metilació de l'ADN (Egger et al., 2004; Kristensen et al., 2009).

Evidències recents semblen indicar cada cop més que la desregulació d'aquests processos epigenètics causen repressió transcripcional (o silenciament) d'un conjunt de gens, causa subjacent de la patogènesi de moltes malalties humanes, entre elles el càncer. En l'última dècada, s'han realitzat progressos importants en el coneixement de la relació causa-efecte existent entre els canvis epigenètics aberrants i la carcinogènesi i la progressió tumoral (Baylin and Ohm, 2006; Cress and Seto, 2000; Esteller, 2008; Mahlknecht et al., 2000; Timmermann et al., 2001), la qual cosa ha conduït a assajos clínics de fase I i II amb inhibidors d'histona desacetilases (HDIs) (Drummond et al., 2005; Egger et al., 2004; Marks et al., 2004; Mei et al., 2004), i en menor proporció amb inhibidors d'ADN metiltransferases (Das et al., 2004), tant en tumors sòlids com en malalties hereditàries (Lin et al., 2006).

Estructura i remodelació de la cromatina

Tot el genoma humà està empaquetat en el nucli en forma de cromatina, un complex macromolecular dinàmic format a partir d'unitats repetitives, els nucleosomes. Cada partícula de nucleosoma està constituïda per un fragment d'ADN (146 pb) enrotllat al voltant d'un octàmer d'histones que consta de quatre parells d'histones: un tetràmer histona 3 - histona 4 (H3-H4) i dos dímers histona 2A-histona 2B (H2A-H2B) (Luger et al., 1997) (Figura 29).

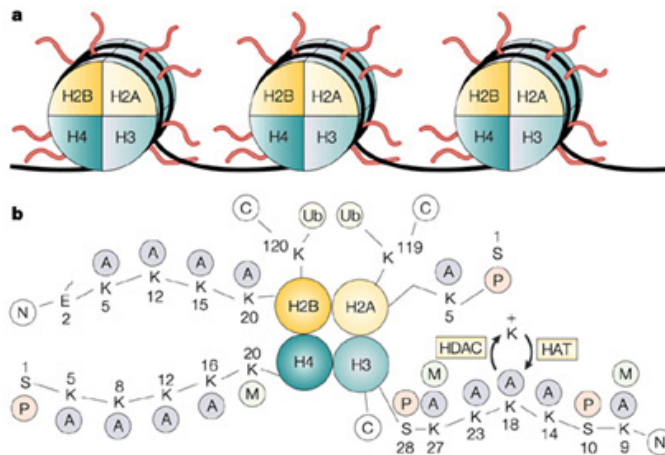


Figura 29. Esquema de l'estructura de la cromatina. A| El cor del nucleosoma format per l'octàmer de proteïnes histona, al voltant del qual s'enrotlla l'ADN (negre). B| Les cues amino-terminals del cor d'histones. Les lisines (K) de les cues amino-terminals de les histones H2A, H2B, H3 i H4 són llocs potencials d'acetilació-desacetilació per histona acetiltransferases (HATs) i histona desacetilases (HDACs). L'acetilació neutralitza la càrrega de les lisines. A, acetil; C, extrem carboxi terminal; E, àcid glutàmic; M, metil; N, extrem amino terminal; P, fosfat; S, serina; Ub, ubiquitina. Adaptat de Marks et al. (2001).

Les histones són petites proteïnes bàsiques riques en aminoàcids lisina i arginina. Les quatre histones nucleosòmiques contenen dos dominis: el domini C-terminal, que es localitza al cor del nucleosoma, i el domini N-terminal amb residus de lisina que s'estenen per fora del nucleosoma. Tot i que les histones són unes de les proteïnes més conservades al llarg de la evolució, també es troben entre les més variables en termes de modificacions postraduccionals (Thiagalingam et al., 2003). Les cues de les histones H3 i H4 són diana de diverses modificacions postraduccionals, incloent acetilació, fosforilació i metilació entre d'altres. La metilació de les cues de les histones pot produir-se en els residus lisina i arginina, però fins ara aquestes modificacions semblen menys dinàmiques que aquelles causades pel procés d'acetilació (Monneret, 2005; Zhang and Reinberg, 2001).

La N^ε-acetilació consisteix en la transferència d'un grup acetil de l'acetil coenzim-A al grup ε-amino d'un residu de lisina d'una proteïna diana (Figura 30). És una modificació postraducciona clau en moltes proteïnes, dinàmica, reversible i altament regulada, responsable de modular importants rutes intracel·lulars (Han and Martinage, 1992; Martin et al., 2007).

Aquesta modificació es va identificar per primer cop en histones al 1960 per Allfrey *et al.* (1964).

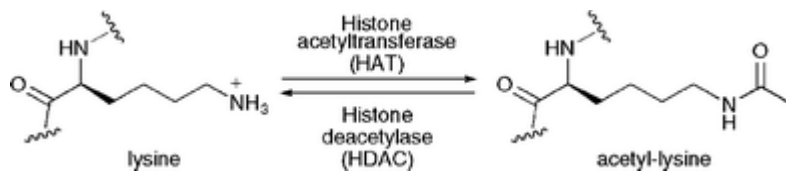


Figura 30. Esquema del procés de N-acetilació. L'acetilació de lisines pertany al grup de modificacions postraduccionals utilitzades per la cèl·lula per a alterar propietats específiques d'una proteïna.

L'acetilació i desacetilació d'histones juga doncs, un paper molt important en la regulació transcripcional de les cèl·lules eucariotes (Lehrmann *et al.*, 2002; Mai *et al.*, 2005). *In vivo* l'acetilació està controlada per les activitats antagoniques d'acetiltransferases i desacetilases, les primeres encarregades d'afegir grups acetil a les lisines i les segones d'extreure'ls. Degut a que l'acetilació es va identificar per primera vegada en histones, les lisina acetiltransferases i desacetilases són conegudes com histona acetiltransferases (HATs) i histona desacetilases (HDACs), tot i que en l'actualitat sabem del cert que l'acetilació de lisines pot succeir en moltes proteïnes cel·lulars a més a més d'en histones. Per aquest motiu alguns autors proposen un terme més precís per aquests enzims que podria ser *acetiltransferases de lisines* i *desacetilases de lisines* (Yang *et al.*, 2008).

En general, l'acetilació d'histones promou una estructura de la cromatina més relaxada que permet l'activació transcripcional, mentre que els estats hipoacetilats poden associar-se a repressió transcripcional, ja que la desacetilació de les cues de les histones promou la compactació de la cromatina restringint l'accés dels factors transcripcionals a l'ADN (Figura 31).

El nivell de modificació postraduccionals es manté per el balanç dinàmic entre les activitats de les HATs i les HDACs, ambdues reclutades a gens diana en complexos que contenen activadors transcripcionals amb seqüències específiques. La regulació aberrant d'aquest sistema de marcatge epigenètic s'ha observat que causa expressió gènica inapropiada, esdeveniment clau en la patogènesis de moltes formes de càncer (Esteller, 2008; Lane and Chabner, 2009; Lin *et al.*, 2006).

Recentment s'ha hipotetitzat l'existència d'un anomenat "codi histona" com a sistema major de modificació epigenètica (Egger et al., 2004; Jenuwein and Allis, 2001; Rice et al., 2007), hipòtesi que postula que modificacions determinades en residus específics de les histones són prerrequisit per a posteriors modificacions en la mateixa histona o ens les veïnes. La combinació de modificacions seria la que permetria regular de forma intercanviable l'estat de transcripció gènica d'encès a apagat i visa versa, regulant la transcripció gènica mitjançant la modificació de l'arquitectura de la cromatina per tal d'adquirir un estat actiu o silenciàt. Aquesta hipòtesi ha accelerat encara més la cerca d'inhibidors d'HDACs, tot i que la desacetilació és únicament una part del anomenat "codi histona".

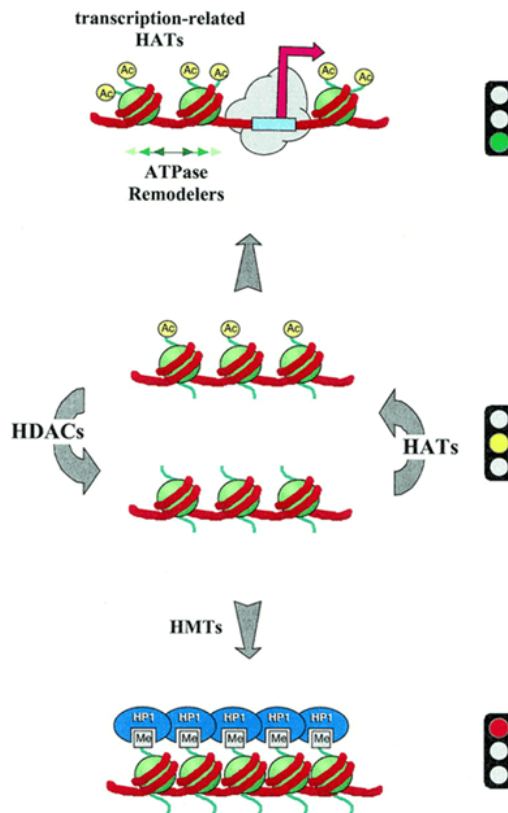


Figura 31. Canvi en l'estat d'acetilació de les histones. El balanç entre les activitats dels enzims HAT i HDAC marquen l'estat d'acetilació de la cromatina. L'acetilació estableix una estructura que permet als factors remodeladors de la cromatina obrir els promotors. La desacetilació, sovint seguida de la metilació de les histones, estableix una base sòlida per a estructures repressives, com l'heterocromatina. Les cues d'histona acetilades estan representades per cercles grocs. Les metilacions s'indiquen per rectangles grisos. HMT, histona metiltransferasa; HP1, proteïna 1 de la heterocromatina. Adaptat de Eberharther and Becker, (2002).

Classificació dels enzims HDAC

La identificació de les primeres histona desacetilases de mamífer va tenir lloc al 1996 per Taunton i col·laboradors. En l'actualitat 18 membres de la família HDAC han estat identificats en el genoma humà, els quals han estat agrupats en classes en base a la seva homologia als seus ortòlegs del llevat, i en funció de la seva mida, expressió subcel·lular i número de dominis enzimàtics (Figura 32) (Gao et al., 2002; Marks and Jiang, 2005).

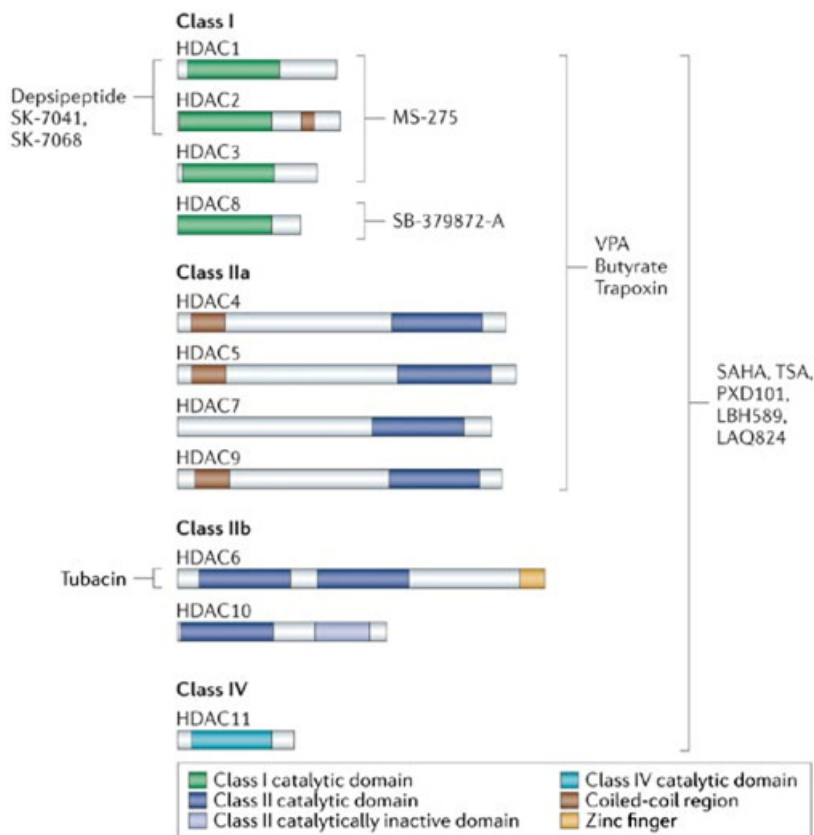


Figura 32. Classificació dels membres de la família de les histona deacetilases. 18 HDACs han estat identificades en humans, i estan subdividides en 4 classes en funció de la seva homologia als HDACs de llevat, la seva localització subcel·lular i activitat enzimàtica. Adaptat de Bolden et al. (2006)

Les HDACs s'han dividit en quatre classes: classe I (HDAC1, 2, 3 i 8), classe IIa (HDAC4, 5, 7, i 9) i IIb (HDAC6 i 10), classe III (SIRT1, 2, 3,4, 5, 6 i 7) i classe IV (HDAC11) (Bolden et al., 2006). Mecanísticament les classes I, II i IV difereixen de la classe III en el cofactor que requereixen. Les primeres, també anomenades HDAC "clàssiques", són enzims zinc dependents que necessiten un lloc actiu de zinc per a intervenir en la catalització de la desacetilació, mentre que la classe III, les sirtuïnes, requereixen com a cofactor essencial el NAD⁺ (de Ruijter et al., 2003; Imai et al., 2000; Marmorstein, 2004).

Totes les HDACs de **classe I** comparteixen cert grau d'homologia amb la desacetilasa de llevat Rpd3 (*reduce potassium dependency 3 protein*), es localitzen generalment en el nucli i s'expressen de forma ubiqua en moltes línies cel·lulars i tumors (Gray and Teh, 2001). Es caracteritzen per tenir un elevat grau d'homologia en els seus dominis catalítics.

La **classe II** d'HDACs, homologa a la de llevat Hda1p (*histone deacetylase 1 protein*), es troba majoritàriament a citoplasma o migrant entre nucli i citoplasma, suggerint potencials funcions extracel·lulars per a aquesta classe mitjançant la regulació de l'estat d'acetilació de substrats no histona. És la classe major en mida, i pot ser dividida en dues subclasses, IIa i IIb, en funció de la seqüència d'homologia del domini i de la seva organització, contenint la subclasse IIb dos dominis catalítics.

Els membres de la **classe III**, les sirtuïnes, com ja ha estat mencionat prèviament, requereixen de NaD⁺ per a la seva activitat enzimàtica i són homologues a la família de proteïnes de llevat Sir2 (*Silent information regulator 2*). La seva funció en cèl·lules de mamífer sembla estar relacionada amb la desacetilació de proteïnes no histona i factors de transcripció com p53.

Finalment, l'HDAC11, ha estat classificada per alguns autors en una classe independent, la **classe IV**, degut a que el cor de la seva regió catalítica conté residus conservats tant de la classe I com de la II (Gao et al., 2002).

La generació de *knockouts* en ratolí per a varis membres de la família d'HDACs (Taula 3) (Witt et al., 2009b) ens indiquen que individualment els membres de la família HDAC són fonamentals pel desenvolupament embrionari normal, i en processos cel·lulars clau com el control del cicle cel·lular, resposta al dany a l'ADN, resposta a l'estrès, creixement cel·lular, metabolisme i diferenciació. A més a més permeten concloure que la funció individual de les HDACs no pot ésser compensada per altres membres de la mateixa família. Aquest fet sembla indicar que les HDACs van divergir evolutivament molt aviat, i que han estat conservades en eucariotes,

suggestint funcions crítiques no redundants per a aquests enzims (Bolden et al., 2006; Grozinger and Schreiber, 2002; Marks and Jiang, 2005; Rosato and Grant, 2005).

Taula 3
HDACs: funció molecular i paper en el desenvolupament

	Membre de la família HAC	Tamany (aa)	Localització cel·lular	Substrats principals	Parelles d'unió	Expressió Tissular	Fenotip ratolí knockout		
Enzims dependents de zinc	Classe I	HDAC1	483	N	P53, MyoD, E2F-1, Stat3, receptors d'andrògens, SHP, histones	Sin3, Mi-2/ NuRD, CoREST	ubiqua	letal per a l'embrió a dia 9.5, p21 i pp27 up-regulats, es redueix l'activitat HDAC total	
		HDAC2	488	N	Bcl-6, Stat3, receptors de glucocorticoid, YY-1, histones	Sin3, Mi-2/ NuRD, CoREST	ubiqua	viable fins el període perinatal, múltiples defectes cardíacs fatals, hiperpalsia excessiva del múscul cardíac, arritmia	
		HDAC3	428	N	GATA-1, RelA, Stat3, MEF2D, YY-1, SHP, histona 4	N-CoR/ SMRT	ubiqua	letal per al embrió abans dia 9.5, cicle cel·lular defectuós, reparació del DNA i apoptosi en embrioblasts apoptòtics.	
		HDAC8	377	N/ C	nd	EST1B	ubiqua	nd	
	Classe IIa	HDAC4	347	N/ C	GCMA, GAT-1, HP-1, histones	ANKRA, RFXANK	cor, múscul llis, cervell	viable, ossificació prematura i ectòpica, hipertròfia condrocítica	
		HDAC5	1084	N/ C	Smad7, HP-1, GCMA, histones	REA, receptor d'estrogen	cor, múscul llis, cervell	hipertròfia miocàrdica, resposta cardíaca a estrès anormal	
		HDAC7	1122	N/ C	FLAG1 i 2, histones	HIF1a, Bcl-6	cor, múscul llis, placenta, pancreas	letal per al embrió, manca adhesió cel·lular cel·lular-cèl·lula	
		HDAC9	1215	N/ C	nd	FOX3P	múscul llis, cervell	viable al naixement, hipertròfia miocàrdica espontània	
	Classe IIb	HDAC6	855	C	a-Tubulina, HSP90, SHP, Smad7, histones	nd	ronyó, fetge, cor, pancreas	viable, no defectes significatius, augment de L'acetilació global de la tubulina. MEFs no poden recuperar-se de l'estrès oxidatiu	
		HDAC10	1011	C	HSP90?, histones	nd	melsa, ronyó, fetge	nd	
	Classe IV	HDAC11	669	N/ C	nd	HDAC6?	cor, múscul llis, ronyó cervell	nd	
Enzims dependents de Na ⁺	Classe III (Sirtuines)	SIRT1	747	N	p53, FOXO, NF-κB, PGC-1α			viable, moren poc després de néixer, mostren retard en creixement i baixos nivells IGF1 en suero	
		SIRT2	352	C	Histona 4, α-tubulina, FOXO1, FOXO2		Abundant en teixit adipós		
		SIRT3		N/ M	Acetil-CoA sintetasa		teixit adipós marró		
		SIRT4		M	Glutamat deshidrogenasa			tenen elevats nivells d'activitat GDH i d'insulina circulant	
		SIRT5		M	?				
		SIRT6		N	DNA polimerasa B			ubicua	síntomes d'envelliment prematur, moren a les 4 setm. naixement
		SIRT7		Ncl	RNA polimerasa I			fetge, testicles, melsa	

Abreviatures: MEFs, fibroblasts embrionaris de ratolí; N, nuclear; C, citoplasmàtic; N/C, nuclear i citoplasmàtic; nd, sense dades. Adaptat de Witt et al. (2009b)

Substrats de les HDACs

L'activitat de les HDACs està regulada a múltiples nivells, incloent interaccions proteïna-proteïna, modificacions postraduccional per fosforilació, acetilació i proteòlisi, localització subcel·lular, i per una varietat de cofactors metabòlics, mostrant generalment la seva activitat enzimàtica complerta en el context de complexos multiproteics (Bolden et al., 2006; Marks and Xu, 2009).

La diana principal de les HDACs per a la seva funció fisiològica són les **histones**, però també actuen sobre mecanismes independents de transcripció mitjançant la modulació de l'estat d'acetilació d'una sèrie de **dianes no histona**. És més, anàlisis filogenètics recents d'HDACs bacterianes suggereixen que totes quatre classes d'HDACs precedeixen evolutivament a les histones (Gregoretto et al., 2004), fet que sembla indicar que inicialment la seva activitat podria haver estat dirigida vers substrats no histona.

Al menys 50 proteïnes no histona de coneguda funció biològica, han estat identificades com a possibles substrats de les HDACs (Bolden et al., 2006; Glozak et al., 2005; Minucci and Pelicci, 2006; Rosato and Grant, 2005; Xu et al., 2007). Entre elles s'inclouen factors de transcripció, reguladors transcripcionals, mediadors traduccional de senyals, enzims reparadors d'ADN, reguladors de l'importació nuclear, proteïnes txaperona, proteïnes estructurals, mediadors d'inflamació i proteïnes virals (Taula 4).

Taula 4
Substrats no histona de les HDACs

Funció	Proteïnes
Factors de transcripció d'unió al DNA	p53, c-Myc, AML1, BCL-6, E2F1, E2F2, E2F3, GATA-1, GATA-2, GATA-3, GATA-4, Ying Yang 1 (YY1), NK-κB, MEF2, CREB, HIF-1α, BETA2, POP-1, IRF-2, IRF-7, SRY, Eklf
Receptors esteroideus	Receptors d'andrògens, receptors d'estrògens α, receptor de glucocorticoides
Co-reguladors transcripcionals	Rb, DEK, MSL-3, HMG(Y), HMGAI, CtBP2, PC-1α
Mediadors de senyals	STAT3, Smad7, β-catenina, IRS-1
Enzims reparadors de DNA	Ku7, WRN, TDG, NEIL2, FEN1
Import nuclear	Rch1, importina-α7
Proteïnes txaperona	HSP90
Proteïna estructural	α-Tubulina
Mediador inflamatori	HMGB1
Proteïnes virals	E1A, L-HDA, S-HDAg, T antigen, HIV Tat

Adaptat de Xu et al. (2007)

L'acetilació d'aquestes dianes no histona pot tant augmentar com disminuir la seva activitat o estabilitat, o la de les interaccions proteïna-proteïna, ja que l'acetilació dels residus de lisina d'aquestes proteïnes pot estar competint amb altres modificacions postraduccional, com la ubiquïtinització, o pot influenciar el seu estat de fosforilació (Glozak et al., 2005; Simonsson et al., 2005).

Així doncs, les HDACs poden regular l'activitat de proteïnes cel·lulars clau involucrades entre d'altres processos, en la transcripció, transducció de senyals, cicle cel·lular i apoptosi, indicant que aquests enzims poden modular funcions cel·lulars importants independentment del seu paper epigenètic controlant l'estructura de la cromatina.

Funció molecular i paper de les HDACs en el desenvolupament del càncer

Estudis recents suggereixen que la desregulació del procés d'acetilació i desacetilació juga un paper causal important en la regulació anormal de l'expressió gènica de moltes formes de càncer (Cress and Seto, 2000; Esteller, 2008; Mahlknecht et al., 2000; Timmermann et al., 2001).

La **desregulació del reclutament d'HDACs als promotors** sembla ser un dels mecanismes mitjançant els quals aquests enzims contribueixen a la tumorigènesis. La majoria d'estudis es centren en el reclutament aberrant d'HDACs a promotors a través de la seva associació física amb proteïnes oncogèniques d'unió a l'ADN resultants de translocacions cromosòmiques, o en la sobreexpressió de factors transcripcionals repressius que interaccionen físicament amb les HDACs. Per exemple, el factor de transcripció oncogènic produït per la fusió del gen de la leucèmia promielítica (PML) i el receptor- α de l'àcid retinoic (RAR α) indueix leucèmia promielocítica aguda (APL) mitjançant el reclutament de complexos repressors que contenen HDACs que reprimeixen constitutivament l'expressió de gens diana específics (Fenrick and Hiebert, 1998; Lin et al., 2006; Timmermann et al., 2001). La mediació de les HDACs en el desencadenament de la patogènesis de la APL serveix de model també per a la leucèmia aguda limfoblàstica i per als limfomes no Hodgkinians. D'altra banda el factor de transcripció limfoma 6 de cèl·lules B (BCL6) que interacciona amb l'enzim HDAC2, es troba sobreexpressat en ~40% dels limfomes grans difusos de cèl·lules B (DLBCLs), reprimint gens reguladors del creixement com CDKN1A, que codifica per p21^{Waf1/Cip1}. BCL6 és a la vegada hipoacetilat per les HDACs. El tractament de la DLBCLs amb inhibidors d'HDACs (HDIs) resulta en hiperacetilació de BCL6, alliberament de HDAC2, reactivació dels gens reprimits i apoptosi de les cèl·lules tumorals

(Bolden et al., 2006). Aquestes dades i altres, mostren que la repressió transcripcional inapropiada produïda per les HDACs és un mecanisme molecular comú utilitzat per les oncoproteïnes (Johnstone, 2002).

A més a més del reclutament aberrant d'HDACs a locis específics, en alguns tumors s'han descrit **alteracions en l'expressió d'HDACs individuals**. Alguns exemples serien la sobreexpressió d'HDAC1 en carcinoma de pròstata, gàstric, colon i mama, o la sobreexpressió de HDAC2 en càncer gàstric, colorectal o cervical (Lane and Chabner, 2009; Marks and Xu, 2009). Tot i que sorprenentment avui dia encara es sap poc de l'expressió de les HDACs en teixit cancerós, s'ha observat una gran correlació entre l'expressió aberrant de varis HDACs i càncer, i experiments de silenciament d'HDACs individuals per siRNA disminueixen el creixement cel·lular i la supervivència d'algunes línies cel·lulars tumorals (Lane and Chabner, 2009; Marks and Xu, 2009). Les mutacions estructurals en HDACs semblen ser molt rares en els càncers (Marks and Xu, 2009).

Estudis de funcionalitat i expressió realitzats amb HDACs i càncer demostren la seva implicació en la biologia cel·lular d'aquesta malaltia, havent-se descrit la seva participació en processos claus en la patogènesi del càncer com l'angiogènesi, la migració, la quimioresistència, la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi (Figura 33) (Witt et al., 2009b).

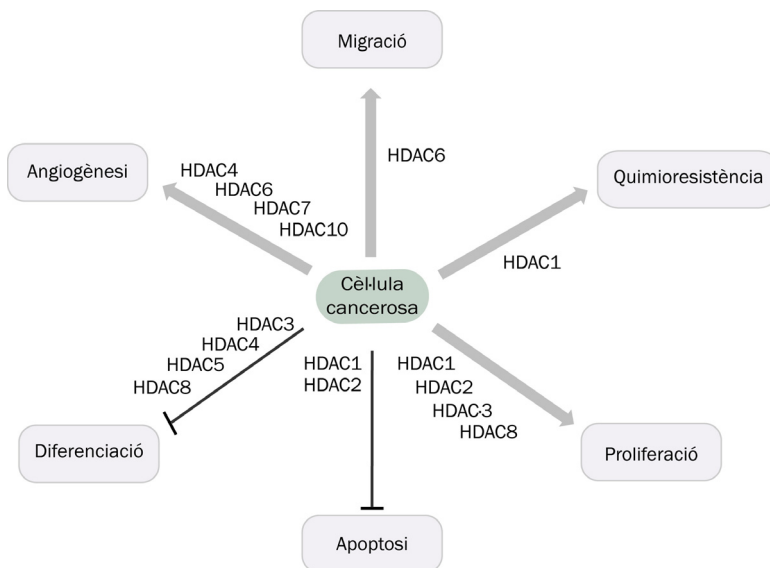


Figura 33. Membres de la família HDAC controlen punts clau de la biologia cel·lular del càncer. L'acció selectiva sobre HDACs individuals causa diferenciació, apoptosi, inhibició del cycle cel·lular, inhibició de la migració, susceptibilitat a la quimioteràpia i inhibició de l'angiogènesi. Adaptat de Witt et al. (2009b).

Inhibidors d'HDACs (HDIs)

El terme inhibidors d'HDACs (HDIs) s'aplica a aquells compostos que actuen sobre les anomenades HDACs "clàssiques", classe I, II i IV. Les HDACs estan directa o indirectament involucrades en molts processos biològics, com l'expressió gènica o la regulació de rutes de proliferació, diferenciació i mort cel·lular (Carew et al., 2008a; Marks and Xu, 2009; Xu et al., 2007). Així doncs, la inhibició d'aquests enzims podria desencadenar múltiples mecanismes potencialment inductors de l'aturada del creixement o de la mort cel·lular.

Tot i que a nivell molecular es desconeix el mecanisme precís d'acció dels HDIs, la inhibició de l'activitat de les HDACs produeix l'acumulació de proteïnes acetilades, principalment histones, però també factors de transcripció, tubulina, i la proteïna de shock tèrmic 90 (HSP90) entre d'altres (Bolden et al., 2006; Minucci and Pelicci, 2006). L'augment en l'estat d'acetilació d'aquestes proteïnes pot alterar la seva estabilitat, localització, dimerització proteica i la interacció proteïna-proteïna, afectant en conseqüència la seva funció, i podent desencadenar alteracions en la transcripció i la mitosis. L'acumulació d'histones acetilades produeix la relaxació de l'estructura de la cromatina i promou l'accés de la maquinària de transcripció (Kazantsev and Thompson, 2008) (Figura 34). Sorprenentment però, s'ha observat que aquests efectes transcripcionals són relativament selectius, només afectant al voltant del 2-20 % del transcriptoma, amb ambdós, inducció i repressió de l'expressió gènica dels gens diana (Bolden et al., 2006; Shankar and Srivastava, 2008; Witt et al., 2009b). El nombre i tipus de gens que mostren alteració de la transcripció degut als HDIs està determinat, en part, per la duració de l'exposició de les cèl·lules a l'inhibidor, el tipus d'HDI emprat, i el tipus de cèl·lula transformada (Ungerstedt et al., 2005).

Així doncs, tenint en compte l'abast dels efectes biològics associats a les HDACs, un esperaria que els compostos que les inhibeixen tinguessin una estreta finestra terapèutica. Les dades fins al moment obtingudes suggereixen però, que les cèl·lules transformades són més sensibles a l'apoptosi induïda per HDIs que les cèl·lules normals (Ungerstedt et al., 2005; Zhang et al., 2005a). Aquestes diferències en sensibilitat es creu que es podrien deure a l'addicció de les cèl·lules tumorals per certes rutes cel·lulars, a defectes genètics concomitants, o a la inhabilitat de les cèl·lules transformades d'activar rutes de supervivència després de l'exposició a aquests agents tòxics (Marks and Jiang, 2005). A més a més, a diferència de la majoria d'agents terapèutics, els HDIs poden induir la mort de cèl·lules transformades tant en fases proliferatives com no proliferatives del cicle cel·lular (Burruess et al., 2004), i tenen una demostrada activitat antiangiogènica i immunomoduladora que pot jugar un paper important en la mediació dels seus efectes antitumorals (Valeria et al., 2007).

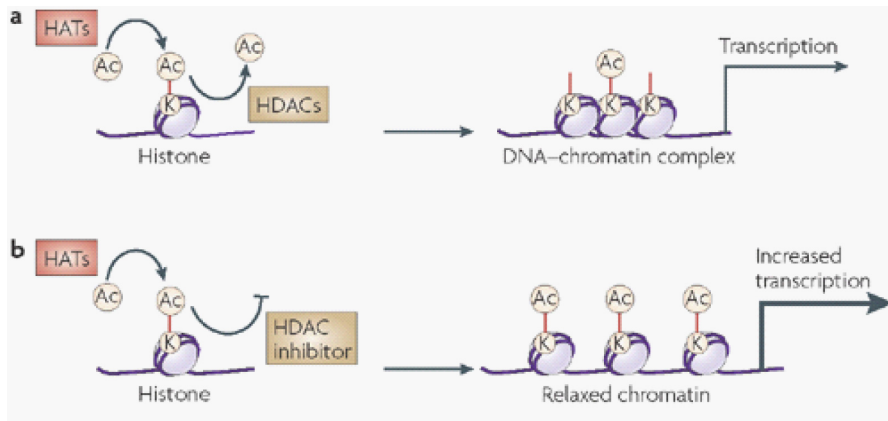


Figura 34. Els HDIs modifiquen els nivells d'expressió gènica. A | Els nivells d'acetilació de les histones en residus específics de lisina (K) estan determinats per les reaccions d'acetilació i desacetilació, les quals es duen a terme pels enzims HATs i HDACs. **B** | Al bloquejar la reacció de desacetilació, els HDIs canvien l'equilibri dels nivells d'acetilació d'histones, conduint a un augment dels nivells d'acetilació, modificació de la cromatina que adopta una conformació més relaxada, i un augment de la transcripció. Adaptat de Kazantsev i Thompson (2008).

Classificació dels HDIs

Diversos tipus d'HDI, amb diferents estructures químiques, han estat purificats a partir d'extractes naturals o de la síntesi química, havent arribat a desenvolupament clínic més d'una desena d'ells (Figura 35) (Prince et al., 2009; Wang and Dymock, 2009). Fins al moment però, el vorinostat (SAHA) és l'únic que ha estat aprovat per la *US Food and Drug Administration* amb indicació oncològica (Marks, 2007).

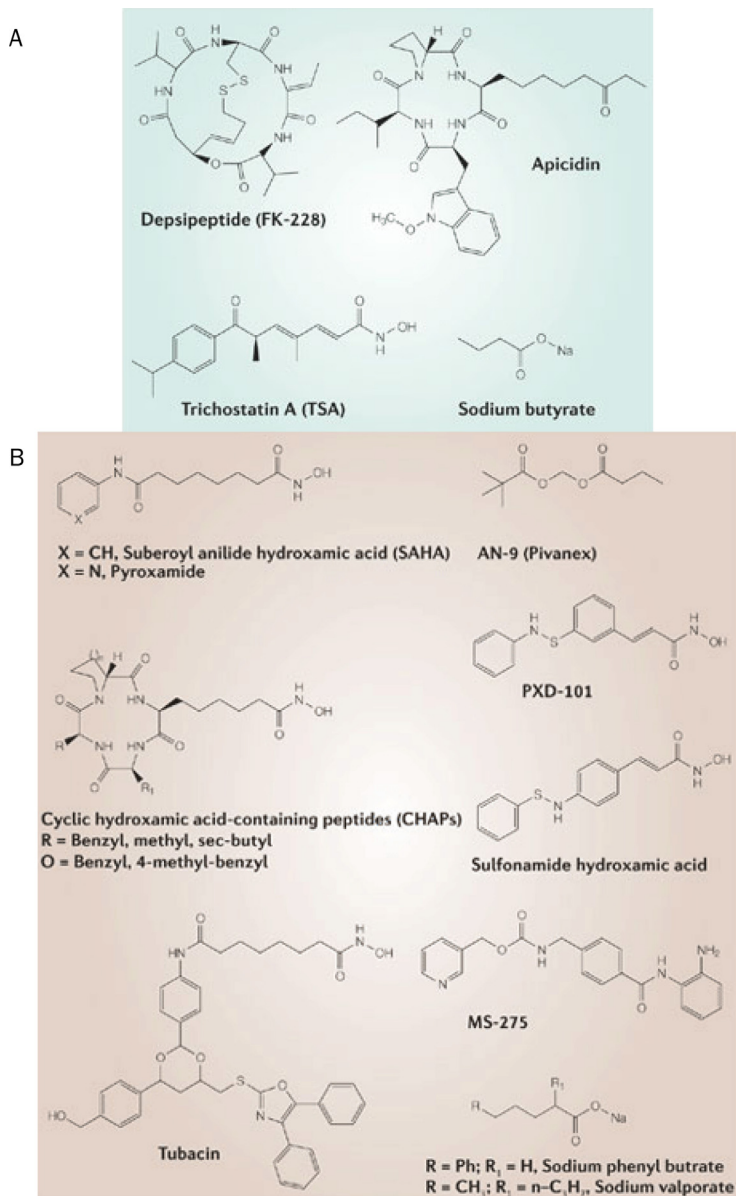


Figura 35. Estructures representatives de les principals classes conegudes d'HDIs.
A | D'origen natural. **B** | De síntesi. Adaptat de Minucci i Pelicci (2006).

Els HDIs estan actualment dividits en 6 classes, en base al seu grup funcional per a inhibir l'activitat HDAC i a la seva estructura química. Es classifiquen en àcids hidroxàmics, pèptids cíclics, àcids grassos de cadena curta, benzamides sintètiques, quetones i "varis" (Bolden et al., 2006; Monneret, 2005; Nolan et al., 2008) (Taula 5).

Taula 5
Característiques moleculars dels HDIs i estadi de desenvolupament clínic

Classe	Compost	HDAC diana	Potència (cèHules)	Estadi de desenvolupament	Companyia/ esponsor
Àcids hidroxàmics	TSA (Tricostatina A)	Classes I, II	nM	N/ A	
	SAHA (Zolinza, vorinostat)	Classes I, II, IV	µM	Fase I, II, III. Aprobat (CTCL)	Merck
	PXD101(Belinostat)	Classes I, II, IV	µM	Fase II	CuraGen, TopoTarget
	Oxamflatin	N/ A	µM	N/A	
	LAQ824	Classes I, II	nM	Fase I	
	LBH589 (Panobinostat)	Classes I, II, IV	nM	Fase I, II	Novartis
	CBHA	N/A	µM	N/A	
	Scriptaid	N/A	µM	N/A	
	Piroxamida	Classe I, classe II ?	µM	Fase I	
	SBHA	N/A	µM	N/A	
	ABHA	N/A	µM	N/A	
	SK-7041	HDAC1, 2	nM	N/A	
	SK-7068	HDAC1, 2	nM	N/A	
	CG-1521	N/A	µM	N/A	
	Tubacin	Classe IIb	µM	N/A	
	ITF2357	Classes I, II, IV	nM	Fase I	Italfarmaco
PCI-24781	Classes I, II	N/ A	Fase I	Pharmacyclics	
Pèptids cíclics	FK228 (Romidepsin)	HDAC1, 2	nM	Fase II	Gloucester Pharmaceuticals
	Depsipeptid	Classe I	nM	Fase I, II	
	Trapoxin A	Classe I, IIa	nM	N/A	
	Apicidina	HDAC1, 3, no HDAC8	nM	N/A	
	CHAPS	Classe I	nM	N/A	
Benzamides	MS-275 (Entinostat)	HDAC 1, 2, 3	µM	Fase II	Syndax Pharmaceuticals
	MGCD0103	Classe I	nM	Fase II	MethylGene
	CI-994 (tacedinaline)	N/ A	µM	Fase I, II, III	
Àcids alifàtics	Fenilbutirat	Classe I, IIa	mM	Fase II	NCI
	Àcid valproic (VPA)	Classe I, IIa	mM	Fase II	NCI
	AN-9 (Pivanex)	NA	µM	Fase II	Titan Pharmaceuticals
	Baceca	Classe I	N/A	Fase II	Topo Target
	Savicol	N/A	N/A	Fase II	Topo Target
Quetones electrofílques	Trifluorometilquetona	N/A	µM	N/A	
Varis	Depudecina	Classe I, Classe II ?	µM	N/A	
	MGCD-0103	Classe I		Fase I	

HDAC, histona desacetilases; HDIs, inhibidors de HDAC; N/A, no accessible; CTCL, limfoma de cèHules T cutàni

Adapatat de Bolden et al. (2006), Nolan et al. (2008) i Lane i Chabner (2009).

Tots aquests compostos han estat seleccionats per la seva capacitat d'inhibir la desacetilació de les histones, no obstant existeix una gran variabilitat en la seva potència i especificitat pels diferents isoenzims HDAC, alhora que produeixen efectes variables també sobre l'acetilació de substrats no histona (Taula 6) (Witt et al., 2009b). Els mecanismes d'acció *in vitro* són complexos i no solapants en les cèl·lules transformades, havent-se observat diferències d'especificitat en funció de les condicions experimentals emprades, motius pels quals s'espera que aquests compostos tinguin diferents eficàcies, toxicitat i ús terapèutic en els pacients (Lane and Chabner, 2009; Marks and Xu, 2009).

Taula 6
Perfil inhibitori dels HDIs pan- i específics de classe

Inhibidor		Classe I				Classe IIa				Classe IIb		Classe IV
		HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC7	HDAC9	HDAC6	HDAC10	HDAC11
Inhibidors no específics	TSA					nd					nd	nd
	Vorinostat (SAHA)					nd					nd	nd
	NVP-LAQ824					nd					nd	nd
	Panbinostat					nd					nd	nd
	Belinostat					nd					nd	nd
	PCI-24781					nd	nd	nd	nd			nd
Inhibidors Classe I	MS-275					nd					nd	nd
	MGCDO103								nd		nd	nd
	Depsipeptid			nd	nd		nd	nd	nd		nd	nd
	Apicidin										nd	nd
	Acid valproic					nd	nd				nd	nd
	Trapoxin		nd	nd	nd		nd	nd	nd		nd	nd
	SB-429201		nd			nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Bispyridinum diene				nd		nd	nd	nd	nd	nd	nd
	SHI-1:2								nd		nd	nd
	R306465		nd	nd		nd	nd	nd	nd		nd	nd
	SB-379278A		nd			nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	PCI-34051					nd	nd	nd	nd			nd
	Cpd2		nd	nd		nd	nd	nd	nd		nd	nd
Inhibidors Classe II	Derivats APHA		nd	nd	nd		nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Tubacin		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd		nd	nd
	Mercaaptoacetamida			nd		nd	nd	nd	nd			nd
	NCT-10a/14a		nd	nd	nd		nd	nd	nd		nd	nd

La potència inhibitoria relativa dels HDIs s'indica amb colors: porpra, inhibició forta; lila clar, inhibició fluixa; gris, no inhibició; blanc, dades no publicades. Adaptat de Witt et al. (2008)

Mecanismes moleculars d'acció dels HDIs

Avui dia diversos HDIs han estat acceptats i es troben en diferents fases de desenvolupament clínic, no obstant molt poc es sap sobre els seus mecanismes d'acció, tot i que sembla existir una signatura comú en l'expressió gènica en resposta a aquests compostos. Per exemple, la silenciament epigenètic de l'inhibidor de ciclins-dependents de quinases $p21^{Waf1/Cip1}$ es reverteix en varis tipus de cèl·lules canceroses, i es produeix amb tots els HDIs. No obstant, efectes específics de cèl·lula, com la modulació de receptors hormonals nuclears, o de rutes de senyalització cel·lular, poden variar en importància biològica en alguns tipus de càncer, la qual

cosa pot ser interessant en les estratègies de combinació d'agents. De fet molts estudis preclínic i dades clíniques donen suport tant a la utilització d'HDIs en monoteràpia com a la seva combinació amb altres teràpies anticanceroses (Carew et al., 2008a; Kristensen et al., 2009; Lane and Chabner, 2009).

Com hem comentat, els efectes desencadenats pels HDIs en les cèl·lules canceroses són múltiples i complexos, mostrant diferències importants en funció del tipus d'HDI emprat, el temps d'exposició, i les característiques de les cèl·lules transformades estudiades. Fins al moment, els efectes biològics descrits inclouen (Figura 36) (Carew et al., 2008a; Marks and Xu, 2009; Xu et al., 2007): **inducció de l'aturada del cicle cel·lular**, tant en cèl·lules sanes com transformades, induint predominantment una aturada en G1 a dosis baixes, i tant en G1 com en G2 a dosis més elevades, (i) majoritàriament a través de l'augment de l'expressió de p21, (ii) incrementant els nivells dels inhibidors CDK i disminuint el de les ciclines; **inducció de l'apoptosi per activació la via extrínseca de mort**, augmentant l'expressió de receptors i lligands en les cèl·lules transformades però no en cèl·lules sanes; **inducció de l'apoptosi per activació de la via intrínseca o mitocondrial**, (i) induint l'alliberament de citocrom c de l'espai intermembranós mitocondrial al citoplasma i la conseqüent activació de la caspasa 9, (ii) induint el trencament de la proteïna proapoptòtica Bid, i (iii) augmentant tant l'expressió de proteïnes proapoptòtiques de la família Bcl-2, com disminuint la dels membres antiapoptòtics de la mateixa família; **autofàgia**, es creu que la inhibició de l'HDAC1 podria jugar un paper important en el desencadenament d'aquest procés; **estrès oxidatiu**, estimulant la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROS); **mort cel·lular mitòtica**, (i) degut a l'augment en l'acetilació de les histones que altera l'estructura i funció dels centròmers, (ii) alterant la fosforilació de les histones i interferint en la seva interacció amb proteïnes reguladores de la mitosi, i (iii) induint la degradació de les proteïnes mitòtiques aurora A i B, i Survivina; **efectes resultants de la inhibició de la HDAC6**, (i) produeix alteracions en la ruta de l'agresoma, fent les cèl·lules més sensibles a l'estrès induït pel mal plegament de les proteïnes, (ii) induint l'acumulació de α -tubulina i cactactina, que inhibeixen la migració cel·lular, (iii) alterant la ruta antiapoptòtica d'AKt, degut a la inducció de la seva degradació i/o desfosforilació, i (iiii) alterant la funció de la txaperona HSP90, i en conseqüència de les seves proteïnes diana; **disminució de l'angiogènesi del tumor**, reduint l'expressió de factors proangiogènesi; i per últim **senescència**, relacionada amb la inducció d'aquests compostos de poliploïdia i defectes mitòtics.

Els assajos clínics de fase I i II realitzats amb alguns HDIs mostren en general un perfil de seguretat favorable, amb una bona tolerància i efectes adversos mínims, especialment si els comparem amb els agents quimioteràpics citotòxics tradicionals (Lane and Chabner, 2009; Marks and Xu, 2009).

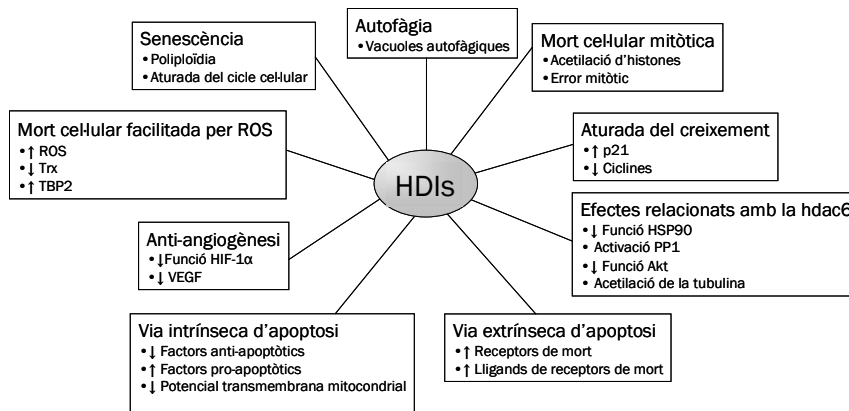


Figura 36. Mecanismes pels quals els HDIs indueixen mort cel·lular. Els HDIs tenen múltiples efectes sobre les cèl·lules canceroses. Adaptat de Xu et al. (2008).

El desenvolupament de resistències front als HDIs és motiu de preocupació, com en qualsevol nova teràpia antitumoral. En els assajos clínics s'han observat resistències front a diversos HDIs i en diferents tumors. Els mecanismes descrits de resistència a aquests compostos són diversos, degut a que alteracions a varis nivells cel·lulars poden potencialment bloquejar la seva activitat (Lane and Chabner, 2009; Marks and Xu, 2009). Per aquest motiu s'està realitzant un esforç per a identificar marcadors de resistència, com elevats nivells de Bcl-2, peroxiredoxines o poliamines. Aquesta àrea de recerca podria proporcionar estratègies per a maximitzar l'eficàcia terapèutica dels HDIs mitjançant la combinació d'aquests amb agents que actuïn sobre els factors que contribueixen a la resistència (Nolan et al., 2008).

Tricostatina A

La tricostatina A (TSA) va ser aïllada per primer cop de *Streptomyces hygroscopicus* com a antibiòtic fungistàtic l'any 1976 per Tsuji i col·laboradors, però no va ser fins 10 anys més tard que Morioka i col·laboradors i Yoshida i col·laboradors van demostrar el seu potent efecte com a inhibidor de la progressió del cicle cel·lular i com a inductor de diferenciació cel·lular. El TSA (7-[4-(dimetilamino)fenil]-N-hidroxy-4,6-dimetil-7-oxo-(2E,4E6R)-2,4-heptadienamida) és un àcid hidroxàmic natural que pot ésser produït per *Streptomyces platensis*, *Streptomyces hygroscopicus* Y-50 o *Streptomyces sioyaensis*. Els àcids hidroxàmics tenen una gran afinitat pels biometalls, incloent el Fe(III), Ni (II) i el Zn(II), motiu pel qual aquests agents adquireixen valor en biomedicina (Codd et al., 2009).

El TSA és considerat un HDI no selectiu (pan) de classe I i II, tal i com es mostra en la Taula 6. El TSA té una gran potència inhibidora front les HDAC1, 2, 3, 4, 7, 9 i 6, mentre que front a la HDAC8 té una activitat inhibidora relativament dèbil. Fins al moment no s'han publicat dades per a l'activitat del TSA sobre les HDAC5, 1 i 11.

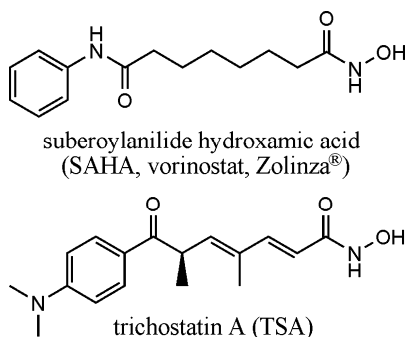


Figura 37. Estructura química de la tricostatina A (TSA) i del vorinostat (SAHA). Adaptat de Codd et al. (2008).

HDACs i el neuroblastoma

En les cèl·lules canceroses són molt freqüents els nivells elevats d'expressió d'HDACs, i en conseqüència d'histones hipoacetilades (Lane and Chabner, 2009). Recentment l'estudi dels neuroblastomes ha mostrat que membres de la família de les HDACs s'expressen de forma aberrant també en aquests tumors, existint correlació entre aquestes alteracions i l'estadi de la malaltia i el seu pronòstic (Witt et al., 2009a). L'expressió elevada del mRNA de l'HDAC1 s'ha observat que correlaciona amb resistència a múltiples drogues en línies cel·lulars de neuroblastoma, resultant la inhibició de la seva expressió, o de la seva activitat pel depsipèptid (un HDI tipus tetrapèptid cíclic), en la potenciació de la citotoxicitat de drogues quimioteràpiques en aquestes cèl·lules (Keshelava et al., 2007). Endemés, l'HDAC1 sembla estar involucrada en la mediació de la funció oncogènica de N-Myc en aquests tumors. N-Myc funciona com a transrepressor mitjançant el reclutament de l'HDAC1 al lloc SP-1 del promotor del gen de la transglutaminasa 2 (TG2), reprimint la seva transcripció. La inhibició de l'HDAC1 condueix a l'activació transcripcional de TG2 i a la disminució de l'activitat tumoral tant *in vitro* com *in vivo* (Liu et al., 2007). L'expressió de l'HDAC8 s'associa en el neuroblastoma amb progressió de la malaltia, amb factors de risc moleculars i clínics coneguts, i amb mal pronòstic, no obstant encara es desconeix si aquesta HDAC juga una funció específica en la seva

oncogènesi (Oehme et al., 2009a; Oehme et al., 2009b). Per últim, la inhibició de l'HDAC2 induïx apoptosi en les cèl·lules de neuroblastoma (Oehme et al., 2009a).

Així doncs, membres individuals de la família d'HDACs controlen programes cel·lulars rellevants del neuroblastoma, incloent la supressió de la diferenciació (HDAC8) i la supressió de l'apoptosi (HDAC2), i estan involucrades en la funció d'NMYC (HDAC1) i la resistència a múltiples drogues (HDAC1) (Figura 38).

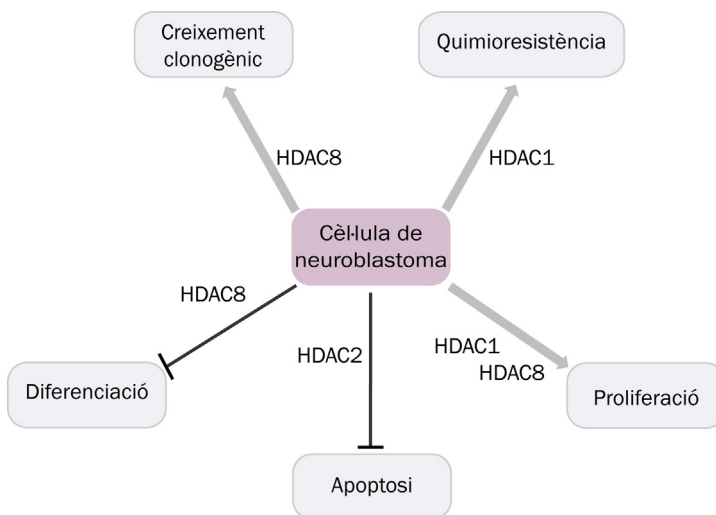


Figura 38. Membres de la família d'HDACs controlen punts clau de la biologia cel·lular del neuroblastoma. Modificat de Witt et al. (2009).

HDIs i el neuroblastoma

En el neuroblastoma són varis els HDIs que s'han demostrat efectius *in vitro*. El primer HDI testat front el neuroblastoma, abans i tot de que es conegués la seva capacitat de inhibir l'activitat de les HDACs, va ser el compost antiepilèptic àcid valproïc. Aquest compost es va descriure que induïa efectes antiproliferatius en aquestes cèl·lules tumorals, però presentava la desavantatge farmacològica d'haver-se d'emprar en concentracions molt elevades, del rang milimolar, per a exercir la seva activitat antitumoral. Posteriorment diferents grups van iniciar els seus estudis en la cerca d'HDIs més potents que actuessin en aquest model cel·lular en concentracions de l'ordre micromolar, com els derivats de l'àcid hidroxàmic, les benzamides i els tetrapèptids cíclics.

En el moment d'iniciar el nostre treball existien varis estudis que descrivien l'efecte de diferents HDIs sobre els neuroblastomes. Alguns HDIs com CBHA, PB, i BL1521, van mostrar l'habilitat d'induir aturada del cicle cel·lular en la fase G1/S, així com apoptosi caspasa dependent en algunes línies cel·lulars de neuroblastoma (Coffey et al., 2000; Ouwehand et al., 2005; Subramanian et al., 2005a; Subramanian et al., 2005b). L'alliberació de Bax de Ku70 posterior a l'acetilació de Ku70 s'ha mostrat que indueix l'apoptosi induïda per HDIs en cèl·lules de neuroblastoma (Subramanian et al., 2005a; Subramanian et al., 2007). Alguns articles indiquen la reducció del creixement de tumors *in vivo* tant en tractament únicament amb HDIs com en combinació amb altres modalitats de tractament (Coffey et al., 2000; Jaboin et al., 2002; Michaelis et al., 2007; Muhlethaler-Mottet et al., 2006).

Objectius

Objectius

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat buscar nous agents inductors de diferenciació, aturada del cicle cel·lular o mort cel·lular, per a les cèl·lules de neuroblastoma humà, més eficaços i més selectius que els fàrmacs utilitzats en la teràpia actual. La cerca s'ha realitzat en base als coneixements existents sobre les bases moleculars de la malaltia i els estudis previs realitzats amb agents moduladors de la mort cel·lular en altres models. Amb aquesta finalitat, hem estudiat l'efecte *ex vivo* en diferents línies cel·lulars de neuroblastoma humà de dos compostos, el pigment bacterià prodigiosina, i l'inhibidor general d'histona desacetilases de classe I/II tricostatina A. L'objectiu central ha estat mostrar l'efecte anticancerós d'ambdós compostos i ampliar els coneixements sobre els seus mecanismes d'acció en el model de neuroblastoma.

Els objectius específics de la present tesi es poden desglossar en tres punts concrets:

- Assajar la viabilitat cel·lular de diferents línies de neuroblastoma front a compostos potencialment anticancerígens.
- Estudiar la mort induïda per prodigiosina en línies cel·lulars de neuroblastoma.
- Estudiar la mort induïda per la tricostatina A en línies de neuroblastoma.

Material i mètodes

Tècniques de cultiu cel·lular

Reactius i productes específics

Productes	Empresa proveïdora
CBHA	Calbiochem
Cisplatí	Sigma
3-metiladenina	Sigma
Mitotracker®	Molecular Probes
MTT	Sigma
Prodigiosina	Development Therapeutics Program National Cancer Institute
Rapamicina	Calbiochem
SAHA (Vorinostat)	Cayman Chemical
Tricostatina A	Sigma
Timidina tritiada	Amersham Boisciences
z-IETD.fmk	MBL
z-VAD.fmk	Bachem

Línies cel·lulars

Les línies cel·lulars de neuroblastoma humà es cultiven en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) o en RPMI 1640 (*Royal Park Memorial Institute*), tal i com s'indica en la següent taula, suplementats ambdós amb un 10% de *fetal bovine serum* (FBS), glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicil·lina i 100 µg/ml d'estreptomicina. En el cas de la línia IMR-32 a més a més el medi es complementa també amb piruvat 100 µg/ml.

Línies cel·lulars de neuroblastoma	Medi	% CO ₂	Tripsinitzar	Origen	Tipus neuroblàstic
SH-SY5Y	DMEM	10	✓	ATCC	N
SH-SY5Yhp	DMEM	10	✓	ATCC	N
IMR-32	DMEM	10	✓	ATCC	N
LAN-1	RPMI	5	✓	*J.Mora	N
LA1-55N	RPMI	5	✗	*J.Mora	N
SK-N-SH	DMEM	10	✓	ATCC	N
SK-N-JD	RPMI	5	✗	*J.Mora	I
LA1-5S	RPMI	5	✓	*J.Mora	S
SK-N-AS	RPMI	5	✓	*J.Mora	S

* Línies cel·lulars que han estat cedides pel grup del Dr. Jaume Mora de l'hospital St. Joan de Deu, Barcelona, al qual estem molt agraïts per la seva col·laboració desinteressada.

Els cultius es mantenen en una atmosfera humida a una temperatura de 37 °C que conté un 10 % o un 5 % de CO₂ depenent del medi emprat. Un cop arribades a una confluència aproximada del 80 % cal canviar les cèl·lules de plat, per a fer-ho en algunes de les línies és necessària l'addició de tripsina (0,25 %).

Criopreservació i descongelació

Criopreservació

Les cèl·lules es resuspenen en el seu medi de cultiu complementat amb un 10% de DMSO estèril i s'aliquoten en tubs de 2ml que es mantenen a -80°C durant 12-24 hores en un congelador d'isopropanol on la temperatura disminueix lentament. Finalment es traslladen al congelador de nitrogen líquid.

Descongelació

El tub criopreservat es situa en un bany a 37 °C. Quan el contingut està gairebé descongelat es bolca en un falcon amb 50 ml de medi prèviament escalfat a 37 °C. Les cèl·lules es centrifuguen 5 minuts a 1000 rpm per eliminar el medi que conté el DMSO i finalment es resuspenen en medi fresc per tal de poder ser cultivades.

Respirometria d'alta resolució

La mesura poligràfica del consum d'oxigen de les cèl·lules de neuroblastoma s'ha dut a terme a 37°C amb un elèctrode d'oxigen d'alta resolució del tipus Oxygraph (Oroboros, Austria) amb l'agitació fixada a 750 rpm. L'oxigen dissolt al medi d'incubació difon a través d'una membrana de tefló i es redueix en posar-se en contacte amb l'elèctrode de platí polaritzat a 0,6 V, generant-se un corrent elèctric proporcional a l'activitat d'oxigen de la solució. El protocol complet es va finalitzar en un període de 50-60 minuts. Les mesures de concentració i consum d'oxigen es van emmagatzemar a intervals de 2 segons utilitzant un sistema d'adquisició de dades informatitzat (Datlab, Austria).

Material
Medi RPMI
Oligomicina (stock 2mg/ml en etanol)
FCCP (stock a 1mM en etanol)
Antimicina A (stock a 1mM en etanol)
Digitonina (stock 10g/ml en DMSO)
Ascorbat (stock a 100mM en aigua MiliQ estèril)
TMPD (stock 20mM en aigua MiliQ estèril)

Abans de començar les mesures de consum d'oxigen, cal equilibrar el medi de respirometria amb aire a 37°C i agitació a 750 rpm, fins que s'obté un senyal estable per a la calibració en condicions saturants d'aire. A partir d'aquest moment es pot introduir la mostra i començar les mesures. En el nostre cas es van tripsinitzar les cèl·lules al final del tractament i després d'un rentat es van resuspendre en medi RPMI complet. El número de cèl·lules utilitzat va ser de 1×10^6 /ml, en un volum final de 2 ml.

Les mesures dels diferents estats de la cadena de transport d'electrons es van realitzar afegint, mitjançant la punció amb una xeringa *Gilson*, diferents drogues de manera successiva tal i com es detalla a continuació:

Rutina: respiració basal en medi de respirometria.

Respiració amb la nostra droga d'estudi (PG) o amb el seu vehicle (MeOH).

Respiració desacoblada: respiració en presència d'oligomicina 1 µg/ml. L'oligomicina inhibeix la ATP sintasa.

Respiració totalment desacoblada: s'inicia amb l'addició del desacobrador FCCP (carbonil cianida p-trifluorometoxifenil-hidrazona) 1 µM. S'afegeix poc a poc (de 2µl en 2µl) per a evitar arribar a inhibir la respiració sense haver arribat a visualitzar el nivell de respiració màxima.

Aturada de la respiració: s'aconsegueix amb l'addició de 5 µM d'antimicina A. Aquest compost inhibeix el complex III de la cadena respiratòria.

COX: finalment, l'activitat citocrom c oxidasa (COX) es va mesurar en presència de 2 mM ascorbat/ 500µM TMPD. L'activitat COX es va fer servir com a normalitzador intern de les mesures anteriors de la respiració.

Microscopia electrònica

Per a estudiar la mort cel·lular induïda pel TSA en les línies cel·lulars de neuroblastoma humà s'han visualitzat les cèl·lules al microscopi electrònic. Per a la preparació de les mostres es cultiven 2 milions de cèl·lules en plaques de Petri. A les 24 hores es realitzen els tractaments desitjats i es fixen les cèl·lules amb un solució que conté glutaraldehyd al 2 % i paraformaldehyd al 1 % durant de 4 hores a 4 °C. Finalment les cèl·lules es recullen en un *ependorf* i es realitza una centrifugació a 1500 rpm per tal d'obtenir un precipitat visible.

El precipitat obtingut es manté amb fixador i es trasllada als serveis científico-tècnics de la UB on es va finalitzar el seu processament.

Les mostres es van visualitzar en un microscopi electrònic de transmissió JEOL 1010 amb sistema de digitalització d'imatges Bioscan (Gatan).

Anàlisi de la viabilitat cel·lular

Anàlisi de la viabilitat per MTT

Un dels mètodes més clàssics per a determinar la viabilitat cel·lular és l'assaig de MTT (Mossman, 1983). Es basa en la capacitat dels mitocondris de convertir el MTT (de color groc) en cristalls de formazan (de color porpra). Aquesta conversió depèn del poder reductor que caracteritza les cèl·lules vives.

Les cèl·lules de neuroblastoma es cultiven en plaques de 96 pous a 1×10^4 cèl·lules/pou, en un volum final de 100 μ l. Després del temps indicat de tractament s'addicionen 10 μ l de MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli) (Sigma), preparat a 5 mg/ml en PBS estèril, i s'incuba durant un mínim de tres hores. El precipitat porpra de formazan que apareix es dissol en 100 μ l d'isopropanol:HCl 1M (24:1), i se'n determina l'absorbància a 550nm en un lector multiplaca. La viabilitat s'expressa en percentatge respecte la viabilitat de les cèl·lules que no han estat tractades (control). Cada condició de l'experiment es realitza per triplicat i els resultats s'expressen en forma de mitjana \pm desviació estàndard. Un decrement de la viabilitat mesurada per aquest sistema pot ser deguda a mort cel·lular, a una disminució de la proliferació en les cèl·lules tractades respecte les cèl·lules no tractades, o a ambdós processos simultàniament.

Anàlisi de la viabilitat per Trypan Blue

L'assaig d'exclusió per *Trypan Blue* (TB) és un mètode molt emprat per a mesurar viabilitat cel·lular (Freshney, 1987). Es basa en la capacitat de la membrana de les cèl·lules viables d'excloure el colorant, mentre que les cèl·lules no viables es veuen tenyides de blau quan s'observen al microscopi.

En aquest experiments, després d'haver-se realitzat els tractaments indicats, les cèl·lules es tenyeixen amb 0.2 % de TB (Sigma) durant 2 minuts. La proporció de cèl·lules no marcades, cèl·lules viables, es calcula per comptatge en una cambra de Neubauer en un microscopi invertit.

Anàlisi de la proliferació cel·lular

L'efecte de la PG sobre la proliferació cel·lular s'ha determinat de manera concentració depenent amb l'assaig d'incorporació de timidina tritiada; aquest assaig ens permet conèixer la capacitat que tenen les cèl·lules d'incorporar un substrat radioactiu, proporcionant una estimació del número de cèl·lules que estan sintetitzant ADN.

En plaques de 6 pous es sembren 10^5 cèl·lules per pou en un volum final de 2 ml i es cultiven durant 24 hores per a permetre una correcta adhesió; s'incuben llavors amb les concentracions de PG i temps indicats i 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de timidina [^3H]. Posteriorment es realitzen dos rentats amb PBS 1X fred i s'afegeix 1 ml de tricloracètic (TCA) al 5 % a 4 °C durant 20 minuts. Es renten les mostres amb 1 ml de TCA al 5 % fred i seguidament amb 2 ml d'etanol al 70 %. Es deixa assecar la placa a temperatura ambient. Quan l'etanol s'ha evaporat s'afegeix a cada pouet el tampó de lisi, 0.6 ml de solució durant 20 minuts a 37°C. La quantitat de timidina radioactiva incorporada a l'ADN es mesura en un contador de centelleig (Beckman LS5000TA, USA) emprant per cada 0.5 ml de mostra, 5 ml de líquid de centelleig.

Solució de lisi

Na₂CO₃ 2 %

NaOH 0.1 M

SDS 1 %

Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux

Aquest mètode es basa en l'ús del iodur de propidi (IP) per a mesurar el contingut d'ADN. Aquest fluorocrom s'intercala en els àcids nucleics incrementant la seva fluorescència. La unió és estequiomètrica. Degut a que aquest pigment no és específic del DNA és necessari tractar la mostra amb RNAsa per tal d'eliminar el RNA.

Es sembren 2 milions de cèl·lules per condició, passades 24 hores es realitzen els tractaments indicats en els respectius experiments. Les cèl·lules, adherides i flotants, es renten dos cops en PBS 1X complementat amb un 1 % de FBS i es resuspenen en 500 μl de la mateixa solució abans de fixar-se en 5 ml d'etanol fred (-20°C) al 70 %; és molt important que les cèl·lules estiguin ben disgregades i resuspeses per tal d'evitar la formació d'agregats. La fixació es realitza afegint gota a gota la suspensió de cèl·lules a la solució d'etanol fred amb l'ajut d'una pipeta *pasteur*, a l'hora que s'agita suaument la solució amb un vòrtex. Es fixen a -20 °C O/N. L'endemà es centrifuguen per a eliminar l'etanol i es renten en PBS amb 1% de sèrum, es centrifuguen i es descarta la fase aquosa. El precipitat es resuspen en 300 μl de tampó citrat-

fosfat i s'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient. Posteriorment es centrifuguen per a eliminar el tampó i es resuspen el precipitat en 400 µl de PBS 1X amb 1% sèrum; s'afegeixen seguidament 50µl de IP (0.5 mg/ ml) (Sigma) i 5 µl de RNAsa A lliure de DNAsa (10mg/ ml). Després de 30 minuts a la foscor i a temperatura ambient, les mostres es filtren i s'analitzen pel citòmetre de flux.

Tampó citrat-fosfat (192: 8)
Àcid cítric 1 M
Na ₂ HPO 0.2 M
pH 7.8

Mesura de l'apoptosi per citometria de flux

El protocol es el mateix que s'ha descrit per a l'anàlisi del cicle cel·lular.

Les cèl·lules apoptòtiques apareixen en la distribució del cicle cel·lular com a cèl·lules amb un contingut d'ADN inferior al de les cèl·lules en G1 permetent-nos calcular el percentatge de cèl·lules apoptòtiques.

Tècniques d'anàlisi de proteïnes

Extracció desnaturalitzant d'extractes totals

Entre 1 i 2 x 10⁶ cèl·lules s'incuben en presència dels factors corresponents durant el temps indicat per a cada experiment. Es recullen i es separen del medi per centrifugació durant 5 minuts a 1000 rpm. El precipitat o sediment es resuspen amb PBS i es torna a centrifugar durant 5 minuts a 1000 rpm per tal d'eliminar totalment el medi de cultiu. Per a lisar les cèl·lules s'afegeixen 100-200 µl de tampó de Laemmli (SB; tampó de lisi total) i es vortegen durant 10 segons. Finalment les mostres s'escalfen a 95°C durant 10 minuts. Aquest protocol permet l'obtenció d'extractes desnaturalitzants al contenir el SB SDS en la seva composició.

SB
Tris-HCl 80mM pH 6.8
SDS 2 %
Glicerol 10 %

Extracció proteica fraccionada

S'utilitzen entre $1-2 \times 10^6$ cèl·lules cultivades en les condicions experimentals adequades en cada cas i durant els temps indicats. Es renten les cèl·lules per centrifugació 10 minuts a 800 rpm i es lisen a 4°C durant 30 segons amb 100 µl de tampó de lisis fred. Posteriorment les mostres es centrifuguen a 4°C durant 3 minuts a 13.000 rpm. El sobrenadant obtingut correspon a la fracció citosòlica i es lisa afegint 40 µl de SB 4X. El precipitat, que correspon a la fracció de nuclis i mitocondris, es lisa amb 300 µl de SB 1X.

Tampó de lisi	Cocktail Inhibidor de proteases 100X
Tris 1 M pH 6.8	Leupeptina 100 mg/ml
Sucrosa 1 M	Pepstatina 100 mg/m
EDTA 0.25 M	Aprotinina 100 mg/ml
Digitonina 100 mg/ml	Benzamidina 100 mg/ml
DTT 1 M	
PMSF 100 mM	
Cocktail inhibidor de proteases	

Extracció d'extractes proteics nuclears

Es renten les cèl·lules amb PBS fred un parell de vegades i es fa *scrapping* en gel amb 1 ml del mateix PBS fred. Les mostres es centrifuguen a 1200 rpm durant 5 minuts a 4°C i es desprecia el sobrenadant. S'afegeix 1 ml del tampó A (complementada amb inhibidors de fosfatases i proteases), i es deixa incubant durant uns 20 minuts en gel, realitzant-se durant aquest temps 3 vòrtexs de 20 segons. A continuació es centrifuguen durant 5 minuts a 1000g, i es descarta de nou el sobrenadant i s'afegeix 1 ml de Tampó A (complementada amb inhibidors de fosfatases i proteases). Es fa un altre vòrtex i es deixa 5 minuts en gel. Centrifuguem a 4°C durant 5 minuts a 100g, descartem el sobrenadant i afegir 50 µl de tampó C (complementada amb inhibidors de fosfatases i proteases), i ho deixem reposar 20 minuts en gel. El pellet es resuspen i es centrifuga urant 5 minuts a velocitat màxima a 4°C. Finalment el sobrenadant es pot congelar directament a -80°C o quantificar amb el kit d'assaig de proteïna (BCA).

Tampó A		Tampó C	
HEPES-KOH pH=7.9	10 mM	HEPES-KOH pH=7.9	20 mM
MgCl ₂	1.5 mM	Glicerol	25 %
KCl	10 mM	NaCl	420 mM
Digitonina 100 mg/ml		MgCl ₂	1.5 mM
		EDTA	0.2 mM

Inhibidors proteases		Inhibidors fosfatases	
PMSF	1 mM	Ortovanadat sòdic	0.1 mM
Benzamidina	0.1 mg/ml	NaF	20 mM
Agent reductor			
DTT	0.5 mM		

Valoració de la concentració de proteïna als extractes proteics

Per al anàlisi de proteïnes mitjançant la tècnica de Western Blot, prèviament és necessari quantificar la concentració de proteïnes existents en l'homogenat per tal de poder carregar la mateixa quantitat de mostra en cada pou del gel d'electroforesi. Cal tenir un patró de BSA amb el mateix tampó en el que es tenen les mostres (entre 0 i 5 µg/µl per tal d'estar dins del rang de linealitat del mètode).

En termes generals utilitzarem el mètode BCA quan el tampó conté SDS, mentre que si conté agents reductors el mètode d'elecció serà el Bradford.

Mètode BCA

El kit BCA™ es basa en una determinació colorimètrica quantitativa amb l'àcid bicinrònic (BCA) que detecta la reducció de Cu deguda a l'entorn bàsic de les proteïnes. Es un reactiu compatible amb la presència de diversos detergents, entre ells 1% SDS. Dos molècules de BCA quelen una molècula de Cu⁺ i el complex resultant presenta color de forma directament proporcional a la quantitat de proteïna existent en la mostra.

El reactiu BCA es prepara al moment amb les solucions A i B proporcionades per el *kit* (raó 50:1). En una placa ELISA de 96 pous es posen en cada pou, per triplicat: 100 µl de patró BSA + 100 µl de BCA, i 100 µl de mostra diluïda en aigua MilliQ (1:100) + 100 µl de BCA. S'incuba durant 60 minuts a 37° C. La quantificació de proteïnes es realitza utilitzant el lector de plaques a λ 540 nm.

Mètode Bradford

Aquest mètode es basa en l'equilibri existent entre tres formes del Blau de Comassie G. Quan les condicions són molt àcides el compost és més estable en la seva forma doblement protonada que li proporciona una coloració vermella (λ 470nm). Quan pel contrari s'uneix a proteïna, esdevé més estable en la seva forma no protonada que li confereix una tonalitat blava

(590 nm). Aquest mètode proporciona una resposta colorimètrica més estable que el BCA però influenciable per compostos no proteics com per exemple els detergents.

El reactiu Bradford s'utilitza diluït 1:5 en aigua. En una placa ELISA es fan triplicats de les mostres a analitzar; 2 µl de mostra i 200 µl Bradford. Després d'una incubació de 5-10 minuts es realitza la lectura a λ 620 nm.

Anàlisi de proteïnes per Western Blot

El contingut proteic dels extractes es quantifica i iguala en quantitat de proteïna i volum final, en condicions desnaturalitzants i reductores en presència de SB, 100 mM de DTT i blau de bromofenol (aquest darrer s'utilitza per a visualitzar l'avanç del front de proteïnes en l'electroforesi). Les mostres s'escalfen abans de carregar-les al gel durant 10 minuts a 95°C per tal de desnaturalitzar-les completament.

El gel (SDS-PAGE) està format per una porció concentradora, que es prepara a una concentració de 3% d'acrilamida i d'una porció separadora que en funció de les proteïnes que es volen analitzar, es prepara del 7'5 al 15% d'acrilamida. A menor tamany de proteïna a analitzar major serà el percentatge d'acrilamida del gel a preparar, per a permetre una millor resolució de les proteïnes.

Tampó separador	Tampó concentrador
Tris-HCl 375 mM	Tris-HCl 125 mM
SDS 0.1 %	SDS 0.1 %
pH 8.8	pH 6.8

Les mostres es carreguen en els pous generats en la porció superior del gel concentrador i la electroforesi es realitza en cubetes adequades amb tampó d'electroforesi aplicant una corrent elèctrica de 30-40 mA/gel (125mM).

Tampó d'Electroforèsi
Tris-HCl 25mM pH 8.3
SDS 0.1%
Glicina 192mM

Un cop finalitzada la electroforesi, s'inicia la transferència, procés en el que les proteïnes són fixades en una membrana de PVDF prèviament activada (amb metanol i aigua). S'aplica una

corrent de 80 mA durant 1 hora 30 minuts en una cubeta amb tampó de transferència en agitació continua i en fred per a evitar un escalfament excessiu.

Tampó de Transferència 10X
Tris-HCl 25 mM pH 8.3
Glicina 192mM
Metanol 10-15 %

Finalitzada la transferència, les membranes es renten amb TBS-T durant uns minuts i s'incuben durant una hora a temperatura ambient en TBS-T 1X 5% llet desnatada per a bloquejar les unions inespecífiques de l'anticòs primari. A continuació s'incuba la membrana amb la dilució adequada de l'anticòs (en una solució de TBS-T 5% llet o BSA 0.05% Azida sòdica) durant la nit a 4°C. La solució d'anticòs primari es recicla mentre sigui funcional.

TBS-T 20X	TBS 20X
Tris-HCl 20 mM pH 7.5	Tris-HCl 20 mM pH 7.5
NaCl 137mM	NaCl 137 mM
Tween 0.1 %	

Després de la incubació amb l'anticòs la membrana es renta en un volum petit de TBS-T 1X en agitació (es fa un rentat ràpid i tres de 5 minuts), i s'incuba una hora en presència del anticòs secundari diluït en TBS-T 1X (1/2000) durant una hora a temperatura ambient. Aquest anticòs detecta IgG de l'espècie en que s'ha generat el primari.

Abans del revelat es renta la membrana amb TBS-T tres cops durant 5 minuts en agitació i finalment un rentat de TBS durant 10 minuts.

Per a la detecció de l'anticòs secundari s'utilitza la solució ECL, que al entrar en contacte amb l'enzim HRP (*horse raddish peroxidase*) de l'anticòs secundari s'oxida i emet luminescència. El revelat es duu a terme contactant la membrana amb una pel·lícula fotogràfica per a detectar la llum emesa per la membrana en la regió on l'anticòs secundari, unit al primari, ha detectat la banda d'interès. La pel·lícula es revela durant un temps variable per mètodes tradicionals de revelador i fixador. Alternativament, es realitza revelat digital en un equip d'imatge *Fujifilm LAS 3000 Intelligent Dark Box IV*.

Deshibridació de membranes

Per a eliminar els anticossos units a les proteïnes de la membrana de PVDF les membranes es renten en condicions desnaturalitzants en una solució de deshibridació a una temperatura de 56 °C durant 30 minuts en agitació (el β -mercaptoetanol s'afegeix a la solució de deshibridació just en el moment de la seva utilització). Seguidament les membranes es renten 3 cops en TBS-T durant 15 minuts.

Solució de deshibridació
Tris 62.5 mM
SDS 2%
B-mercaptoetanol 100 mM
pH 6.8

Listat dels anticossos primaris utilitzats

	Proveïdor	Referència	Dilució
Acetil-H3	Millipore	Q16695	1:1000
Acetil-H4	Upstate	06-866	1:2000
β -Actina	Abcam	Ab6276	1:5000
AIF	Santa Cruz	SC-9416	1:200
Atg5L	Abgent	AP1812b	1:500
At12	Abgent	AP1818a	1:500
Bcl-X _L	Transduction	B22630	1:1000
Beclina	Transduction	612112	1:500
Bid	Cell signalling	2002	1:1000
Bmf	Cell signalling	4692	1:1000
BNIP3	Sigma	B7931	1:500
Caspasa 2	Santa Cruz	SC625	1:500
Caspasa 3	Pharmlingen	557035	1:200
Caspasa 7	Cell Signalling	9494	1:1000
Caspasa 8	BD Pharmlingen	551234	1:500
Caspasa 9	Cell signalling	9501	1:1000
Citocrom c	BD Pharmlingen	556432	1:1000
E2F-1	Santa Cruz	SC193	1:5000
Grp78	Transduction	610978	1:500
LC3	T. Yoshimori		1:2000
MDM2	Santacruz	SMP14	1:100
N-Myc	Calbiochem	OP13	1:500
p21	Santa Cruz	SC397	1:200
p53	Labvision	MS186-P1	1:200
PARP	Santa Cruz	SC7150	1:200
pRB	Bio Labs	93075	1:5000
Puma	Abcam	AB9645	1:2000
S100	Oncogene	OP159	1:100
Smac/Diablo	Santa Cruz	SC-12681	1:200
Survivina	Novus Biological	NB500-201	1:250
TNF- α	RD systems	AJ15	1:500
α -Tubulina	Sigma	T9026	1:4000
Twist (H-81)	Santa Cruz	SC15393	1:500
Ki-67	Oncogene	NA59	1:800

	Proveïdor	Referència	Dilució
ECL Anti-goat	Dako	P0449	1:2500
ECL Anti-mouse	Healthcare	NA931	1:5000
ECL Anti-rabbit	Healthcare	NA934V	1:5000

* L'anticòs anti-LC3 utilitzat ha estat cedit pel Dr. Tamotsu Yoshimori del National Institute of Genetic, Mishima, Shizuoka-ken, Japó, al qual estem molt agraïts per la seva col·laboració desinteressada.

Tècniques de biologia molecular

ELISA

Les cèl·lules de neuroblastoma es cultiven en plaques de 96 pous a 1×10^4 cèl·lules/pou, en un volum final de 100 μ l. Després del temps indicat de tractament es va procedir a recollir el sobrenadant del cultiu cel·lular. Per tal d'eliminar les partícules i agregats es realitza una centrifugació de 1000 rpm durant 10 minuts. A continuació varem procedir amb les indicacions proporcionades pel kit d'ELISA (DIACLONE, número de catàleg, 950 090 096 CE).

Obtenció de l'ADN fragmentat

Les cèl·lules (1×10^5) es sembren en plaques de 12 pous i a les 24 hores es tracten durant el temps i les concentracions de PG indicades. Posteriorment les cèl·lules es centrifuguen i el precipitat es lisa durant 20 minuts a 4 °C amb el tampó de lisi I. Després de centrifugar les mostres durant 15 minuts a 13.000 g el sobrenadant, fracció que conté l'ADN fragmentat (l'ADN sencer resta en el precipitat) es tracta a 37 °C O/N amb el tampó de lisi II que conté proteïnasa K. L'ADN d'interès s'obté amb dos extraccions consecutives amb una solució de fenol i es precipita a -20 °C O/N amb NaCl 140 mM i dos volums d'etanol. Els precipitats d'ADN es renten dos cops amb etanol al 70 % dissolt en aigua bidestilada, i es tracten amb RNAsa durant 1 hora a 37°C. Finalment les preparacions es corren en un gel d'agarosa al 1%, segons el protocol descrit per Bellossillo et al (1998). Els gels es tenyeixen amb bromur d'etidi i es visualitzen amb llum ultraviolat.

Tampó de lisi I	Tampó de lisi II
Tris-HCl 10 mM pH 7.4	NaCl 5 M
Tritó 100X 0.2 %	Tris-HCl 10 mM pH 8
EDTA 1 mM	EDTA 0.25 M
	SDS 20 %
	Proteïnasa K 0.2 mg/ml

Solució de fenol
Fenol-Cloroform-alcohol isoamílic (25:24:1)

EMSA

Els complexos proteïna-oligonucleòtids es corren en un gel d'acrilamida no desnaturalitzant.

Gel al 5% acrilamida		TBE 5X	
Acrilamida	9.375 ml	0.45 M	Tris-Base
TBE 10x	1.875 ml	0.45 M	Àcid bòric
Glicerol	1.875 ml	10mM	EDTA
Aigua fins a	75 ml		pH=8
APS	577.5 µl		
TEMED	75 µl		

Es realitza un pre-running sense mostra ni LB d'ADN a 25 mA durant un mínim d'una hora, fins que l'amparatge hagi baixat fins a uns 15 mA, per tal de que el gel s'equilibri amb el tampó. Mentre realitzem el pre-running es marca la sonda: 33 µl d'aigua + 2.5 pmols oligo anellat (1pmol/ml) + 0.5 µl T4PKA (poli nucleotid kinasa) + 10 µl tampó A de la T4PNK + 4 µl gamma ATP (l'últim). El volum final és de 50 µl. Es deixa incubar durant 1 hora 30 minuts a 37 °C. Posteriorment preparam les mostres a carregar al gel: 8 µg extracte proteic + 4 µl tampó d'unió 2X +1 µl de poli (dl-dc), i es deixa 10 minuts a temperatura ambient. Un cop afegida la sonda marcada (1 µl) ho deixem incubar 15 minuts més a temperatura ambient.

Binding Buffer 2X	
DTT	2 mM
Tris pH7.5	80 mM
Glicerol	20 %
Sacarosa	20 %
CIMg2	10 mM
KCl	140 mM
EDTA	0.2mM

Mentre s'esperen les incubacions es carrega el LB d'ADN sol, fins a que penetri en el gel. Seguidament es carreguen les mostres. L'electroforesi es realitza a la cambra freda a 20 mA durant 3-4 hores (per evitar que s'escalfi en excés, ja que del contrari la sonda no s'hibridaria amb l'extracte nuclear). Un cop finalitzat es diposita el gel en l'assegador de buit durant uns 45 minuts. Finalment posem el film en una pantalla intensificadora o/n a -80°C i es procedeix al seu revelat.

Obtenció del RNA

S'han utilitzat dos protocols per a obtenir ARN segons la quantitat requerida per a la tècnica d'anàlisi posterior i la quantitat de cèl·lules disponible de cada pacient. Amb el reactiu Ultraspec

(Biotecx laboratoris, INC), partim d'un número elevat de cèl·lules i obtenim una quantitat elevada d'ARN, de l'ordre de μg . El kit d'extracció RNeasy Micro Kit (Qiagen) en canvi ens permet partir d'un nombre força inferior de cèl·lules i obté una menor quantitat d'ARN (de l'ordre de ng).

Durant l'obtenció i manipulació de les solucions d'ARN, tot el material utilitzat ha d'estar autoclavat, lliure de RNases i s'utilitzen guants durant tot el procés.

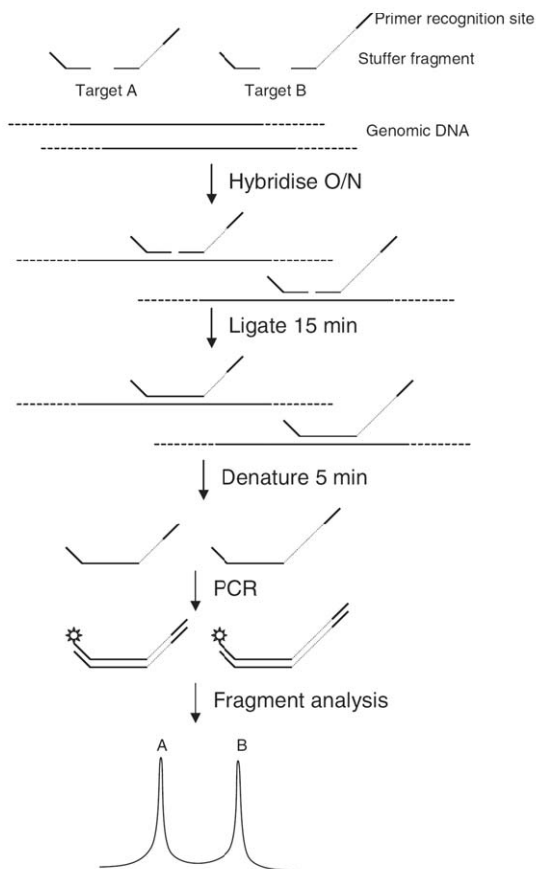
Ultraspec

El RNA s'obté d'un mínim de 2×10^6 cèl·lules de neuroblastoma per condició. Després d'haver transcorregut el temps de tractament indicat en cada experiment, les cèl·lules es centrifuguen durant 10 minuts a 1200 rpm i el precipitat es resuspen en 1 ml de reactiu Ultraspec. L'homogenat es fa passar a través d'una agulla de 20G per a llisar completament les cèl·lules. Es procedeix amb el protocol comercial del producte mantenint sempre les mostres en fred. L'ARN obtingut es resuspen en 20-40 μl d'aigua tractada amb DEPC.

RT-MLPA (Retrotranscriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

La RT-MLPA permet analitzar el número de còpies de fins a 40 seqüències d'ARNm (ARN mitocondrial) en un sol tub de reacció (Elderin, et al., 2003). Permet l'anàlisi del perfil d'expressió d'ARNm de les condicions d'interès.

L'RT-MLPA és una tècnica que permet la quantificació relativa de fins a 45 seqüències d'àcids nucleics en una sola reacció. Cada sonda de la RT-MLPA consisteix en 2 oligonucleòtids, un dels quals presenta una regió no hibriditzant que té una longitud i una seqüència diferent per cada àcid nucleic, permetent la seva separació mitjançant una electroforesis capil·lar. Com les sondes estan marcades amb un marcador fluorescent (FAM), un cop separats els productes es calcula l'àrea de fluorescència que és emesa per cada producte, el tamany de la qual serà proporcional a la quantitat inicial de l'ARNm del gen d'interès.



Esquema de la realització de RT-MLPA i llistat dels tamanyes de cada un dels productes de PCR segons dades de la casa comercial. Sondes específiques per a cada un dels gens són hibridades als cDNAs retrotranscrits a partir de l'ARN total. 16 hores després es realitza la lligació de les sondes. Cadascun dels pics de l'anàlisi correspon a un ARNm i la seva àrea és directament proporcional a la quantitat d'ARNm en la mostra oficial.

S'ha utilitzat el kit RT-MLPA kit R011-Apoptosi de MRC-Holland, que ens permet analitzar el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi (TAULA). Les seqüències d'ARNm a analitzar es retrotranscriuen a cDNA amb primers específics per a cada seqüència. A continuació 200 ng d'ARN total van ser retrotranscrits utilitzant *primers* específics pels gens d'interès. El cDNA obtingut va ser incubat durant 16 hores amb les sondes del *kit* a 60°C. Els oligonucleòtids van ser lligats afegint la Ligase-65 durant 15 minuts a 54 °C. Els productes de la lligació van ser amplificats per PCR (35 cicles, 30 segons a 95 °C, 30 segons a 60 °C i 1 minut a 72 °C). Els fragments amplificats, productes de la PCR, van ser separats per electroforesi capil·lar en un *48-capillary ABI-Prism 3730 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, CA). L'àrea de cadascun dels pics va ser analitzada utilitzant el programa -glucuronidasa (GUS).

Gen	Tamany del producte de PCR (PB)	Gen	Tamany del producte de PCR (PB)
BCLW	142	HIAP2	301
FLIP	148	HIAP1	310
BCLX	154	XIAP	319
NOXA	160	SURVIVIN	328
BCL2	166	BRUCE	337
BFL1	172	LIVINA	356
MCL1 S	178	SERPENTINA	355
MCL1 L	184	PUMA	364
B2M	193	PARN	373
BAD	202	AIF	382
BAX1	202	MOAP1	391
BAX2	220	GUSB	400
BAK	229	BNIP3L	409
BIM	238	APAF	418
BID	247	APAF L	427
BCL- R	256	APAF XL	433
BCLG	265	NIP3	445
HRK	274	SMAC	454
FTL	283	BMF	463
NAIP	292	BIK	472

Relació de gens relacionats amb l'apoptosi analitzats simultàneament per RT-MLPA. Tamany de cadascun dels productes de PCR segons les dades de la casa comercial. En blau s'indiquen els ens potencialment normalitzadors.

Tècniques histològiques

Immunocitoquímica

Les cèl·lules (1×10^5) es cultiven sobre cubres estèrils en plaques de 12 pous durant 24 hores. Després dels tractaments indicats es renten en PBS 1X i es fixen amb paraformaldehid al 4 % en PBS durant 20 minuts a temperatura ambient. Es renten tres vegades en PBS en agitació i es permeabilitzen amb 0.2 % tritó X-100 en PBS durant 4 minuts a temperatura ambient.

Seguidament es renten 3 cops en PBS en agitació i es bloquegen en PBS complementat amb 15 % de FBS durant 45 minuts. S'incuben les mostres amb l'anticòs d'interès O/N a 4 °C. Per a visualitzar els anticossos d'interès s'incuben les cèl·lules amb 1 µM TRTC-Conjugated phalloi. Les imatges es van adquirir utilitzant un microscopi confocal Leica TCS-SL Spectral.

Marcatge nuclear

Els nuclis s'han marcat amb Hoechst-33342 (H342), un marcador "vital" de DNA que atravesa la membrana plasmàtica i s'uneix preferentment als parells de bases A-T, tenint de blau la cromatina i marcant amb fluorescència els nuclis cel·lulars. Les cèl·lules no requereixen permeabilització per a la tinció, però si són necessàries condicions fisiològiques degut a que la internalització del H342 és un procés de transport actiu.

Les cèl·lules es cultiven en plaques de 6 pous i es deixen durant tota la nit per tal de permetre una correcta adhesió. Després dels tractaments requerits per l'experiment les cèl·lules, adherides i flotants, es renten amb PBS 1X i s'incuben durant un mínim de 30 minuts a 37°C amb 2 µl/ ml de H342 (Bisbenzimidide; Sigma). Finalment es procedeix a muntar les preparacions amb Mowiol (Calbiochem).

Solució H342

1 mM en H₂O estèril

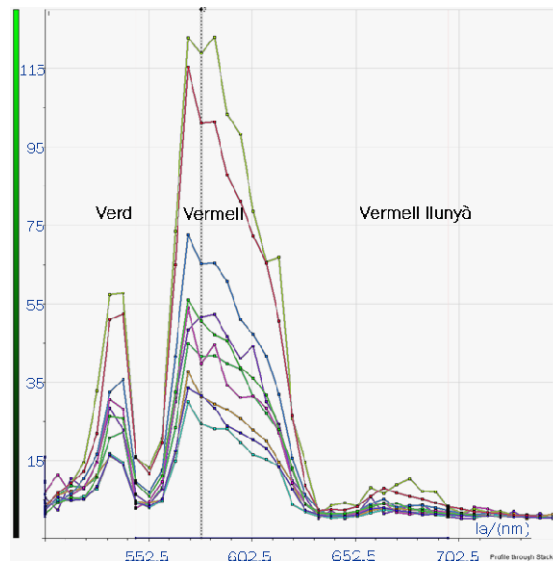
Marcatge mitocondrial

Com a marcatge selectiu de mitocondris s'ha utilitzat MitoTracker® (Molecular Probes). Existeixen diferents MitoTrackers que difereixen en les seves característiques espectrals i de fixació. En els nostres estudis hem emprat el MitoTracker Deep Red 633 (M-22426) per emetre aquest en una longitud d'ona que no coincideix amb la del compost PG (665nm i 580nm respectivament).

El MitoTraquer, que conté una fracció clorometil reactiva amb els grups tiol, es difon de forma passiva a través de la membrana plasmàtica i s'acumula en els mitocondris actius on és oxidat i resta segrestat per l'interacció amb grups tiol de proteïnes i pèptids, que formen un conjugat aldehid fluorescent que es fixa en el mitocondri.

Les cèl·lules (1×10^5) es cultiven sobre cubres estèrils en plaques de 12 pous durant 24 hores. Després de dels tractaments indicats s'incuben durant 30 minuts amb medi nou que conté

MitoTracker (250nM). Posteriorment les cèl·lules es fixen durant 20 minuts amb paraformaldehid al 4% en PBS 1X. Rentem un parell de cops amb PBS 1X abans de muntar les preparacions amb Mowiol (Calbiochem). Finalment observem les mostres en un microscopi de fluorescència (Nikon, E800) equipat amb un sistema automat d'instruments de diagnòstic fotogràfic (Spot JR).



Espectre d'emissió de la PG. Gràfica on es mostra l'espectre d'emissió de la PG per a la condició de major concentració utilitzada, 400 nM. El pic màxim d'emissió el trobem en la λ d'emissió del vermell, deixant-nos una finestra en el vermell llunyà que utilitzarem per a visualitzar els mitocondris amb el marcador mitocondrial MitoTracker® Deep Red 633

Taronja d'acridina

Entre d'altres utilitats, el taronja d'acridina (AO) pot ésser emprat com a mètode per a detectar gradients de pH intracel·lular i mesurar l'activitat de les bombes de protons (Castillo Avila et al 2005). Quan el AO entra en un grànul àcid es protona i resta atrapat en la seva membrana, esdevenint aquests grànuls visibles per microscòpia quan la concentració de AO és elevada, proporcionant-lis una coloració ataronjada. Per contra, quan es produeix una alcalinització granular, el AO es neutralitza poden sortir de la membrana granular.

Les cèl·lules (10^5) es sembren sobre cubres autoclavats en plaques de 6 pous. A les 24 h es tracten durant el temps indicat i amb les concentracions de PG indicades. La tinció "vital" es duu a terme després de rentar dues vegades les cèl·lules amb PBS 1X, amb una solució de 5 $\mu\text{g/ml}$ de taronja d'acridina (Sigma) durant 30 minuts. Després de la incubació les cèl·lules es renten 3 vegades amb PBS complementat amb un 10% de *fetal bovine serum* durant 5 minuts i

es procedeix al muntatge de les preparacions en PBS. Ràpidament les cèl·lules són examinades en un microscopi de fluorescència (Nikon, E800).

Solució Taroja d'Acridina
4mg/ml en aigua estèril

Determinacions bioquímiques

Activitat caspasa 8

La caspasa 8 és una caspasa iniciadora que es troba present en la majoria de cèl·lules en forma de proenzim, en un estat inactivat. Quan s'indueix la via apoptòtica de receptors de mort (extrínseca), la caspasa 8 esdevé activa via oligomerització en un complex multimèric anomenat DISC, format pel zimogen, els receptors de mort activats i proteïnes adaptadores. La caspasa 8 activa pot actuar sobre altres caspases amplificant el senyal apoptòtic.

Cultivem 2 milions de cèl·lules en les condicions i els temps indicats en l'experiment i prosseguim amb les indicacions comercials del producte.

Determinació ATP

La mort cel·lular, especialment l'apoptosi, és un procés dependent d'energia que requereix d'ATP. Quan els nivells d'ATP cauen fins al punt que la cèl·lula ja no pot realitzar les seves funcions metabòliques bàsiques, la cèl·lula mor. Una cèl·lula apoptòtica típica mostra una reducció significativa en els seus nivells d'ATP, motiu pel qual la pèrdua de nivells d'ATP en la cèl·lula s'utilitza com a indicador de mort cel·lular. D'altra banda, l'increment dels nivells d'ATP s'empra com a indicador de proliferació cel·lular.

El contingut d'ATP es va mesurar en extractes cel·lulars de cultius cel·lulars control i de cultius tractats durant 3 o 24 hores amb PG 1.5 μ M. Es va utilitzar un *kit* d'assaig d'ATP (Calbiochem, Beeston/Nottingham, UK) basat en una detecció bioluminescent dels nivells d'ATP; el *kit* utilitza la luciferasa per a catalitzar la formació de llum a partir de l'ATP i la luciferina. Es procedeix amb el protocol comercial del producte mantenint sempre les mostres en fred. L'emissió de llum es mesura en un luminòmetre (Fluostar optima Microtiter Plate Reader). Les concentracions d'ATP es calculen a partir de la corba estàndard generada utilitzant l'ATP estàndard inclòs en el *kit*.

Resultats

Capítol 1

Caracterització de la Mort Cel·lular Induïda
per Prodigiosina en Línies Cel·lulars de
Neuroblastoma Humà

Introducció

La prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigiose) (PG) és un metabòlit secundari produït per la bactèria *Serratia marcescens* amb diverses activitats biològiques (Montaner and Perez-Tomas, 2003), però principalment estudiat per el seu potencial com a agent quimioterapèutic. *In vitro* a estat testat front una gran varietat de línies cel·lulars tumorals i cultius primaris (Pandey et al., 2009; Perez-Tomas et al., 2003), havent-se descrit el seu efecte antimetastàtic en cèl·lules de càncer de pulmó (Zhang et al, 2005).

Donat el potencial de la PG com a agent quimioteràpic i la no existència d'estudis previs on s'hagi assajat el seu efecte sobre el neuroblastoma, en el treball que presentem a continuació el nostre objectiu principal va ser estudiar la seva citotoxicitat front al neuroblastoma i examinar els seus mecanismes d'acció, emprant per aquest fi diferents línies cel·lulars de neuroblastoma humà.

Resultats

En el treball que presentem a continuació es van utilitzar quatre línies cel·lulars, tres de tipus N, SH-SY5Y, IMR-32 i LAN-1, i una de tipus S anomenada SK-N-AS. A més a més varem estudiar un segon clon de la línia SH-SY5Y, al qual varem anomenar SH-SY5Yhp (*high proliferative*), per diferenciar-se de les SH-SY5Y en la seva major capacitat proliferativa (Figura 39).

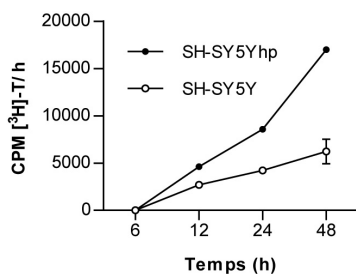


Figura 39. Velocitat de proliferació dels clons SH-SY5Y i SH-SY-5Yhp (*high proliferative*). Anàlisi de la proliferació cel·lular realitzat per assaig d'incorporació de timidina tritiada. Es van sembrar 5×10^3 cèl·lules al temps 0.

La PG disminueix la viabilitat cel·lular en cèl·lules de neuroblastoma humà

Per tal d'avaluar la citotoxicitat de la PG en les línies cel·lulars de neuroblastoma humà es van realitzar assajos de MTT i de comptatge de cèl·lules, emprant en el primer cas la totalitat de les cèl·lules, i en el segon únicament les cèl·lules adherides. La viabilitat de la majoria de línies cel·lulars, a excepció de les SK-N-AS, es va veure reduïda després de 24 hores d'exposició a concentracions de PG inferiors a $3 \mu\text{M}$ (Figura 40A). La línia cel·lular SH-SY-5Yhp va resultar ser la més sensible, obtenint per MTT una IC_{50} a les 24 hores de 150 nM , mentre que la SK-N-AS va ser la més resistent, reduint la seva viabilitat al 50 % només després de 24 hores d'exposició a PG a una concentració de $7 \mu\text{M}$, valors que apropen la sensibilitat d'aquestes cèl·lules a la de cèl·lules no tumorals (Montaner and Perez-Tomas, 2003). La línia SH-SY5Yhp mostra un descens progressiu en els valors de les IC_{50} a mesura que s'incrementa el temps d'exposició de les cèl·lules a la PG, sent aquest descens especialment marcat a les 48 hores. La viabilitat cel·lular es troba dràsticament reduïda en totes les línies cel·lulars després de 48 hores de tractament amb la dosi de PG corresponent a la IC_{50} (24 hores), a excepció de les SK-N-AS (Figura 40B).

La utilització d'assajos com el MTT basats en el tetrazoli, mostren però algunes limitacions en la seva aplicació degut a interferències metabòliques (Vistica et al., 1991), sent molt pràctics per a avaluar la "salut metabòlica" de les cèl·lules, en termes de potencial reductor, però no sempre efectius en l'avaluació de la viabilitat cel·lular. Per tal de verificar els resultats anteriorment descrits, paral·lelament als assajos de viabilitat per MTT es van realitzar comptatges de número de cèl·lules adherides (Figura 40C). Els patrons de corba obtinguts amb els resultats de les dues metodologies van resultar ser molt similars, obtenint-se però valors inferiors amb aquest darrer mètode, indicant que probablement algunes de les cèl·lules que es troben en suspensió encara mantenen la capacitat de reduir el MTT.

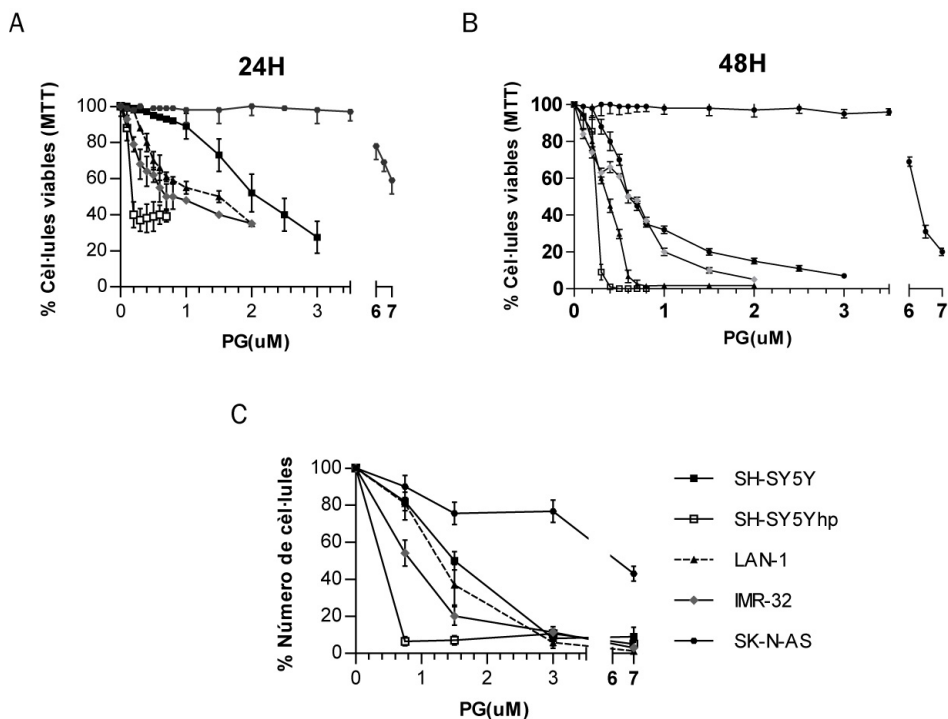


Figura 40. La PG disminueix la viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma. A | Corbes de viabilitat de diferents línies cel·lulars de neuroblastoma mesurades pel mètode de reducció de MTT després de 24 h d'incubació amb diferents concentracions de PG. Els resultats s'han expressat com % en comparació amb els controls no tractats a les 24 h d'incubació. **B** | *Idem* que gràfica anterior a les 48 h d'exposició a PG. **C** | Número de cèl·lules adherides després de 24 h d'incubació amb diferents concentracions de PG. Els resultats estan expressats en % de cèl·lules en comparació amb les no tractades després de 24 h d'incubació. Els resultats són la mitjana \pm S.E.M. de tres experiments.

A més a més, per tal de poder assumir els valors obtinguts per MTT com a lineals respecte el contingut de proteïna i número de cèl·lules, el contingut proteic per cèl·lula es va establir en cèl·lules no tractades, no trobant-se diferències significatives en aquesta relació en cap de les línies cel·lulars després d'haver estat tractades amb PG (Taula 7). Sent aquesta una comprovació més que valida els resultats obtinguts per MTT.

Taula 7

Línia cel·lular	Contingut proteic $\mu\text{g proteïna} \times 10^{-4} / \text{cèl·lula} \pm \text{S.E.M.}$
SH-SY5Yhp	1.0 \pm 0.1
SH-SY5Y	1.8 \pm 0.2
LAN-1	2.2 \pm 0.2
IMR-32	1.8 \pm 0.1
SK-N-AS	2.6 \pm 0.3

Posteriorment l'efecte de la PG va comparar-se amb l'efecte del cisplatí (cis-diaminedichloroplatinum (II)) (CisPt), una droga quimioterapèutica d'ús convencional en el tractament de varis càncers, incloent els neuroblastomes (Kushner and Cheung, 2004; Kushner et al., 2008). A la figura 41A es mostren els valors de la IC₅₀ a les 24 hores per a cadascuna de les línies cel·lulars front a PG i CisPt. Només per a les IMR-32 es van obtenir efectes de similar magnitud amb les dues drogues, les línies SH-SY5Y, LAN-1 i fins i tot les SK-N-AS van resultar ser molt més sensibles a la PG que al CisPt (Figura 41B).

Línia cel·lular	IC ₅₀ Prodigiosina $\mu\text{M} \pm \text{S.E.M.}$	IC ₅₀ Cisplatí $\mu\text{M} \pm \text{S.E.M.}$
SH-SY5Yhp	0.15 \pm 0.01	50 \pm 0.5
SH-SY5Y	1.5 \pm 0.2	50 \pm 0.5
LAN-1	1.5 \pm 0.2	100 \pm 8
IMR-32	0.7 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
SK-N-AS	7.0 \pm 0.5	85 \pm 8

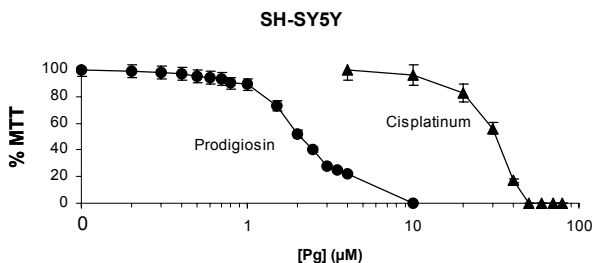


Figura 41. Concentracions corresponents a les IC₅₀ \pm S.E.M per a prodigiosina i cisplatí.
A | Taula on es mostren els valors per a les diferents línies de neuroblastoma determinats per MTT després de 24 h d'incubació amb PG i CisPt. **B** | Com a resultat representatiu es mostra la viabilitat de les cèl·lules SH-SY5Y després de 24 h de tractament amb diferents concentracions dels dos compostos (en escala logarítmica).

En les línies LAN-1 es va realitzar un estudi de viabilitat per MTT a 24 hores combinant les dues drogues (Figura 42A). Els resultats mostren que la combinació indueix un increment significatiu en la pèrdua de viabilitat respecte els resultats obtinguts amb els tractaments amb cadascuna d'elles per separat, fins i tot amb dosis de CisPt i PG per si soles inefectives. Quan el mateix experiment es va realitzar amb la línia SK-N-AS, considerada pràcticament resistent a la PG per obtenir una IC₅₀ molt semblant a la de cèl·lules sanes, no es van observar diferències respecte el tractament exclusivament amb CisPt (Figura 42B).

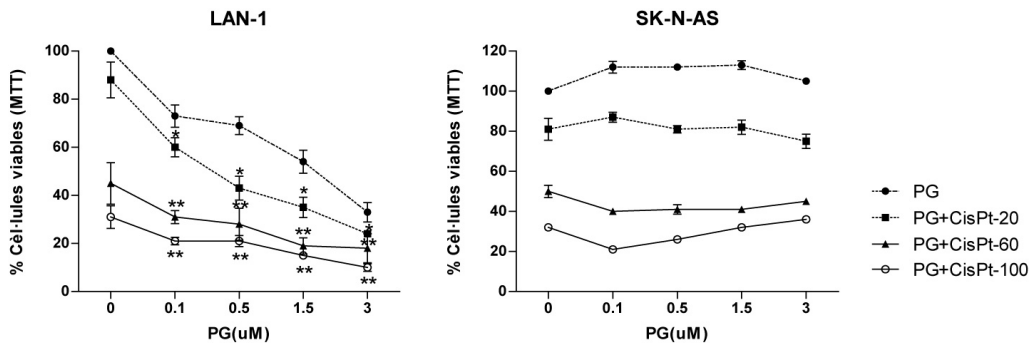


Figura 42. Efecte de la combinació dels agents prodigiosina i cisplatí sobre les cèl·lules de neuroblastoma. Viabilitat cel·lular mesurada per MTT de les cèl·lules LAN-1 i SK-N-AS després del tractament amb diferents concentracions de PG, soles o en combinació amb CisPt 20, 60 o 100 μ M durant 24 h. Els resultats són la mitja \pm S.E.M de tres experiments independents. $P < 0.05$ *, $P < 0.01$ **, en comparació amb les cèl·lules tractades amb PG (Anova + Test Duncan).

Aturada del cycle cel·lular després del tractament amb PG

Estudis previs publicats amb PG i amb d'altres membres de la família de les prodiginines descriuen el seu efecte en la regulació de la proliferació cel·lular (Perez-Tomas et al., 2003). Les prodiginines indueixen aturada del cycle cel·lular, però els processos descrits fins al moment, suggereixen mecanismes d'acció diferents depenent del membre de la família de les prodiginines utilitzat i de la línia cel·lular en que s'ha testat el seu efecte.

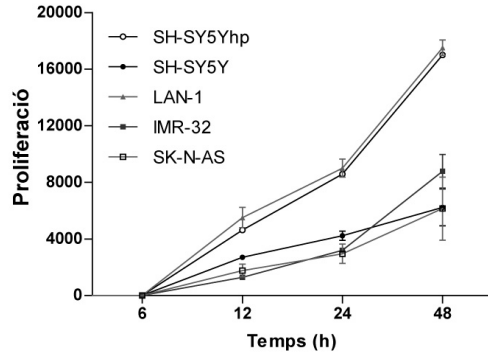
Amb l'objectiu d'avaluar un possible efecte de la PG sobre la proliferació cel·lular en línies tumorals de neuroblastoma humana varem realitzar estudis d'incorporació de timidina tritiada (timidina[H^3]), tenint únicament en compte per aquest fi les cèl·lules que resten adherides

després de l'exposició a l'agent. Inicialment els estudis realitzats van ser només temps-dependents, emprant una única dosi de PG, la IC_{50} 24 hores corresponent a cada línia cel·lular. Els resultats ens van permetre establir el rang de proliferació basal de les línies utilitzades en l'estudi, obtenint valors molt similars en les línies IMR-32, SK-N-AS i SH-SY5Y, i força més elevats en les LAN-1 i en el clon SH-SY5Yhp (Figura 42A). Els valors resultants de la incubació amb PG al llarg del temps, representats com a % d'incorporació de timidina $[H^3]$ respecte les cèl·lules control no tractades per a cada temps i per a cada línia cel·lular, indiquen que els mecanismes de proliferació cel·lular es troben quasi completament bloquejats després de 6 hores de tractament en les SK-N-AS, mentre que per a la resta de línies cel·lulars s'observa un descens progressiu en la incorporació de $[H^3]$ timidina, arribant al 10-20 % respecte les cèl·lules no tractades després de 24 hores (Figura 42B).

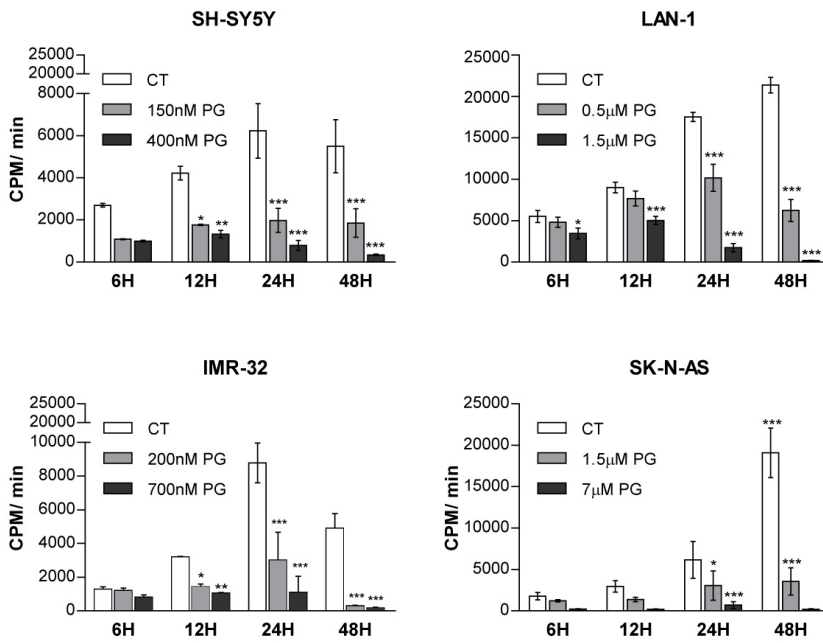
La representació en escala logarítmica dels valors corresponents a l'exposició de les cèl·lules a PG durant 24 hores ens mostra una reducció de la proliferació a menys del 50 % amb concentracions inferiors a 1 μM en totes les línies cel·lulars estudiades excepte en les SK-N-AS, que necessiten una concentració de PG entre 1.5 -3.5 μM per a disminuir el seu rang de proliferació a la meitat (Figura 42C). L'efecte produït per la PG sembla doncs dependre de la dosi aplicada i la línia cel·lular testada.

L'anàlisi dels resultats no mostra una correlació directa entre la pèrdua de viabilitat i la disminució de la incorporació de timidina $[H^3]$: la utilització de dosis baixes de PG en tres de les línies cel·lulars, LAN-1, IMR-32 i SK-N-AS, ens va permetre diferenciar entre mort cel·lular i aturada del cicle cel·lular. La dosi que produeix una disminució de la viabilitat del 25 % en les LAN-1 (0.5 μM) causa a les 24 hores una incorporació de timidina $[H^3]$ del 58 %, la dosi de PG 200 nM en les IMR-32 disminueix la incorporació de timidina $[H^3]$ a un 34.4 %, mentre la concentració de PG 1.5 μM , una dosi que pràcticament no afecta la viabilitat de les SK-N-AS, disminueix la proliferació en aquestes cèl·lules un 50 %. Dades que ens indiquen que la proliferació cel·lular es veu minvada amb concentracions de PG que encara no afecten la viabilitat.

A



B



C

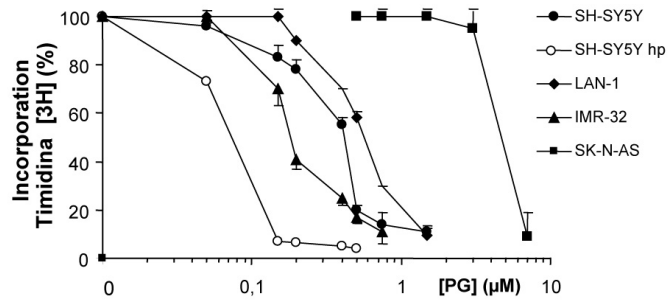
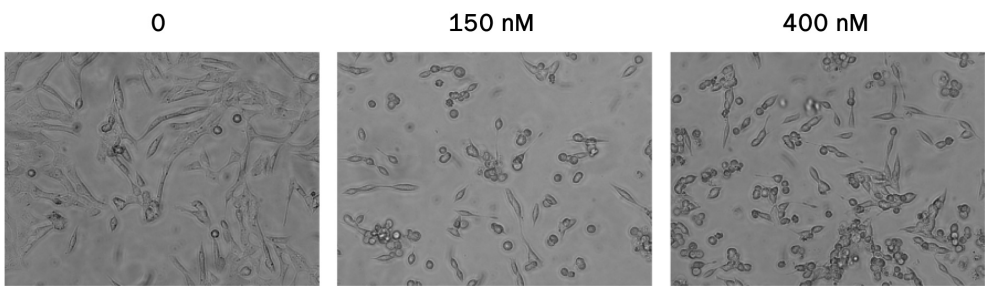


Figura 42. La prodigiosina redueix la velocitat de proliferació de les línies cel·lulars de neuroblastoma. **A** | Anàlisi de la proliferació cel·lular de diferents línies cel·lulars de neuroblastoma al llarg del temps, mesurat pel mètode d'incorporació de timidina[H3]. **B** | Estudi de la incorporació de timidina[H3] al llarg del temps utilitzant dues concentracions de PG per línia cel·lular, una d'elles corresponent a la IC₅₀. Els valors s'expressen com a % d'incorporació de timidina[H3] respecte les cèl·lules control no tractades per a cada temps i línia cel·lular. **C** | Representació conjunta del % d'incorporació de [H3]timidina, respecte les cèl·lules control no tractades per a cada temps i línia cel·lular, després d'haver estat incubades durant 24 h amb diferents concentracions de PG, indicades en escala logarítmica. En tots els casos (A, B i C) es van sembrar 5×10^3 cèl·lules per condició i línia cel·lular al temps 0. Els resultats són la mitja \pm S.E.M de tres experiments independents. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (2WayAnova + Posttest Bonferroni).

L'observació morfològica de les cèl·lules ens indica que les els dos clons SH-SY5Y i les LAN-1 mostren cert grau de diferenciació després de 12 hores d'incubació amb les dosis corresponents a les seves IC₅₀, mostrant ambdues estructures similars a neurites (Figura 43A). A les 24 hores aquest efecte només és evident en les LAN-1, ja que la diferenciació observada en els clons SH-SY5Y sembla disminuir al augmentar la concentració de PG o el temps d'exposició a l'agent (Figura 35A). En la resta de línies cel·lulars aquest efecte és menys evident: en ordre LAN-1 > clons SH-SY5Y >IMR-32 >SK-N-AS. Totes les línies cel·lulars de neuroblastoma, a excepció de les SK-N-AS, al ser incubades amb concentracions de PG corresponents a les seves respectives IC₅₀ durant 24 hores mostren un percentatge elevat de cèl·lules en suspensió amb morfologia arrodonida i mida reduïda, característiques de cèl·lules no viables (Figura 43B).

A

SH-SY5Yhp



B

CT

PG

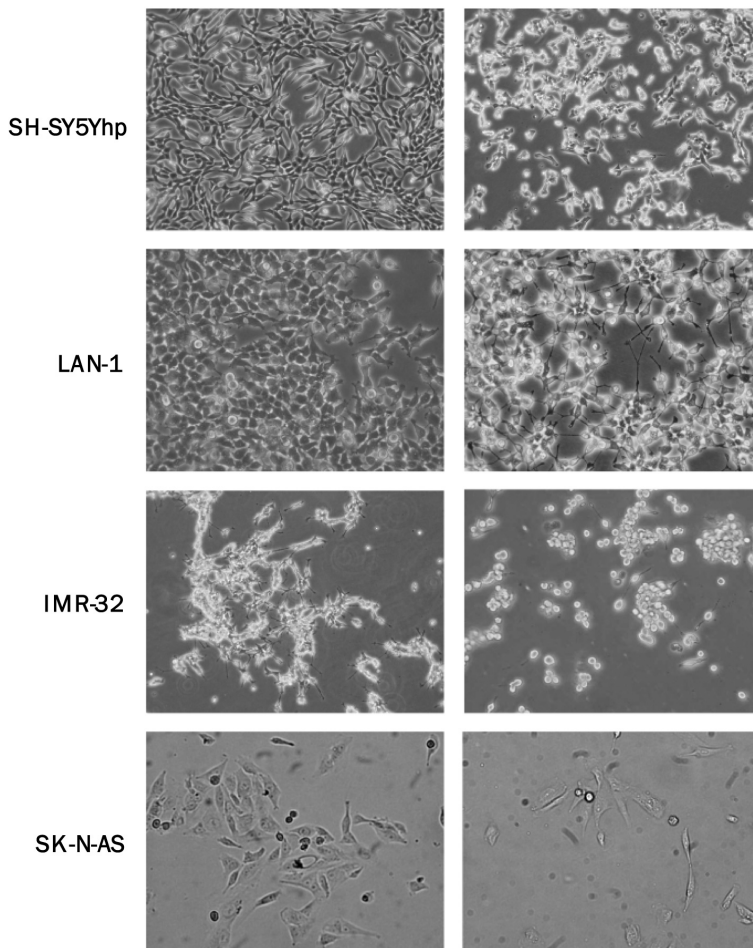


Figura 43. La prodigiosina indueix canvis morfològics en les cèl·lules de neuroblastoma humà. A | En les cèl·lules SH-SY5Yhp el temps i la concentració de PG determinen els canvis morfològics. L'exposició d'aquestes cèl·lules a la dosi 150 nM durant 12 h indueix l'aparició d'estructures semblants a neurites com les observades en les cèl·lules LAN-1. L'increment del temps d'incubació o de la concentració de l'agent disminueixen la viabilitat cel·lular, observant-se en aquestes casos cèl·lules majoritàriament arrodonides i petites. **B** | Quatre línies cel·lulars de neuroblastoma van ser incubades durant 24 h amb PG 0.5 µM. En les cèl·lules LAN-1 s'observa l'aparició d'estructures semblants a neurites. Les cèl·lules SH-SY5Yhp i IMR-32 a aquest temps, i amb aquesta concentració, no mostren canvis indicatius de diferenciació cel·lular, però sí l'arrodoniment característic de les cèl·lules no viables.

En la mort cel·lular induïda per PG s'activen marcadors apoptòtics

A continuació, tenint en compte els resultats anteriors, es va analitzar el procés de mort induït per PG i la seva relació amb la proliferació cel·lular. Estudis prèviament publicats descriuen la inducció d'apoptosi per PG en varies línies cel·lulars canceroses (Campas et al., 2003; Diaz-Ruiz et al., 2001; Montaner et al., 2000; Montaner and Perez-Tomas, 2001) .

Un dels paràmetres morfològics més clàssics en l'estudi de l'apoptosi és l'aparició de condensació nuclear i la formació de cossos apoptòtics. La tinció nuclear amb Hoescht 33342 realitzada després de l'exposició de les cèl·lules a la seva corresponent IC₅₀, únicament va revelar la presència de nuclis condensats i fragmentats en les SH-SY5Yhp (Figura 44A), resultat que va ésser confirmat mitjançant la visualització dels fragments internucleosomals de l'ADN per electroforesi (Figura 44B).

Per tal de discernir si la mort cel·lular és depenent o independent de caspases, varem emprar el inhibidor general de caspases z-VAD.fmk en assajos de viabilitat per MTT en les SH-SY5Yhp. Els resultats van indicar una protecció parcial però important, reduint la pèrdua de viabilitat a un 20-25 % respecte el 75 % obtingut amb les dosis més elevades de PG a les 24 hores de tractament (Figura 45A). En totes les línies testades el z-VAD.fmk va protegir parcialment l'efecte de la PG a les 24 hores, però no a les 48 hores (Figura 45B).

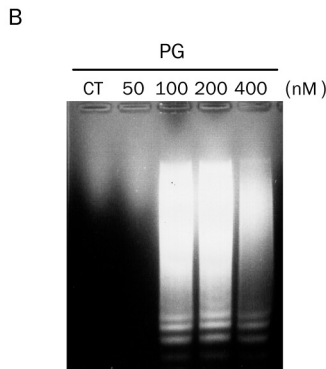
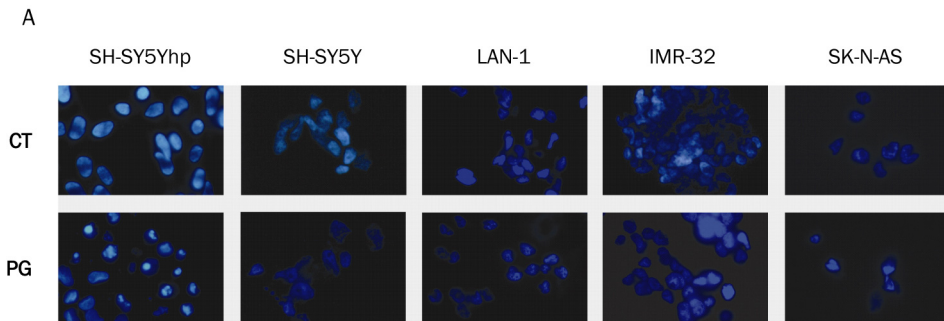


Figura 44. Aparició de marcadors apoptòtics després del tractament amb prodigiosina. **A** | El marcatge fluorescent Hoescht 33342 en cèl·lules de neuroblastoma revela l'aparició de cossos apoptòtics únicament en les cèl·lules SH-SY-5Yhp després del tractament amb la corresponent IC₅₀ per PG durant 24 h. **B** | Escala de degradació de l'ADN de les cèl·lules SH-SY5Yhp en les mateixes condicions esmentades en l'apartat (A).

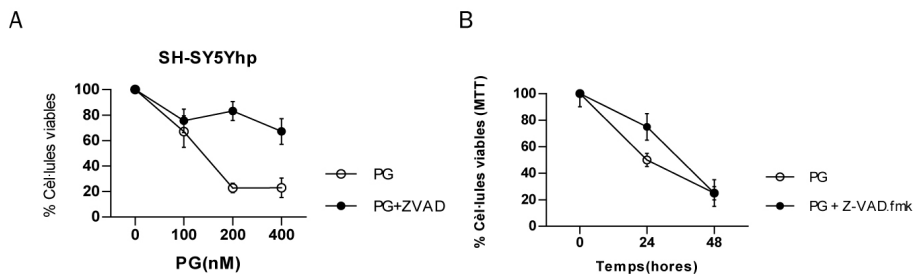


Figura 45. El inhibidor general de caspases z-VAD.fmk reverteix parcialment la mort cel·lular induïda per prodigiosina. **A** | Anàlisi comparatiu de la viabilitat cel·lular mesurada per MTT en les cèl·lules SH-SY5Yhp front a PG i PG + z-VAD.fmk., després de 24 h de incubació. **B** | Efecte del z-VAD.fmk en la viabilitat de diferents línies cel·lulars de neuroblastoma després del tractament amb PG durant 24 h. En ambdós casos les concentracions de PG emprades corresponen a la IC₅₀. Els resultats són la mitja ± S.E.M de tres experiments independents. *P<0.05, **P<0.01 i ***P<0.001 en comparació amb les cèl·lules no tractades únicament amb PG (t-Student).

La possible implicació de caspases en la mort cel·lular induïda per PG va estudiar-se amb més profunditat en les SH-SY5Yhp. Les cèl·lules van ser exposades a 50, 100, 200 i 400 nM de PG durant 6, 12 i 24 hores (concentracions que corresponen a una disminució de la viabilitat cel·lular del 5, 30, 65 i 75 % respectivament) i es va avaluar l'expressió de les proteïnes d'interès (Figura 46). Els nivells de la forma inactiva, o procaspasa, de la caspasa iniciadora 2 i l'efectora 7 decreixen ja a les 12 hores d'exposició a la droga a partir de la dosi 100 nM, i a partir de la 50 nM a les 24 hores. La caspasa 9, iniciadora de la via mitocondrial, no és activa fins a les 24 hores amb la dosi 100 nM, mentre que la caspasa 3 s'activa a partir de les 12 hores d'exposició a la mateixa dosi de PG. La poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), substrat de les caspases, comença a mostrar acumulació del seu producte fragmentat a partir de la dosi de PG corresponent a la IC₃₀ a partir de les 12 hores, sent aquest especialment marcat a les 24 hores.

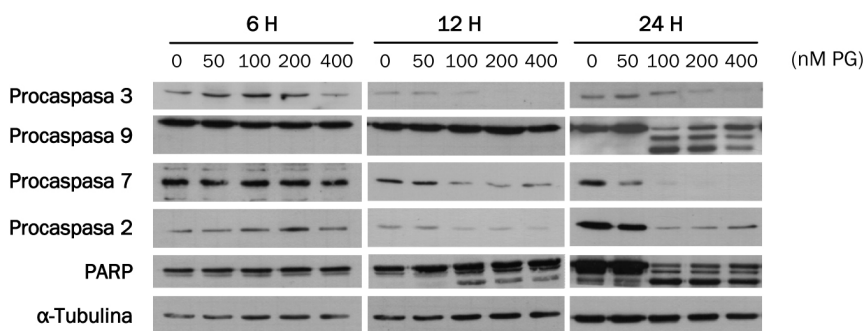


Figura 46. Prodigiosina indueix l'activació de caspases i PARP en la línia cel·lular SH-SY5Yhp. Anàlisi per *Western-Blot* al llarg del temps de l'activació de caspases i proteòlisi de PARP després de la incubació de les cèl·lules amb diferents concentracions de PG.

Per tal d'aprofundir una mica més en els esdeveniments claus de la apoptosi varem analitzar l'alliberament de factors apoptòtics del mitocondri al citoplasma. 3 hores d'incubació amb PG van resultar ser suficients per a induir la sortida de citocrom c i de Smac/DIABLO del mitocondri (Figura 47). L'acumulació d'aquests factors apoptòtics a la fracció citoplasmàtica s'inicia en aquest temps a la dosi 100 nM en el cas de Smac/DIABLO, i en 400 nM el citocrom c, en ambdós casos la sortida d'aquest factors apoptòtics es manté a les 24 hores. Pel que respecte al factor inductor d'apoptosi (AIF), el seu alliberament únicament l'observem a les 24 hores d'exposició a PG.

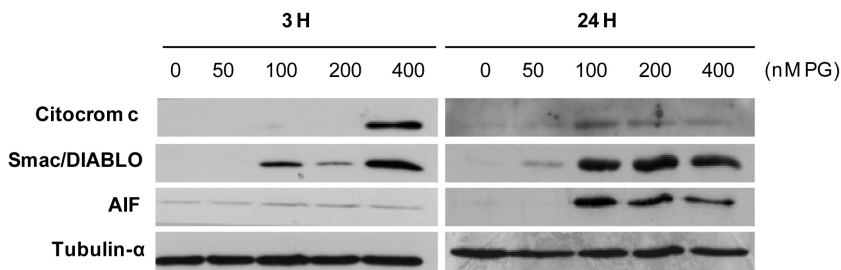


Figura 47. El tractament amb prodigiosina condueix a l'alliberament de factors mitocondrials apoptòtics. Anàlisi per *Western-Blot* al llarg del temps de la sortida de factors apoptòtics després de la incubació de les cèl·lules SH-SY5Yhp amb diferents concentracions de PG.

Per últim, degut a que la caspasa 2 sembla ser necessària per al desencadenament de l'apoptosi induïda per estrès reticular (Kitevska et al., 2009; Krumschnabel et al., 2009a; Krumschnabel et al., 2009b) varem voler analitzar l'expressió de la proteïna Grp78 (*glucose regulated protein 78*) en resposta a PG. Grp78 és una proteïna clau en els processos que tenen lloc en el reticle endoplasmàtic i un dels reguladors rellevants de l'estrès reticular (Banhegyi et al., 2007; Li and Lee, 2006). Tal i com es mostra en la figura 48, PG induïx un augment de l'expressió de Grp78 a les 12 hores de tractament a partir de la dosi de PG 100 nM, coincidint amb la disminució del zimogen de la caspasa 2.

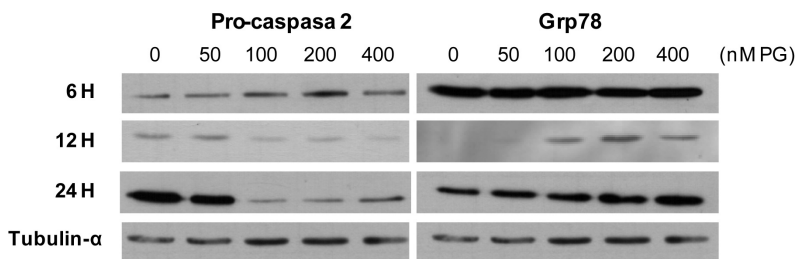


Figura 48. Prodigiosina induïx un augment de l'expressió de Grp78. Els lisats cel·lulars de les cèl·lules SH-SY5Yhp mostren la disminució de la proforma de la caspasa 2 i l'augment de l'expressió de la proteïna Grp78.

Aquests resultats indiquen que l'activació de les caspases és posterior a l'alliberament dels factors mitocondrials, suggerint que l'apoptosi mediada per PG, en les SH-SY5Yhp, té lloc utilitzant principalment el mitocondri per a la transducció del senyal inductor de mort, però que paral·lelament altres processos s'estan desencadenant tal i com indica l'activació de les caspases 2, 7 i 3, i la proteòlisi de PARP prèviament a l'activació de la caspasa 9, involucrada directament en la via mitocondrial. De fet, l'anàlisi de la proteïna Grp78, junt amb el de la caspasa 2, suggereixen la implicació de l'estrès reticular en el procés de mort desencadenat per PG.

Activació tardana de la via apoptòtica extrínseca en la mort induïda per PG

Els resultats obtinguts prèviament ens van fer plantejar la possible participació de la via apoptòtica per receptors de mort en el procés desencadenat per PG.

L'expressió i el paper de la caspasa 8 en el neuroblastoma són controvertits, no observant-se la seva expressió en algunes línies cel·lulars i extractes de tumors de pacients, existint inclús discrepàncies en la bibliografia respecte l'expressió de la caspasa 8 en algunes de les línies cel·lulars estudiades (Fulda et al., 2006; Hopkins-Donaldson et al., 2000; Kisenge et al., 2003; Poulaki et al., 2001; Ribas et al., 2005). No obstant, experiments preliminars realitzats en el nostre grup on s'estudiava la resposta de les diferents caspases en les SH-SY5Yhp, ens van permetre detectar la seva activitat en aquesta línia cel·lular. Varem decidir per aquest motiu profunditzar en l'estudi d'aquesta caspasa, per tal de determinar si la via extrínseca podria estar implicada en els mecanismes desencadenats per PG.

L'anàlisi de l'expressió de proteïna per *Western-Blot* dels extractes obtinguts d'experiments temps i dosi dependents en les cèl·lules SH-SY5Yhp, va mostrar una disminució de la proforma de la caspasa 8 a partir de la dosi de PG 100 nM a les 24 hores de tractament (Figura 49A). No obstant, el pes molecular de la proforma observada va resultar ser inferior a l'esperat, tal i com es mostra en el *Western-Blot* realitzat a les 24 hores on s'inclou com a control positiu un extracte de cèl·lules Jurkat (JK) que expressen la proteïna caspasa 8 normal. L'assaig preliminar de l'activitat IETD-asa mostra un augment dosi dependent de l'activitat, arribant a triplicar-se a la dosi de 400 nM respecte al control no tractat (Figura 49B).

Per últim, varem voler avaluar la importància d'aquesta activitat caspasa 8 en la mort induïda per PG, i per a fer-ho varem realitzar un estudi de viabilitat cel·lular per MTT utilitzant l'inhibidor específic de caspasa 8 IETD.fmk. Els resultats obtinguts semblen indicar que la coïncubació de

les cèl·lules amb PG i l'inhibidor no disminueix l'efecte de la PG, suggerint un paper irrellevant d'aquesta via en el procés de mort desencadenat per la nostra droga en les cèl·lules SH-SY5Yhp (Figura 49C).

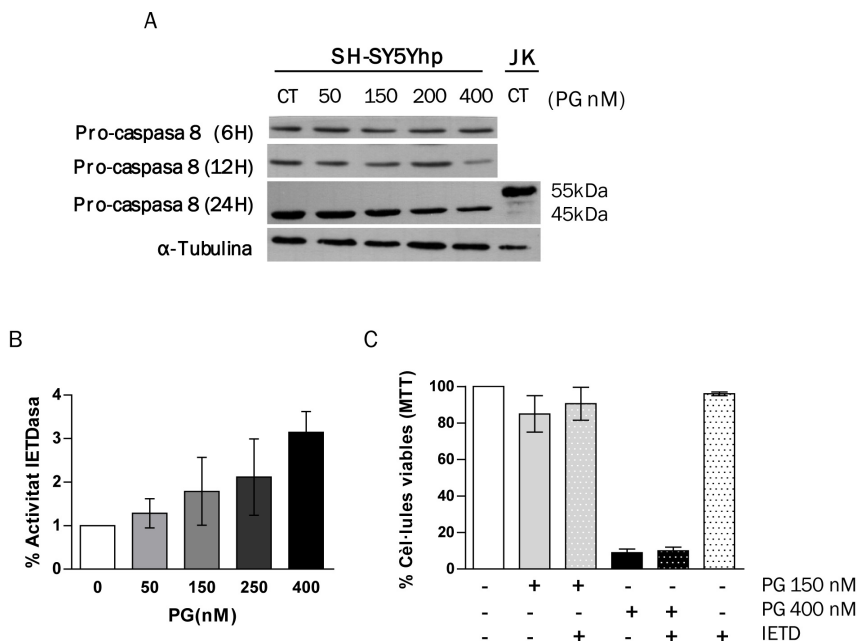


Figura 49. La prodigiosina actua tardanament sobre la via extrínseca de mort cel·lular.
A | Western-blot on es mostra l'efecte de diferents concentracions de PG en la reducció de la proforma de la caspasa 8 en cèl·lules SH-SY5Yhp, així com el seu pes en comparació amb la forma normal de caspasa 8 present en les cèl·lules Jurkat. **B** | Assaig d'activitat IETDasa en cèl·lules SH-SY5Yhp després de 24 h d'incubació amb diferents concentracions de PG. **C** | Efecte de l'inhibidor de la caspasa 8 IETD.fmk en la disminució de la viabilitat induïda per PG en les cèl·lules SH-SY5Yhp (mesures obtingudes per MTT). Els resultats són la mitja ± S.E.M de tres experiments independents.

PG inhibeix l'activació de NF-κB

L'activació de la caspasa 8 pot ser un efecte posterior a l'activació d'altres caspases o pot estar lligat a receptors de mort mitjançant algun factor extracel·lular. Les cèl·lules SH-SY5Yhp produeixen la citoquina proinflamatoria TNF-α (factor de necrosis tumoral-alfa) com a resposta a situacions d'estrès cel·lular (Gomez-Santos et al., 2007), de manera que es va analitzar aquest efecte com a resposta a la PG. L'administració de PG 150 nM durant 2, 6 i 12 hores va

augmentar progressivament la forma soluble de TNF- α , la qual va ésser determinada per ELISA (Figura 50A). A la vegada per *Western-Blot* varem observar un increment de la presència del receptor TNFR1 (Figura 50B).

Aquesta podria ser l'explicació de l'activació de la caspasa 8, tot i no produir dita activació una repercussió a nivell de viabilitat cel·lular. No obstant, TNFR1 també està vinculat a mecanismes de supervivència mitjançant l'activació del factor nuclear kappa B (NF- κ B). El mateix TNF- α indueix NF- κ B, havent-se demostrat a la vegada que la supressió de NF- κ B potencia la citotoxicitat de TNF- α (Beg and Baltimore, 1996; Guicciardi and Gores, 2009; Kitahara et al., 2000; Van Antwerp et al., 1996). NF- κ B és un factor de transcripció d'expressió ubiqua que regula l'expressió de múltiples gens importants en la supervivència cel·lular i en la resposta de l'hoste a infecció o dany, però involucrat també en la patogènesis de varies malalties, entre elles el càncer: el sistema NF- κ B es troba freqüentment implicat en la tumorigènesi degut als seus efectes antiapoptòtics i a la seva capacitat de promoure l'emancipació de les cèl·lules canceroses de senyals extrínseques de creixement (Inoue et al., 2007; Van Waes, 2007).

L'estudi per EMSA d'aquest factor de transcripció va revelar que NF- κ B estava constitutivament actiu en les cèl·lules de neuroblastoma SH-SY5Yhp, produint-se una marcada disminució de la seva interacció amb l'ADN després de l'exposició a PG 150 nM en els tres temps estudiats (Figura 50C), resultats consistents amb la disminució de la proliferació i la pèrdua de la viabilitat.

Tenint en compte aquests resultats, varem analitzar per MTT la viabilitat resultant del tractament simultani de PG i TNF- α , utilitzant amb aquesta finalitat les dosis de PG 50, 150 i 400 nM, i de TNF- α 50 i 100 nM (Shunghoon et al., 2004). Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives en l'afectació de la viabilitat de les SH-SY5Yhp després d'haver estat exposades a PG en presència, o en absència, de TNF- α (Figura 50D).

Les dades obtingudes no semblen doncs indicar que els increments de TNF- α i TNFR1 tinguin un paper rellevant en la supervivència i la mort de les cèl·lules de neuroblastoma tractades amb PG.

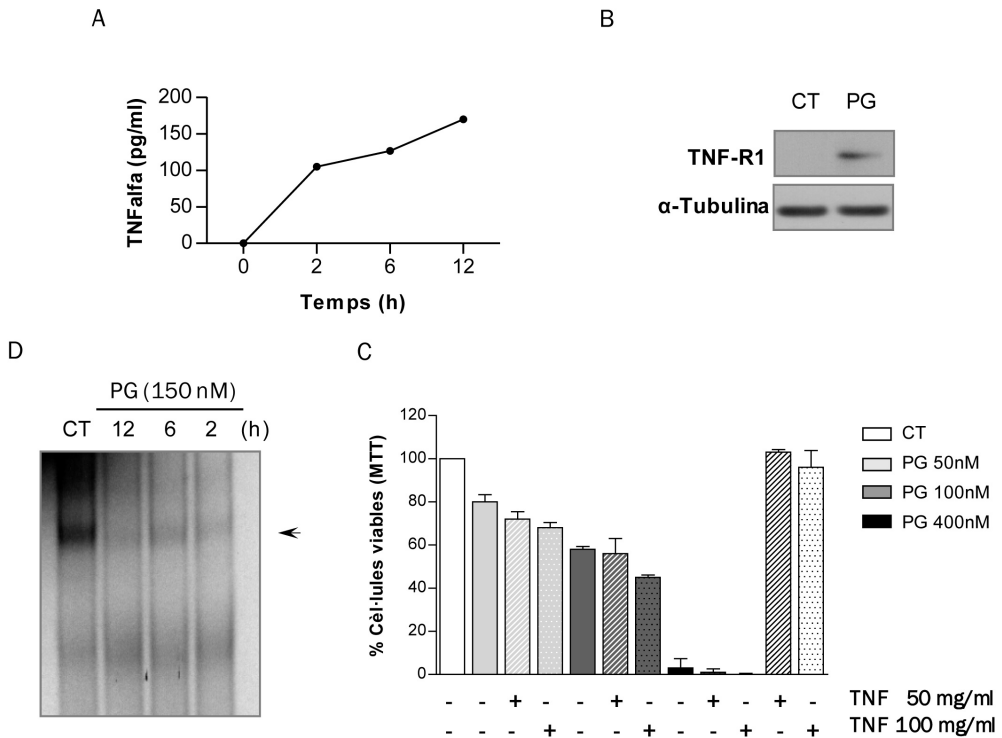


Figura 50. En les cèl·lules SH-SY5Yhp TNF- α i NF- κ B es modulen amb el tractament amb prodigiosina. A Assaig Elisa on es mostra l'augment al llarg del temps induït per PG (150nM) de la forma soluble de TNF- α . **B** Western-Blot on s'observa l'increment de TNFR1 a les 12 h de tractament amb PG 150 nM. **C** Anàlisi de la viabilitat cel·lular per MTT de la combinació de diferents concentracions de PG amb TNF 50 i 100 mg/ml. Els valors s'expressen en % respecte les cèl·lules no tractades a les 24 h d'incubació. Els resultats són la mitja \pm S.E.M de tres mesures independents. El CT es mostra en color blanc, en gris clar PG 50nM, en gris fosc 100nM i en negre 400nM. **D** EMSA on s'observa una disminució del factor nuclear NF- κ B després del tractament amb PG 150 nM a diferents temps, en comparació amb el control (CT) a les 12 h.

Distribució intracel·lular de la PG

La PG és un compost vermell fluorescent que en la seva forma no ionitzada és liposoluble, propietat que li permet difondre a través de les membranes plasmàtiques, podent observar-se la seva distribució un cop penetra en la cèl·lula per microscopia de fluorescència. Una primera visualització del compost en la cèl·lula ens va mostrar una localització citoplasmàtica caracteritzada per la presència de cúmuls de major intensitat de fluorescència. La distribució i mida d'aquests cúmuls ens va fer pensar en la possibilitat que la PG pogués estar quedant retinguda en orgànuls intracel·lulars. En totes les condicions estudiades el nucli cel·lular es va mantenir preservat de l'entrada de PG (Figures 51).

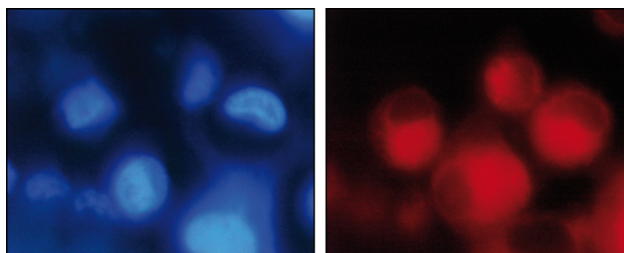


Figura 51. Visualització de la prodigiosina en l'interior de la cèl·lula. Imatge de microscopia de fluorescència de les cèl·lules SH-SY5Y després de 24 h d'incubació amb PG 400 nM. En la imatge de l'esquerra es mostren en blau els nuclis marcats amb el marcador fluorescent Hoescht 33342. A la dreta la mateixa imatge analitzada amb un filtre que ens permet visualitzar la fluorescència vermella emesa per PG.

PG indueix acidificació citoplasmàtica

La basificació dels compartiments intracel·lulars podria estar jugant un paper important en la l'efecte desencadenat per la PG (Castillo-Avila et al., 2005). La PG és lleugerament bàsica, degut a la presència d'un àcid pirrolènic en la seva estructura (el pka de la base lliure en aigua/acetonitril és de 7.2) (Rizzo et al., 1999), essent possible la seva protonació en els compartiments acídics de la cèl·lula, amb la consegüent afectació del pH citoplasmàtic. El pH àcid dels orgànuls s'ha descrit com a possible responsable d'una ampla varietat de funcions cel·lulars, com l'endocitosi, l'exocitosi i el trànsit intracel·lular, així com de la diferenciació, el creixement i la mort cel·lular (Ohkuma et al., 1998).

L'efecte de la PG sobre el pH dels lisosomes es va avaluar mitjançant la tinció vital amb taronja d'acridina (TA). Aquest compost es protona i s'acumula en compartiments àcids com els lisosomes. Una elevada concentració de TA en aquests compartiments resulta en l'emissió de fluorescència taronja, mentre que a concentracions més baixes, en un pH neutre o bàsic, el TA no protonat adquireix un coloració verda (Canonico and Bird, 1969). En totes les línies cel·lulars de neuroblastoma estudiades després de la tinció amb TA es va observar fluorescència verda en el nucli i en el citoplasma, i fluorescència taronja amb distribució granular en el citoplasma, indicant la localització dels compartiments intracel·lulars acídics. El tractament amb PG van fer desaparèixer completament la coloració ataronjada en totes les cèl·lules després de 6 hores d'exposició a la dosi 1.5 μ M (dosi tòxica per a totes les línies cel·lulars excepte per a les SK-N-AS) o amb la dosi corresponent a la IC₅₀, suggerint que la PG indueix la neutralització del pH lisosomal (Figura 52).

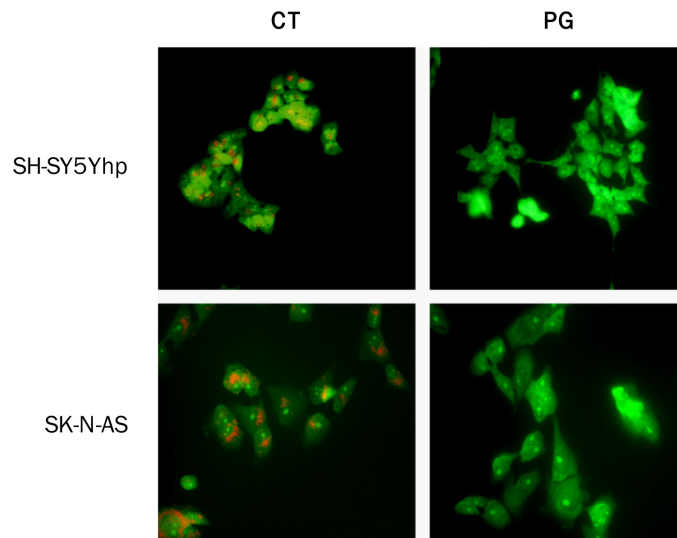
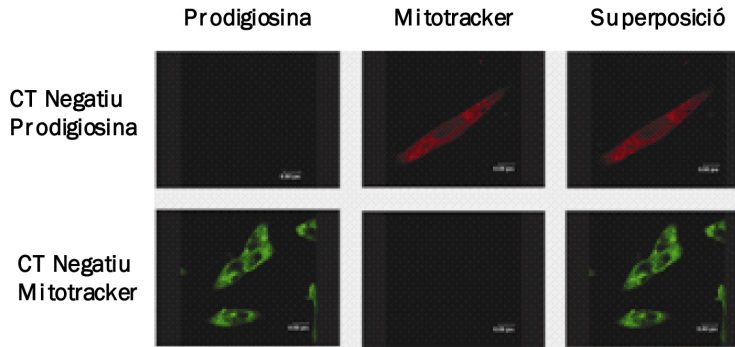


Figura 52. El pH lisosomal disminueix després del tractament amb prodigiosina. Imatges de microscopia de fluorescència. El pH intracel·lular s'ha detectat amb taronja d'acridina. A les 6 h de tractament amb la dosi 1.5 μ M de PG desapareix la fluorescència ataronjada. Es mostren les línies cel·lulars SH-SY5Yhp i SK-N-AS com a representatives.

Acumulació mitocondrial de PG en cèl·lules de neuroblastoma humà

Per abordar la possible localització intramitocondrial de PG varem emprar el marcador mitocondrial MitoTracker® Deep Red, havent comprovat prèviament que no existien interferències entre les longituds d'ona (λ) d'emissió dels dos compostos (Figura 53A) (el perfil de l'espectre d'emissió de PG es mostra en l'apartat de marcatge mitocondrial de Material i Mètodes). Les SH-SY5Yhp van ser tractades amb 150 i 400 nM de PG, IC_{50} i IC_{75} respectivament, durant 6 i 12 hores abans de ser fixades i incubades durant 30 minuts amb 250 mM de MitoTracker®. Els resultats obtinguts ens mostren un clar solapament dels dos marcatges en totes les condicions estudiades, indicant que la PG s'acumula en els mitocondris d'aquestes cèl·lules a temps molt primerencs (Figura 53B). A més a més resulta evident a l'observar aquestes imatges la diferenciació morfològica de les cèl·lules exposades durant 12 hores a PG 150 nM, resultat que corrobora aquells observats en apartats anteriors .

A



B

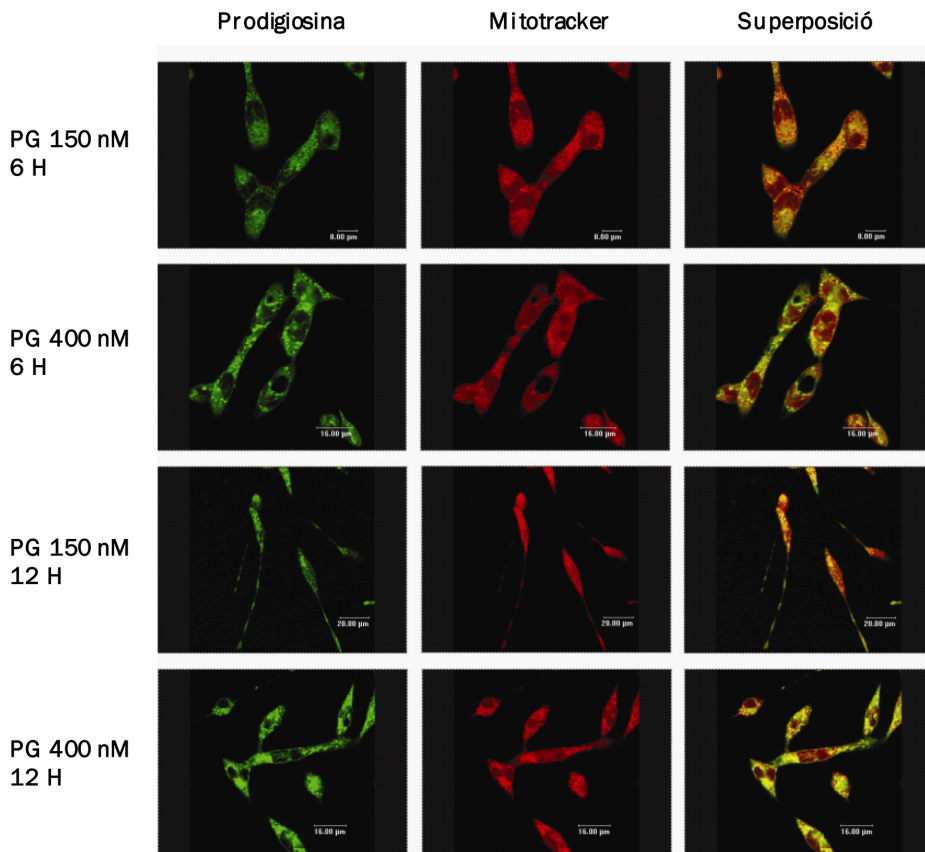


Figura 53. La prodigiosina s'acumula en els mitocondris de les cèl·lules SH-SY5Yhp.
A | Controls on s'evidencia el no solapament de les λ d'emissió dels dos compostos analitzats en l'estudi. **B** | Anàlisi per microscopia confocal de l'efecte de P a 150 i 400 nM, durant 6 i 12h. La fluorescència de la PG es mostra en verd ($\lambda_{em}=543$ nm), i la del Mitotracker en vermell ($\lambda_{em}=633$ nm). La co-localització es veu en color groc.

Per tal de discernir si aquest comportament era exclusiu de les SH-SY5Yhp o comú entre les línies cel·lulars de neuroblastoma humà utilitzades en aquest estudi, es va realitzar el mateix experiment amb les cèl·lules LAN-1, SK-N-AS i el clon SH-SY5Y. Les cèl·lules van ser incubades durant 3 hores amb PG 1.5 μM (la mateixa dosi emprada en l'assaig amb TA). Tal i com s'observa en la Figura 54, la PG també mostra un marcatge preferentment mitocondrial en les línies LAN-1 i SH-SY5Y. No obstant, en les SK-N-AS, tot i observar-se un elevat grau de superposició entre els dos marcatges, resten cúmuls de PG que no col·localitzen amb el marcatge del MitoTracker®.

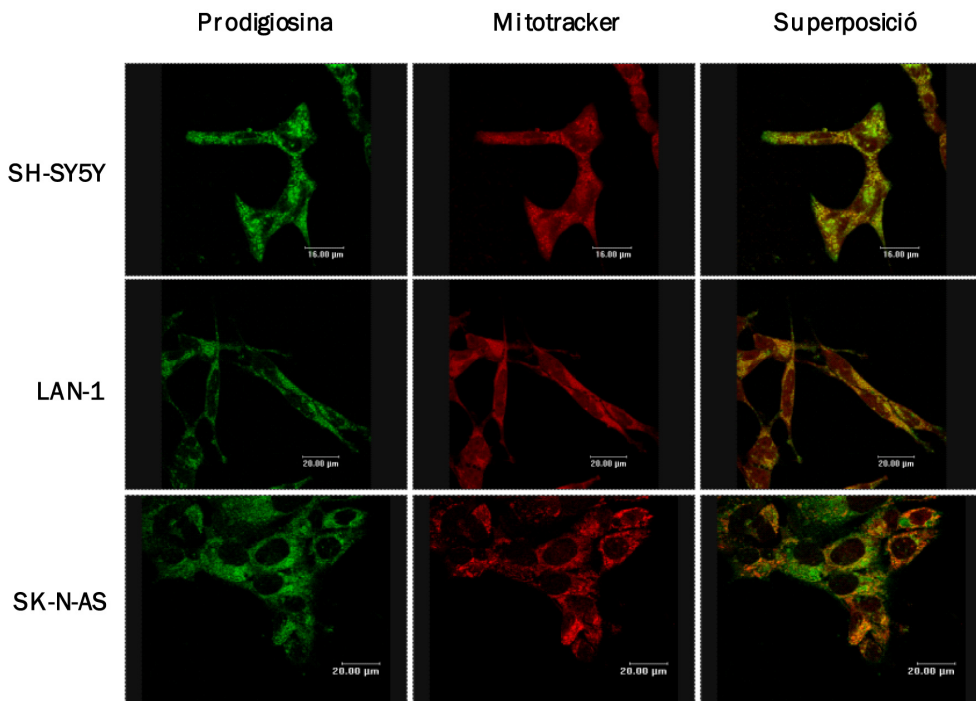


Figura 54. Localització mitocondrial de la prodigiosina en diferents línies cel·lulars de neuroblastoma. Les cèl·lules SH-SY5Y, LAN-1 i SK-N-AS es van incubar durant 3 h amb PG 1.5 μM . Únicament en la línia SK-N-AS s'observa la presència de cúmuls de PG citoplasmàtics que no es superposen al marcatge mitocondrial.

La PG produeix afectació de la cadena respiratòria en cèl·lules de neuroblastoma

Globalment, el conjunt de dades obtingudes, ens suggerien l'afectació mitocondrial com a eix principal dels efectes desencadenats per PG en el nostre model cel·lular. Per tal d'avaluar si la presència de PG en el mitocondri estava afectant la capacitat funcional d'aquests orgànuls es va procedir a l'anàlisi del consum d'oxigen per respirometria d'alta resolució. Aquesta tècnica consisteix en mesurar el consum d'oxigen en una suspensió cel·lular (o de mitocondris) a temps real, en presència de diferents substrats i/o drogues, tal i com es descriu a l'apartat Material i Mètodes. Per a cada experiment es va emprar una suspensió de 10^6 cèl·lules/ml en un volum final de 2 ml de medi.

L'anàlisi de la respiració basal, rutina, va revelar un consum d'oxigen superior per a la línia cel·lular SH-SY5Yhp (30 ± 1 pmolsO₂/seg./mL) respecte les línies cel·lulars IMR-32, LAN-1 i SK-N-AS, totes tres amb una rutina molt semblant (18 ± 0.5 , 18 ± 0.7 i 14 ± 1 pmolsO₂/seg./ml, respectivament) (Figura 55). Valors tots ells que es poden considerar baixos, indicant un metabolisme aeròbic reduït en aquestes cèl·lules. El tractament amb PG $1.5 \mu\text{M}$ va augmentar immediatament el consum d'oxigen en les cèl·lules LAN-1 i IMR-32, consum que no va veure afectat però en les línies SH-SY5Yhp i SK-N-AS.

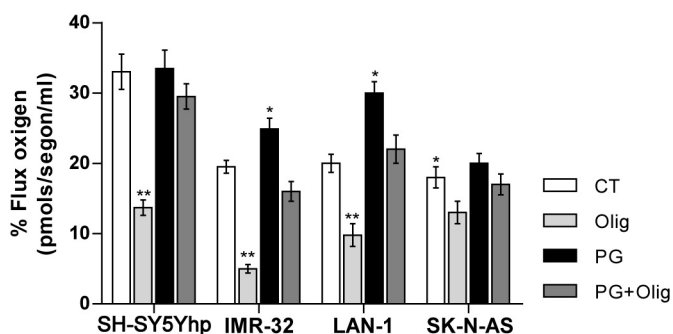


Figura 55. El tractament amb prodigiosina augmenta la respiració basal d'algunes línies cel·lulars de neuroblastoma. La gràfica mostra el flux d'oxigen en el medi de cultiu mesurat per respirometria (expressat com pmol d'oxigen per segon i mL de medi), en cèl·lules no tractades i després de 2 h de tractament amb PG $1.5 \mu\text{M}$.

La concentració inicial d'oxigen era de $200 \mu\text{M}$, i al voltant de $175 \mu\text{M}$ al finalitzar l'experiment. El flux d'oxigen en les cèl·lules control era de: 30 ± 1 (SH-SY-5Yhp), 18 ± 0.5 (IMR-32), 18 ± 0.7 (LAN-1) i 14 ± 1 (SK-N-AS) pmolsO₂/seg./ml, contenint un ml 10^6 cèl·lules. Els resultats són la mitja \pm S.E.M. de 10 lectures durant un temps 10 minuts. *P<0.05, **P<0.01, en comparació amb el control corresponent (Anova + Duncan Test).

La respiració en presència d'oligomicina (Olig) (inhibidor de l'ATP sintasa) ens va permetre obtenir la mesura de la respiració desacoblada. El consum d'oxigen en les cèl·lules no tractades amb PG, va disminuir entre un 50 i un 80 % en les cèl·lules LAN-1, SH-SY5Yhp i IMR-32 després de l'addició de 1 µg/ml d'oligomicina, i només un 30% en les SK-N-AS. No obstant, l'inhibidor de l'ATP sintasa no va mostrar cap efecte sobre el consum d'oxigen en les cèl·lules tractades amb PG.

Els resultats obtinguts semblen indicar que la acumulació mitocondrial de PG podria estar produint una disfunció mitocondrial en la cèl·lula, havent-se obtingut resultats compatibles amb un efecte desacoblador de la PG sobre el flux d'electrons en la cadena respiratòria, tal i com es va confirmar posteriorment en les determinacions d'ATP.

PG inhibeix la síntesi d'ATP

Els resultats exposats prèviament ens van fer plantejar la possible afectació de la síntesi d'ATP. El contingut d'ATP es va mesurar en extractes cel·lulars de cultius cel·lulars control i de cultius tractats durant 3 o 24 hores amb PG 1.5 µM mitjançant la utilització d'un *kit* d'assaig d'ATP. El contingut basal d'ATP obtingut en les quatre línies cel·lulars estudiades va ser aproximadament de 1 nmol/ 10⁶ cèl·lules (aproximadament 1 mM considerant que per 1 µg de proteïna calen unes 6.500 cèl·lules). L'exposició de les cèl·lules a PG durant 3 hores va ser suficient per disminuir entre un 20 i 40 % la concentració d'ATP respecte al corresponent control, en tres de les quatre línies cel·lulars estudiades, SH-SY5Yhp, LAN-1 i SK-N-AS, i únicament un 5% en el cas de les IMR-32 (Figures 56A i B). A les 24 hores de tractament les concentracions d'ATP es redueixen significativament, entre un 60% i un 80%, en les línies SH-SY5Yhp, LAN-1 i IMR-32. En les SK-N-AS el contingut d'ATP de les cèl·lules es manté molt similar entre les 3 i les 24 hores, no arribant a disminuir més d'un 30% respecte el control.

L'anàlisi conjunt dels resultats obtinguts en aquests dos darrers apartats, l'augment de consum d'oxigen junt amb la disminució en el contingut d'ATP, ens mostren un patró totalment compatible amb una situació en que s'està produint un increment en el flux electrònic però aquest no està sent utilitzat per a la síntesi d'ATP. En altres paraules, estem front un procés de desacoblament entre la respiració i la fosforilació oxidativa, procés que sol ésser degut a la pèrdua del gradient de protons necessari per a posar en marxa l'ATP sintasa mitocondrial.

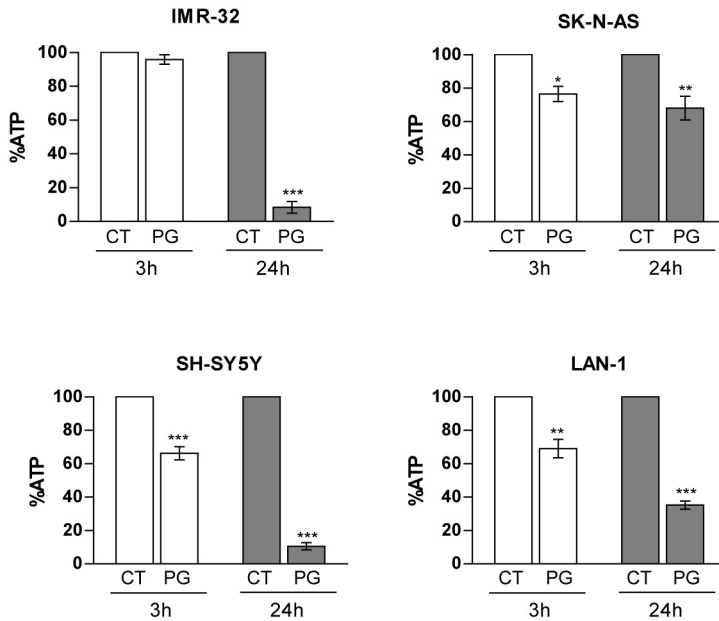


Figura 56. El tractament amb prodigiosina disminueix els nivells d'ATP en les cèl·lules de neuroblastoma. Els valors mostren les concentracions relatives d'ATP després de 3 i 24 h de tractament amb 1.5 μ M de PG. Els resultats són la mitjana \pm S.E.M. de tres mesures. Les concentracions basals d'ATP van ser: SH-SY5Y= 0.7 ± 0.07 , LAN-1= 0.84 ± 0.14 , IMR-32= 0.74 ± 0.07 , SK-N-AS= 0.84 ± 0.08 nmol/106 cèl·lules (determinat com la mitjana \pm S.E.M de tres mostres en comparació amb el control, corresponent a les cèl·lules no tractades). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (2WayAnova + Posttest Bonferroni).

Discussió

La PG és capaç d'induir una important disminució en la viabilitat cel·lular de les línies cel·lulars de neuroblastoma humà, essent especialment citotòxica per a les cèl·lules de tipus N. El número de cèl·lules viables SH-SY5Yhp, SH-SY5Y, LAN-1 i IMR-32 es veu reduït a la meitat, o menys de la meitat, després de 24 hores l'exposició a PG 1.5 μ M (les IC₅₀ de les tres línies cel·lulars en ordre són 0.15 \pm 0.01, 1.5 \pm 0.2, 1.5 \pm 0.2 i 0.7 \pm 0.1 μ M). La línia cel·lular de tipus S, SK-N-AS, requereix en canvi una dosi de PG de 7 \pm 0.5 μ M per a poder arribar a la seva IC₅₀, dosi a la qual cèl·lules no tumorals també podrien veure afectades (Campas et al., 2003; Montaner et al., 2000). Aquest resultat semblen prometedors si tenim en compte que les cèl·lules tipus N, neuroblàstiques, són considerades més agressives que les tipus S (Spengler et al., 1997), i que treballs realitzats per l'Institut Nacional del Càncer (Bethesda), testant la PG front un panel de 57 línies cel·lulars humanes canceroses, han mostrat una IC₅₀ promig de 2.1 μ M, concentració superior a la necessària per a produir el mateix efecte en les tres línies cel·lulars tipus N estudiades en aquest treball (informació accessible per Internet a www.dtp.nci.nih.gov, el número NSC per PG és 47147-F). Les cèl·lules de neuroblastoma tipus N semblen ser doncs força més sensibles a l'efecte de la PG que les cèl·lules no canceroses, i que la resta de cèl·lules d'altres tipus de càncers testades.

Els estudis de viabilitat realitzats per MTT i per comptatge de cèl·lules adherides s'han observat petites diferències. Tot i seguir ambdues corbes de viabilitat un mateix patró, la corba obtinguda en l'assaig per MTT, de la qual s'han extrapolat les concentracions IC₅₀ utilitzades en aquest estudi, va resultar lleugerament més elevada que la del comptatge de cèl·lules adherides, arribant a observar-se diferències del 30 % entre els dos mètodes. Aquestes dades semblen indicar que el percentatge de cèl·lules flotants desestimat en el comptatge cel·lular segueix essent capaç de reduir el MTT, conversió que depèn del poder reductor que caracteritza les cèl·lules vives. Segons Wei i col·laboradors en cèl·lules de carcinoma dosis sub tòxiques de PG produeixen una disminució de la capacitat d'adhesió a substrat. És possible que en aquest fet hi jugui un paper clau la capacitat que té la PG de disminuir l'expressió de RhoA (Zhang et al., 2005b). RhoA és un membre de la família de les GTPases petites Rho-like involucrades, entre d'altres processos, en l'agregació, l'adhesió i la migració cel·lular (Ben-Baruch, 2009). La PG podria doncs estar inhibint la capacitat de les cèl·lules de romandre adherides a la placa, podent existir cèl·lules en suspensió amb mitocondris funcionals durant un cert temps, fins a que la PG produís el seu efecte citotòxic sobre elles, o es desencadenés la mort per anoikis (apoptosi desencadenada per la pèrdua de contacte amb la matriu extracel·lular o amb les

cèl·lules veïnes) (Simpson et al., 2008). No existiria per aquest motiu però un major risc de metastasi degut a que, segons resultats obtinguts en el mateix treball, simultàniament a la pèrdua d'adhesió a substrat, PG promou l'agregació espontània de les cèl·lules, disminuint la probabilitat d'invasió i migració d'aquestes a altres teixits (Zhang et al., 2005b).

La comparació de l'efecte de la PG amb el cisplatí (CisPt), un agent quimioteràpic d'ús convencional (Kelland, 2006) emprat freqüentment en la teràpia contra els neuroblastomes (Kushner et al., 2008), mostra una major capacitat citotòxica de la PG en totes les línies cel·lulars testades a excepció de la IMR-32. La IC_{50} de la PG en les línies cel·lulars SH-SY5Y i LAN-1 és més de 30 cops inferior a la del CisPt, i 15 cops inferior en les SK-N-AS, mentre que en les IMR-32 les concentracions necessàries per a reduir la viabilitat cel·lular a la meitat són equivalents. El tractament simultani de PG i CisPt en les LAN-1 i SK-N-AS, produeix únicament en les LAN-1 un augment significatiu en la pèrdua de la viabilitat respecte els resultats obtinguts amb el tractament amb cadascuna d'elles per separat. Tenint en compte que les dosis de PG utilitzades són per sí soles inefectives en les cèl·lules SK-N-AS, i la magnitud de la disminució de la viabilitat observada en les LAN-1 al combinar els dos agents, creiem que el cotractament amb les dues drogues produeix un efecte additiu en les cèl·lules de neuroblastoma.

En el nostre model la PG redueix notablement la proliferació cel·lular en totes les línies estudiades de forma dosi i temps dependent, inclús amb dosis poc tòxiques del compost, indicant que la inhibició de la proliferació no es deu en la seva totalitat a la mort cel·lular. Al mateix temps, l'efecte citotòxic de la PG sembla estar lligat, al menys en part, a la proliferació cel·lular: els resultats obtinguts amb dos clons de la línia cel·lular SH-SY5Y, un amb una major velocitat de proliferació que l'altre, han mostrat que el clon amb índex de divisió més elevat és un ordre de magnitud més vulnerable a la PG que el que prolifera més lentament (IC_{50} 0.15 ± 0.01 i 1.5 ± 0.2 , respectivament).

No obstant, existeixen diferències notables entre els tipus de línies estudiades: mentre la inhibició del cicle cel·lular es confirma com l'efecte principal produït per la PG en les cèl·lules de tipus S, en les línies de tipus N l'aturada de la proliferació induïda per PG sembla estar vinculada a la pèrdua de viabilitat i/o diferenciació cel·lular. El comportament de les tres línies cel·lulars tipus N assajades front a PG tampoc és però del tot homogeni: LAN-1 i els dos clons SH-SY5Y mostren una major habilitat per a diferenciar-se que les IMR-32, existint a més a més

diferències en una mateixa línia depenent de la dosi i temps d'exposició a PG. De tota manera, en totes tres línies l'aturada del cicle cel·lular sembla acompanyar-se predominantment de mort cel·lular a partir de la dosi IC₅₀.

Estudis previs amb PG i amb d'altres membres de la família de les prodiginines ja descriuen l'efecte d'aquests compostos en la regulació de la proliferació cel·lular (Pandey et al., 2009; Perez-Tomas et al., 2003). Les prodiginines indueixen aturada del cicle cel·lular, però els processos descrits fins al moment suggereixen mecanismes d'acció diferents depenent del membre de la família de les prodiginines utilitzat i de la línia cel·lular en que s'ha testat el seu efecte. La PG inhibeix la proliferació de les cèl·lules T humanes Jurkat majoritàriament via aturada de la transició G1-S (Perez-Tomas and Montaner, 2003), havent-se observat el mateix efecte inclús a concentracions no apoptòtiques en cèl·lules de càncer de colon (Castillo-Avila et al., 2005). En les cèl·lules Jurkat PG inhibeix la ciclina E, la quinasa depenent de ciclins (cdk) 2, p27 i p21, així com l'activitat de la ciclina A-Cdk2 i de la ciclina E-Cdk2 i la fosforilació de la proteïna de retinoblastoma (pRb) (Perez-Tomas and Montaner, 2003). En canvi en cèl·lules de càncer de colon i de mama PG produeix una acumulació de p21^{Waf1/cip1} (Castillo-Avila et al., 2005; Ho et al., 2007; Soto-Cerrato et al., 2004; Soto-Cerrato et al., 2007b). En cèl·lules de càncer de mama s'ha descrit a més a més l'activació de NAG-1 (*nonsteroidal anti-inflammatory drug activated gene 1*) (Soto-Cerrato et al., 2007a), una proteïna involucrada, entre d'altres funcions, en l'aturada del cicle cel·lular (Kim et al., 2005; Yamaguchi et al., 2006).

Tot i les discrepàncies existents en els resultats obtinguts amb PG en funció de la línia cel·lular emprada, l'anàlisi global dels resultats prèviament publicats junt amb els obtinguts en aquest estudi, semblen indicar que l'efecte inhibidor de la progressió del cicle cel·lular no és un efecte citotòxic directe, sinó més aviat un efecte indirecte que contribueix a l'activitat antitumoral mitjançant l'aturada de la proliferació cel·lular, ja que tal i com ja es va observar en les cèl·lules de càncer de colon (Castillo-Avila et al., 2005), dosis subtòxiques de PG són capaces d'induir una inhibició del cicle cel·lular, en el nostre cas especialment en les cèl·lules tipus S.

L'efecte citostàtic induït per PG ens va fer plantejar la possible interacció del nostre compost amb l'ADN, degut a que les cèl·lules davant al dany a l'ADN desencadenen una complexa resposta que inclou l'aturada del cicle cel·lular, la reparació del mateix i en algunes circumstàncies l'activació de l'apoptosi (Khanna and Jackson, 2001). Tenint en compte que la PG és capaç de penetrar en les cèl·lules degut a la seva natura hidrofòbica que li permet

associar-se a les membranes cel·lulars, varem abordar aquesta possible interacció analitzant la captació i distribució cel·lular de la PG, valent-nos per a aconseguir aquesta finalitat de la seva autofluorescència.

Els resultats mostren que la PG és capaç de difondre lliurement per tot el citoplasma i orgànuls, però que difícilment penetra en el nucli de les cèl·lules, els quals mostren una lleu o nul·la fluorescència després del tractament amb el compost. Resulta difícil explicar aquest fet donada l'estructura hidrofòbica de la PG, però els resultats semblen suggerir que algun component de la membrana nuclear o del reticle endoplasmàtic que envolta al nucli podria estar retenint la PG, o una forma de la mateixa prèviament metabolitzada en el citoplasma.

Així doncs, tot i que s'ha descrit que la PG pot interaccionar *in vitro* amb l'ADN en presència del cofactor metàl·lic coure (oligoelement essencial present en totes les cèl·lules) (Linder and Hazegh-Azam, 1996), produint trencaments de doble cadena en l'ADN (Melvin et al., 2001; Montaner et al., 2005; Park et al., 2003) i inhibint de forma dual les topoisomereses I i II (Montaner et al., 2005), la manca d'accés de la PG al nucli en el nostre model fa difícil considerar que una interacció directa de la PG amb l'ADN pugui estar produint-se, tot i que no podem descartar que el mètode de diagnòstic utilitzat no sigui el més adequat. No obstant, cal tenir present que els estudis realitzats fins al moment s'han realitzat amb plasmidis d'ADN nus (Melvin et al., 2001; Montaner et al., 2005; Park et al., 2003), fent difícil predir la seva contribució en els efectes citotòxics observats en la cèl·lula, on l'ADN es troba formant complexos amb les proteïnes i no és de tan fàcil accés.

Per tal de poder definir les molècules diana on actua la PG és essencial conèixer la localització cel·lular de l'agent d'interès. En les cèl·lules de càncer de pulmó A549 s'ha descrit la distribució de PG per tot el citoplasma (Baldino et al., 2006) i en cèl·lules de ronyó de hamster s'ha observat l'acumulació de la prodigiosina-25C en grànuls citoplasmàtics (Kataoka et al., 1995). És probable que la distribució cel·lular de la PG depengui del tipus cel·lular i que tingui una participació important en proporcionar especificitat en les cèl·lules tumorals. Per aquest motiu, tot i la seva àmplia difusió pel citoplasma en el nostre model d'estudi, resultava important definir la seva possible localització subcel·lular, per tal de limitar les seves dianes d'acció.

La visualització simultània de PG i mitocondris, aquests darrers prèviament tenyits amb el marcador específic MitoTracker®, ens va permetre observar cúmuls intramitocondrials de PG en

totes les línies de neuroblastoma humà estudiades, especialment en les tipus N. L'inflament mitocondrial (*swelling*) causat per PG en preparacions mitocondrials de rata ja havia estat descrit amb anterioritat (Konno et al., 1998), podent estar relacionat amb l'acumulació de PG en el seu interior.

Les alteracions mitocondrials, com l'alliberament de proteïnes apoptòtiques segregades, la pèrdua del potencial transmembrana i la disminució en els nivells de síntesi d'ATP, han mostrat estar involucrats, i possiblement ser responsables, de les diferents manifestacions de mort cel·lular (Bras et al., 2005). Degut a que la PG s'acumula majoritàriament en els mitocondris de les nostres cèl·lules, la següent pregunta que ens varem plantejar va ser si aquesta acumulació estava afectant l'activitat mitocondrial. Així doncs, tenint en compte que el contingut d'ATP i el consum d'oxigen s'assumeixen com a indicadors de dita activitat, varem procedir a la seva mesura.

El contingut d'ATP va resultar ser relativament baix en les cèl·lules de neuroblastoma, al voltant de 1 mM, fet que concorda amb cèl·lules immadures amb un metabolisme més aviat anaeròbic. L'exposició a PG va induir un descens en els nivells d'ATP a menys de la meitat en 24 hores en les línies cel·lulars tipus N, indicant un possible dany en l'activitat mitocondrial i podent comprometre seriosament la viabilitat cel·lular d'aquestes cèl·lules. En les cèl·lules tipus S en canvi, la disminució observada en el contingut d'ATP a les 24 hores va ser molt inferior, arribant només al 30% respecte els controls, havent-se observat en aquesta línia cel·lular una menor colocalització entre el marcador mitocondrial MitoTracker® i la PG, i coincidint a més a més amb el poc efecte de la PG observat en les mesures de viabilitat cel·lular en aquesta línia.

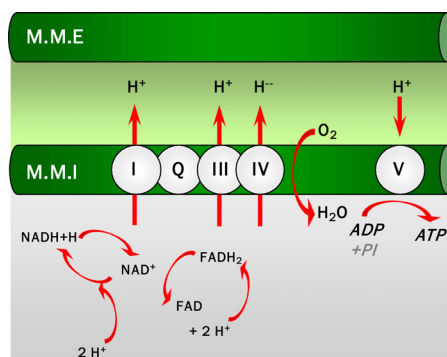


Figura 57. Cadena respiratòria mitocondrial. El transport d'electrons a través dels complexos de la cadena respiratòria (I a IV) està associat amb el bombeig de protons de la matriu mitocondrial a l'espai intermembrana, creant un gradient electroquímic ($\Delta\mu H^+$) per a la síntesi d'ATP per l'ATP sintasa (V).

En quant a la respiració mitocondrial, l'exposició a PG únicament induïx alteracions significatives en el consum d'oxigen en dues de les línies tipus N, les LAN-1 i les IMR-32, i en proporcions inferiors a les esperades tenint en compte la marcada disminució observada en el contingut d'ATP, podent ésser compatible aquesta situació amb un desacoblament mitocondrial (Figura 57).

Així doncs, els resultats semblen indicar un efecte desacoblant entre l'energia proporcionada per la cadena mitocondrial i l'ús d'aquesta energia per a la síntesi d'ATP. Aquest efecte es pot relacionar amb la capacitat de captar protons de la PG. El pK_a de la PG és aproximadament 7.2 (Rizzo et al., 1999), significat un equilibri $PG+H^+ \leftrightarrow PG-H^+$ desplaçat a la dreta quan el pH és inferior a 7.2 (Rizzo et al., 1999). Les formes de PG protonada o desprotonada tenen, a més a més, diferents conformacions, principalment una prodigiosina- α linear, afavorida a $pH < 7$ i una prodigiosina- β plegada, afavorida a $pH > 7$ (Figura 58) (Manderville, 2001). Essent la càrrega i la conformació de la PG probablement determinants en la seva distribució i acumulació intracel·lular. Els resultats obtinguts mostren que la PG pot difondre cap a la matriu mitocondrial on, trobant-se a un pH de 8 (Casey et al., 2010), veuria afavorida la seva forma desprotonada, menys soluble, podent ser aquesta la causa dels agregats intramitocondrials visibles per fluorescència.

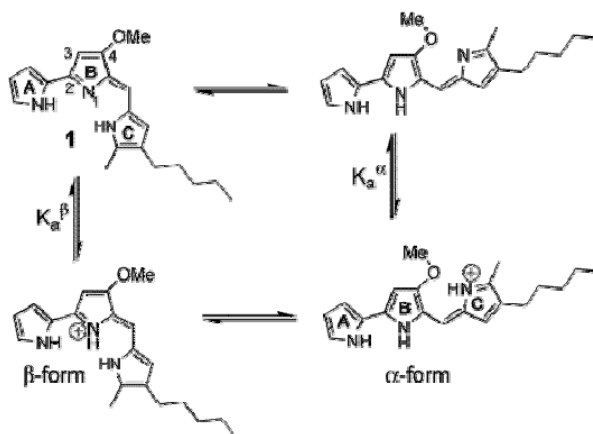


Figura 58. Protonació i equilibri d'interconversió dels rotàmers de la prodigiosina. Manderville RA et al. (2001).

Si tenim en compte que en les cèl·lules canceroses s'ha descrit que el pH intracel·lular té tendència a ser neutre o lleugerament alcalí (Shrode et al., 1997), la PG es trobarà pràcticament al seu pK_a en aquestes cèl·lules. Així doncs, en els compartiments àcids, com els lisosomes o l'espai intermembrana mitocondrial, la forma de la PG majoritària seria la de la PG - H^+ (Figura 59).

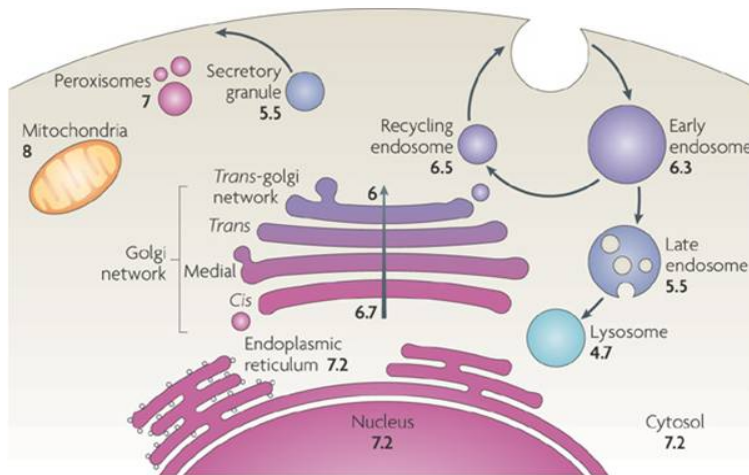


Figura 59. Valors de pH dels diferents compartiments subcel·lulars. Esquema on s'indica el pH dels diferents òrgànuls i compartiments en una cèl·lula de mamífer prototip. El pH mitocondrial correspon al de la matriu, l'espai a l'interior de la membrana mitocondrial interna. Els endosomes primerencs es refereixen al conjunt dels compartiments endosomals. El pH del endosoma tardà multivesicular es refereix a la major part del fluid luminal: el pH del fluid que contenen les vesícules internes pot variar. Adaptat de Casey et al. (2010).

Per tal d'avaluar l'efecte de la PG sobre el pH lisosomal es va realitzar una tinció vital amb taronja d'acridina, la qual va revelar la dissipació del gradient protònic d'aquests compartiments en totes les línies cel·lulars estudiades, reflectint l'afectació de les bombes de protons vacuolars (V-ATPases).

Un possible efecte desacoblant de les prodiginines sobre les V-ATPases, i les bombes de protons localitzades en la membrana mitocondrial interna (F-ATPases), trencant els gradients intracel·lulars i, causant acidificació citoplasmàtica a través de l'activitat simport H^+/Cl^- , ja havia estat prèviament suggerida en diferents tipus de línies cel·lulars canceroses (Kataoka et al.,

1995; Konno et al., 1998; Sato et al., 1998; Yamamoto et al., 1999; Yamamoto et al., 2001; Yamamoto et al., 2000). No obstant, la contribució de l'acidificació cel·lular en la citotoxicitat d'aquests compostos no està encara del tot clara. La inhibició per la base permeable a membranes imidazol de l'aturada de la proliferació cel·lular (Yamamoto et al., 1999) i l'apoptosi (Yamamoto et al., 2000) induïdes per cPrG.HCl, suggereixen que l'acidificació citoplasmàtica està directament involucrada en l'activitat citotòxica de la PG. D'altra banda, també s'ha descrit que concentracions no citotòxiques de PG són capaces d'induir alcalinització dels lisosomes i d'aturar la proliferació cel·lular sense produir mort cel·lular en cèl·lules de càncer de colon (Castillo-Avila et al., 2005).

En el present estudi nosaltres hem observat efectes sobre els gradients intracel·lulars en totes les cèl·lules de neuroblastoma testades front a PG, tant en condicions en les quals les cèl·lules han perdut la seva viabilitat (tipus N), com en condicions en que les cèl·lules la mantenen (tipus S). Tenint en compte aquestes resultats, suggerim que en les cèl·lules de neuroblastoma la PG pot estar modificant totes les ATPases dependents de protons, degut a l'afectació dels gradients protònics intracel·lulars, però que aquest efecte és particularment determinant per a la viabilitat cel·lular únicament quan la PG bloqueja el gradient de protons mitocondrial.

Altres autors han descrit en cèl·lules de ronyó de hámster tractades amb prodigiosina-25C (PG-25C), un efecte en les bombes de protons i en l'activitat lisosomal H^+ -ATPasa sense alteració dels nivells d'ATP (Kataoka et al., 1995). En dit estudi però, les mesures d'ATP es van realitzar a temps curts (1 hora) i en cèl·lules amb un elevat contingut en ATP (al voltant de 5 mM) fet que podria fer-les més resistents a l'efecte mitocondrial de les prodigiosines.

Els mecanismes de mort cel·lular induïts per PG s'han estudiat en base a les tres vies apoptòtiques principals avui dia descrites: l'apoptosi intrínseca mediada pel mitocondri, l'apoptosi extrínseca induïda per receptors de mort i la senyal apoptòtica produïda per l'estrès reticular (ER). Les caspases són les proteases cisteïna intracel·lulars responsables i associades a les tres vies apoptòtiques.

Alteracions en l'homeòstasi del pH mitocondrial s'han involucrat com un esdeveniment primerenc important en l'apoptosi depenent de mitocondri (Casey et al., 2010). Factors proapoptòtics i estímuls, com la proteïna BAX o la radiació ultraviolada, indueixen alcalinització de la matriu mitocondrial paral·lelament a l'acidificació citoplasmàtica. Tot i que el mecanisme

precís encara no es coneix, i que probablement aquest sigui depenent del tipus cel·lular, està clar que el citosol s'acidifica, potenciant l'activació de l'activitat proteolítica de les caspases com a conseqüència de l'alliberament del citocrom c del mitocondri. No obstant no tota la mort cel·lular associada a l'acidificació intracel·lular produïda per un bloqueig en l'activitat dels intercanviadors de protons ha d'estar necessàriament lligada a l'activació de caspases, podria estar induint formes alternatives de mort cel·lular programada (Broker et al., 2005).

En el nostre estudi, signes clars d'apoptosi només s'han observat en les cèl·lules SH-SY5Yhp, però no en la resta de línies cel·lulars. Un anàlisi més complet realitzat en aquestes cèl·lules mostra una activació inicial de la caspasa 2, i de les caspases efectores 3 i 7. No s'observa proteòlisi de la caspasa 9, iniciadora de la via intrínseca o mitocondrial, fins unes hores més tard, tot i l'alliberació primerenca de citocrom c. Smac/DIABLO surt del mitocondri al mateix temps que el citocrom c, sent AIF el factor mitocondrial estudiat alliberat més tard. Una forma curta de la caspasa 8, iniciadora de la via extrínseca, és l'última de les caspases en activar-se. Estudis realitzats amb PG en cèl·lules petites de carcinoma de pulmó (Llagostera et al., 2005) i en càncer de mama (Soto-Cerrato et al., 2004) mostren també un alliberament molt temprà del citocrom c (15 i 30 minuts respectivament), no produint-se l'activació de caspases (3,7, 8 i 9) fins a les 16 hores de tractament amb el compost. Resultats que semblen indicar que la PG indueix una sortida ràpida de citocrom c del mitocondri en diferents tipus de cèl·lules canceroses, però que els nivells citoplasmàtics inicials són insuficients per a induir la proteòlisi immediata de la pro-caspasa 9, que no es produeix fins al cap d'unes hores.

Pel que respecte a la caspasa 2, és la més conservada de totes les caspases descrites fins al moment però la seva funció fisiològica avui dia encara és un enigma, havent estat descrita tant en una posició apical, com a caspasa iniciadora, com per sota d'altres caspases amb una funció amplificadora (Krumshnabel et al., 2009a). Nombroses publicacions recents atribueixen múltiples funcions a aquest enzim, involucrant-lo en diverses rutes, podent estar senyalitzant tant per apoptosi com per aturada de la proliferació (en aquest darrer cas després d'haver-se produït dany a l'ADN) (Kitevska et al., 2009; Krumshnabel et al., 2009a; Krumshnabel et al., 2009a; Krumshnabel et al., 2009b). Els resultats obtinguts amb les cèl·lules SH-SY5Yhp ens indiquen però, que en aquesta línia cel·lular, la proteòlisi de la caspasa 2 és prèvia a la d'altres caspases iniciadores (9 i 8), motiu pel qual ens centrarem en aquelles vies on es descriu una posició apical de la caspasa 2: dany a l'ADN i estrès reticular.

Com a resposta a l'estrès reticular la caspasa 2 pot actuar com iniciadora induint el trencament de la proteïna BH3-*only* Bid i desencadenant la sortida de citocrom c i Smac/DIABLO (Krumshnabel et al., 2009a; Zhivotovsky and Orrenius, 2005), tot i que encara no es coneix

amb certesa com succeeix aquest procés. L'activació de la caspasa 2 en cèl·lules SH-SY5Y ha estat descrita en resposta a l'estrès reticular induït pel compost thapsigargin (Dahmer, 2005). L'anàlisi de l'expressió de la proteïna Grp78, principal reguladora de la funció del reticle endoplasmàtic i un dels marcadors rellevants de l'estrès reticular (Banhegyi et al., 2007; Li and Lee, 2006), mostra un clar augment després de 12 hores d'exposició a PG, coincidint amb l'inici de la disminució de la forma inactiva de la caspasa 2, suggerint l'estrès reticular com a causa d'activació d'aquesta caspasa. És més, hi ha diverses evidències de que l'inhibició de les tirosin quinases augmenten l'apoptosi mediada per estrès reticular en nombrosos tipus de cèl·lules canceroses, entre elles les cèl·lules de neuroblastoma SH-SY5Y i les de càncer de mama MCF-7 (Hu et al., 2004; Piechocki et al., 2006), i el tractament amb PG, al menys en les cèl·lules de càncer de mama MCF-7, s'ha descrit que és capaç d'atenuar l'activitat de la via de supervivència fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/ Akt (Soto-Cerrato et al., 2004).

El dany a l'ADN també s'ha descrit que indueix l'activació de la caspasa 2 i la seva posterior acció sobre Bid (Krumnschnabel et al., 2009a). No obstant, tal i com hem comentat anteriorment, creiem difícil que una interacció directa de la PG amb l'ADN estigui produint-se en el nostre model. Per aquest motiu, nosaltres suggerim que la PG estaria induint l'activació de la caspasa 2 degut més aviat a estrès reticular que no pas a dany a l'ADN, tot i que és necessari un anàlisi més exhaustiu i complert d'ambdós processos. No podem doncs, descartar que la caspasa 2 estigui interaccionant directament sobre el mitocondri o sobre Bid com a resultat de l'activació d'una d'aquestes vies. No obstant, cal tenir present que el procés apoptòtic sembla ser un efecte secundari al dany cel·lular mitocondrial, ja que la mort cel·lular es protegeix només parcialment quan s'inhibeixen les caspases, indicant que tot i que les caspases participen en la mort cel·lular de les línies de neuroblastoma, la seva inhibició no és suficient per a rescatar les cèl·lules de la mort. A més a més en cèl·lules de càncer de mama el cotractament de PG amb l'inhibidor general de caspases z-VAD.fmk no impedeix l'alliberament de citocrom c al citoplasma, suggerint que la PG està actuant principalment a través del mitocondri (Soto-Cerrato et al., 2004).

Alguns articles indiquen la possible implicació de la via extrínseca d'apoptosi en la mort cel·lular induïda per PG (Llagostera et al., 2005; Montaner and Perez-Tomas, 2002; Soto-Cerrato et al., 2004; Soto-Cerrato et al., 2007a). No obstant l'expressió de la caspasa 8 en el neuroblastoma és font de gran controvèrsia, existint múltiples publicacions amb resultats contradictoris o poc conclusius, especialment entre els estudis en que s'han emprat línies cel·lulars, podent atribuir-se aquesta variància a les diferències adquirides pels diferents subclons i nombre de passes. En els neuroblastomes la pèrdua d'expressió de caspasa 8 s'estima en aproximadament un 25-35 %, predominantment en tumors considerats d'alt risc (Hopkins-Donaldson et al., 2000;

Poulaki et al., 2001; van Noesel and Versteeg, 2004). Aquesta silenciació, observada en línies cel·lulars i tumors, s'atribueix tant a causes genètiques degut a delecions genòmiques (Takita et al., 2000; Takita et al., 2001), com a causes epigenètiques per inactivació genètica per hipermetilació, sent aquesta darrera la més freqüent en tumors (Teitz et al., 2000; Teitz et al., 2001). En neuroblastomes no diferenciats també s'ha descrit l'expressió d'una isoforma més llarga de la caspasa 8 anomenada caspasa 8L (*long*), generada per *splicing* alternatiu, que actuaria com a inhibidor de la caspasa 8 normal (Miller et al., 2006).

En les cèl·lules SH-SY5Yhp hem detectat l'expressió d'una caspasa 8 d'inferior pes molecular a l'esperat. L'expressió d'una forma curta de la caspasa 8 en línies cel·lulars de neuroblastoma ha estat descrita prèviament per Komada i col·laboradors (Kisenge et al., 2003). En aquest treball van identificar d'entre 31 línies cel·lulars de neuroblastomes estudiades, 5 que expressaven una caspasa 8 d'aproximadament 45 KDa en comptes dels 55 KDa esperats. L'anàlisi de l'estructura i la seqüència de nucleòtids va mostrar la pèrdua de l'exó 3 en la forma curta, exó que conté un dels dos dominis efectors de mort (DEDs) de la proteïna (Figura 60). El resultat d'aquest *splicing* és una caspasa 8 amb menor funcionalitat, suggerint que la presència dels dos DEDs és necessària per al correcte funcionament d'aquesta caspasa.

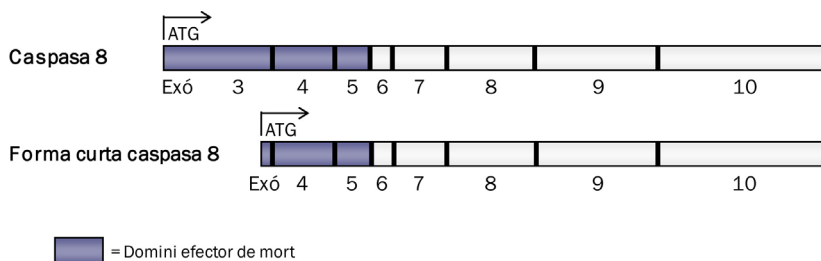


Figura 60. Esquema de l'estructura dels dominis de la caspasa 8 normal i de la forma curta en les cèl·lules de neuroblastoma. En la forma curta de la caspasa 8 es perd l'exó 3 durant *splicing*. Modificat de Kisenge et al. (2003).

En el nostre estudi, tot i detectar en la línia SH-SY5Yhp una disminució de la proforma curta de la caspasa 8, i un augment en l'activitat IETDasa, la coïncubació de PG amb l'inhibidor específic de caspasa 8 IETD.fmk, no produeix una recuperació de la pèrdua de viabilitat respecte al tractament únicament amb PG. A més a més tot i que la PG actua augmentant la producció de la citocina TNF- α i l'expressió del seu receptor TNF-R1, el cotractament de PG amb TNF- α , no

produeix un augment de la citotoxicitat del nostre compost. Aquests resultats, junt amb els obtinguts amb l'inhibidor general de caspases zVAD.fmk, semblen indicar un paper molt secundari de la via extrínseca de mort en el procés desencadenat per PG en les cèl·lules de neuroblastoma. No obstant, tal i com hem comentat anteriorment, els estudis publicats fins al moment apunten a que en una proporció important dels neuroblastomes no s'expressa caspasa 8, i en els casos en que sí s'expressa, és possible que la capacitat citotòxica de la PG es vegi potenciada per l'activació d'aquesta caspasa, tal i com s'ha observat en altres tipus cel·lulars (Llagostera et al., 2005; Montaner and Perez-Tomas, 2002; Soto-Cerrato et al., 2004).

El dany mitocondrial pot desencadenar mecanismes de mort apoptòtics o no apoptòtics depenent de l'estat metabòlic i de l'expressió de factors reguladors de l'apoptosi (Broker et al, 2005). A més a més és probable que en el neuroblastoma no siguin rares les formes atípiques d'apoptosi: al menys en les cèl·lules IMR-32, s'ha descrit una manca d'activació de la DNasa de caspases (Yuste et al., 2001). Pel que respecta a l'autofàgia, la manca d'activitat lisosomal no és compatible amb aquest procés, tot i que aquesta via no ha estat assajada com a resposta a la PG.

El factor nuclear kappa B (NF- κ B) és un factor de transcripció que ha sorgit com un important modulador de sistemes genètics alterats i fenotips malignes en el desenvolupament del càncer. Existeixen actualment moltes evidències de que l'activació mantinguda o constitutiva de NF- κ B és prevalent en línies cel·lulars i teixits tumorals, mantenint la supervivència o malignitat de les cèl·lules tumorals (Inoue et al., 2007; Van Waes, 2007). Motius que converteixen NF- κ B en una potencial diana terapèutica.

La forma més comú de NF- κ B és un heterodímer format per p65 i p50, l'activació del qual s'indueix per citoquines, com la IL-1 i TNF- α , així com per agents proliferatius com els esters de forbol i el lipopolisacàrid (LPS) bacterià (Figura 61). L'estimulació per aquests agents induïx l'activació de les cinases inhibidores (IKK α i IKK β) que fosforilen les proteïnes inhibidores (iKBs) que es troben associades amb NF- κ B en el citoplasma. La fosforilació produeix la degradació de les iKBs pel proteosoma i com a resultat NF- κ B es transloca al nucli, on s'uneix a seqüències d'ADN en promotors diana per a induir la transcripció gènica (Inoue et al, 2007).

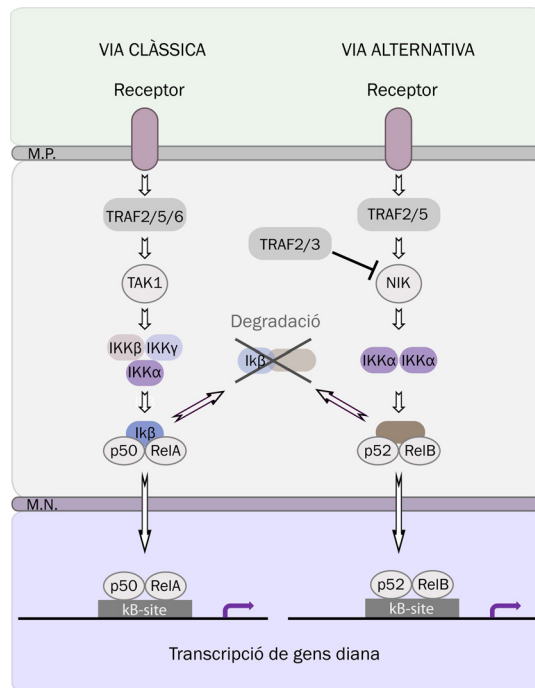


Figura 61. Dues vies d'activació del factor NF-κB, la clàssica i l'alternativa. La via clàssica s'activa per citocines proinflamatòries, antígens, components de la paret cel·lular de bacteres, virus i estrès genotòxic. La via alternativa s'inicia per certs membres de la superfamília del factor de necrosi tumoral (TNF). TRAF, *TNF Receptor Associated Factor Family*. Modificat de Inoue et al. (2007).

El resultat preliminar obtingut mostren una activació basal constitutiva de NF-κB en la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Yhp. L'exposició d'aquestes cèl·lules a PG disminueix la capacitat d'aquest factor de transcripció de translocar al nucli, inhibint la seva acció.

Els treballs publicats fins al moment respecte l'acció de les prodiginines sobre NF-κB són escassos, basant-se la majoria d'ells principalment en les propietats immunosupressores d'aquests compostos, i emprant-se sempre en la realització d'aquests estudis en dosis poc citotòxiques: PNU156804, anàleg de la undecilprodigiosina (UP), bloqueja l'activació transcripcional de NF-κB en cultius primaris humans de limfòcits T únicament quan el sistema ha estat activat per la IL-2, i el seu mecanisme d'acció té lloc mitjançant la atenuació de la degradació de IκBα i IκBβ implicant l'activació de NF-κB (Mortellaro et al., 1999); cicloprodigiosina hidroclore (cPrG-HCl) inhibeix l'expressió gènica de NF-κB induïda per TNF-α i PMA en cèl·lules HeLa a nivell transcripcional, sense afectar aparentment les senyals que es

troben per sobre seu en la via, ni inhibir la translocació del factor de transcripció al nucli (Kamata et al., 2001); PG sembla bloquejar les senyals de les citoquines (inhibeix l'expressió de la cadena α del receptor de la IL-2) però no inhibeix l'activació de NF- κ B en cultiu primari de cèl·lules T de ratolí estimulades amb LPS, enrederint la progressió de la diabetis autoimmune mitjançant el bloqueig de la via IL-2/IL-2R α (Han et al., 2001); per últim, la preincubació amb PG de macròfags peritoneals de ratolí exposats a LPS suprimeix la producció de iNOS mitjançant la inhibició de la fosforilació de p38MAPK i JNK, i l'activació de NF- κ B junt amb la degradació de I κ B α , no afectant la producció de citoquines (Huh et al., 2007). Cal però acabar de delimitar si existeix, i quina és, la connexió entre aquest efecte sobre NF- κ B i la dissipació dels gradients protònics i el dany mitocondrial descrits anteriorment.

En el present estudi s'ha estudiat la PG com a compost base d'una família de compostos tripirròlics de similar estructura química coneguts com prodiginines. Molts dels membres d'aquesta família posseeixen propietats anticanceroses, però les seves dianes moleculars no s'han pogut identificar de manera conclusiva degut a que semblen actuar simultàniament sobre diverses rutes (Bennett and Bentley, 2000; Pandey et al., 2009; Perez-Tomas et al., 2003).

La utilització de la PG en cultius cel·lulars humans de neuroblastoma ha estat un abordatge que ens ha permès delimitar en bona part els seus mecanismes d'actuació en aquest model. Els resultats obtinguts suggereixen que la PG podria estar actuant en aquestes línies tumorals com a agent segregador de protons, destruint el gradient de pH intracel·lular. El seu principal efecte citotòxic creiem que podria estar relacionat amb la seva acció sobre el mitocondri, on produeix un efecte desacoblant en la cadena electrònica de transport de protons a l'ATP sintasa mitocondrial: com a resultat d'aquesta acció observem una reducció en la producció d'ATP però sense afectació en el consum d'oxigen. No obstant, aquesta no és l'única alteració desencadenada per PG, ja que a més a més sembla induir estrès reticular, i produeix un efecte inhibitor en el cicle cel·lular, processos que s'haurien d'analitzar amb més detall, però probablement responsables en part de la inducció de mort cel·lular.

Les drogues que modulen el pH intracel·lular poden tenir potencial terapèutic degut a que les cèl·lules canceroses tenen un pH més alcalí (Schroder et al., 1998). Endemés, degut a que aquest efecte és diferent de l'induït per drogues quimioteràpiques convencionals, suggerim un possible paper de la PG en potenciar l'efecte d'altres agents antitumorals en el tractament del

neuroblastomes, malgrat que l'únic intent realitzat per nosaltres en aquest sentit, utilitzant el compost CisPt, no han estat conclusiu en el tractament de cèl·lules neuroblàstiques. A més a més, si tenim en compte que els tumors adquireixen heterogeneïtat molecular durant el procés de transformació, i que una única ruta dominant és poc probable en la majoria de tumors, el fet que les prodiginines desencadenin múltiples efectes bioquímics és un punt més al seu favor. De fet la tendència actual en les teràpies a llarg termini és actuar sobre múltiples dianes en comptes de sobre una única molècula, disminuint així la probabilitat de resistències.

No obstant, som conscients de les dificultats de distribució i absorció amb les que es pot trobar la PG administrada *in vivo* degut al seu marcat caràcter liposoluble. Però aquest és un problema de farmacodinàmica que podria abordar-se amb derivats més solubles de la PG. Actualment ja existeix un gran interès en la cerca d'anàlegs de síntesi de les prodiginines amb una major eficàcia i menor citotoxicitat. D'entre els molts treballs realitzats en aquest camp, destaquem el tripirrol Obatoclax mesylate (2-[2-[(3,5-Dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene]-3-methoxy-2H-pyrrol-5-yl]-1H-indole methanesulfonate), inhibidor general de la família Bcl-2, que es troba en assajos clínics de fase I/II (Trudel et al., 2007).

Capítol 2

Caracterització de la Mort Cel·lular Induïda
per Tricostatina A en Línies Cel·lulars de
Neuroblastoma Humà

Introducció

L'inici i el progrés del càncer estan controlats per processos genètics i epigenètics, però mentre els primers són pràcticament irreversibles, les aberracions epigenètiques són potencialment reversibles, permeten a la població cel·lular maligna tornar a un estat més normal (Baylin and Ohm, 2006; Cress and Seto, 2000; Esteller, 2008; Mahlknecht et al., 2000; Timmermann et al., 2001). Principalment s'han identificat dos mecanismes essencials en la regulació epigenètica de la transcripció gènica, la modificació d'histones i la metilació de l'ADN (Egger et al., 2004; Kristensen et al., 2009).

Els enzims histona desacetilasa (HDACs), encarregats d'extreure grups acetil a les lisines de proteïnes diana, estan directa o indirectament involucrats en molts processos biològics, com l'expressió gènica o la regulació de rutes de proliferació, diferenciació i mort cel·lular (Carew et al., 2008a; Marks and Xu, 2009; Xu et al., 2007). Els compostos inhibidors de l'activitat d'aquests enzims (HDIs) constitueixen una nova classe de drogues que alteren l'estat d'acetilació de les histones i d'una sèrie de dianes no histona importants (Lane and Chabner, 2009; Marks and Xu, 2009).

Els HDIs modulen l'estructura de la cromatina produint canvis transcripcionals, indueixen efectes pleiotròpics en rutes funcionals, i activen la senyalització de mort cel·lular en cèl·lules canceroses. La seva activitat antineoplàstica ha estat demostrada *in vivo* i *in vitro* en diversos models experimentals de càncer (Batty et al., 2009; Lane and Chabner, 2009) amb molt poca toxicitat vers les cèl·lules normals (Zhang C et al, 2005; Ungerstedt et al, 2005). Han estat identificats varis HDIs d'estructura diversa, que difereixen en la seva activitat antitumoral, especificitat, toxicitat i estabilitat (Wang and Dymock, 2009). Actualment varis d'aquests compostos es troben en assajos clínics de fase I i II com a agents monoteràpics i en assajos clínics en teràpia combinada (Batty et al., 2009), i s'està considerant la seva utilització en el tractament d'aquells càncers amb necessitats terapèutiques urgents, entre ells els neuroblastomes (Kristensen et al., 2009; Witt et al., 2009a).

Els resultats que exposem a continuació corresponen a l'estudi de l'efecte de l'HDI tricostatina A (TSA), en varies línies de neuroblastoma humà de cèl·lules neuroblàstiques tipus N, S i I. Hem investigat els canvis produïts en la viabilitat i la proliferació cel·lular, així com el tipus de mort cel·lular induït per aquest agent. El TSA (7-[4-(dimetilamino)fenil]-N-hidroxy-4,6-dimetil-7-oxo-(2E,4E6R)-2,4-heptadienamida) és un àcid hidroxàmic natural (grup -CO-NHOH), i és considerat

com el prototip d'HDI no selectiu (pan), per bloquejar l'activitat de les HDAC de classe I i II. Té una gran potencia inhibidora front les HDAC1, 2, 3, 4, 7, 9 i 6, i relativament dèbil contra l'HDAC8. Fins al moment no s'han publicat dades per a l'activitat del TSA sobre les HDAC5 i 11 (Codd et al., 2009).

Resultats

El TSA afecta la viabilitat cel·lular de les cèl·lules de neuroblastoma i incrementa l'acetilació de les histones H3 i H4

Els efectes de la inhibició de les desacetilases en cèl·lules de neuroblastoma s'ha estudiat emprant el TSA, un HDI pertanyent a la classe dels àcids hidroxàmics, originàriament desenvolupat com a agent antifúngic, que actua sobre els HDACs de classe I i II (Codd et al., 2009; Lane and Chabner, 2009).

El tractament de cèl·lules amb TSA resulta en nivells inusualment elevats d'acetilació de les histones, diana directa dels enzims HDAC (Taddei et al., 2005; Yoshida, 2004). Per tal d'avaluar l'efecte d'aquest compost sobre l'acetilació de les histones en el nostre model cel·lular, les cèl·lules es van tractar amb TSA 0.5 μ M durant 24 hores, dosi freqüentment emprada en la bibliografia (Muhlethaler-Mottet et al., 2006; Noh et al., 2009; Subramanian et al., 2007). L'anàlisi per *Western blot* dels extractes proteics mostra que el TSA indueix un notable increment en els nivells d'acetilació de les histones H3 i H4 en les quatre línies cel·lulars testades, confirmant el seu efecte sobre les HDACs (Figura 62).

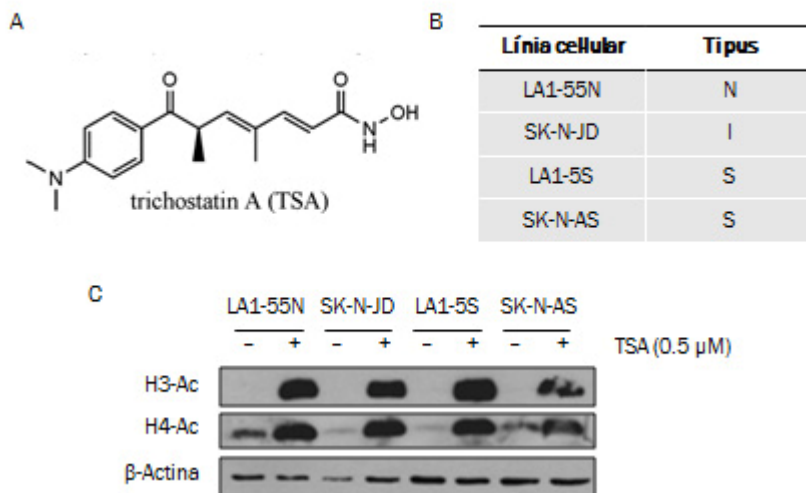
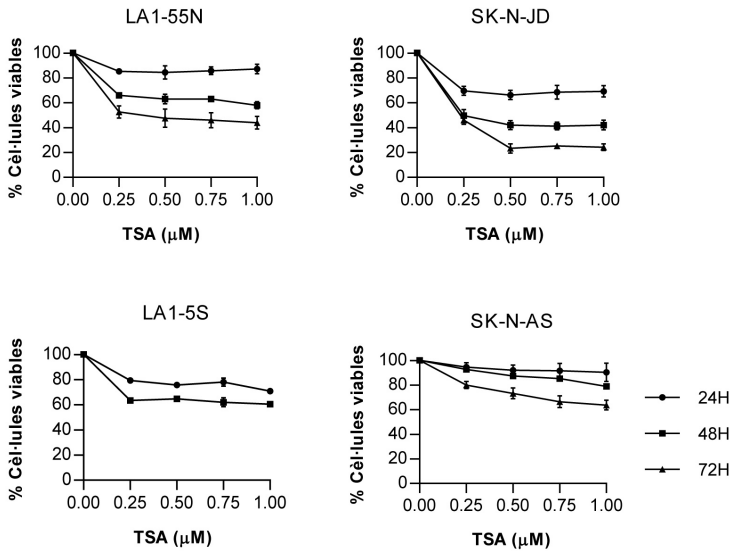


Figura 62. El TSA indueix un augment dels nivells d'acetilació de les histones H3 i H4. **A** | Estructura del compost tricostatina A (TSA). Adaptat de Codd et al. (2008). **B** | Taula on s'indica el tipus de cèl·lula de cada línia cel·lular emprada. N, neuroblàstic; S, Shwanian; I, intermedi. **C** | Anàlisi per *Western blot* de l'acetilació de les histones H3 i H4 després d'haver incubat les cèl·lules de neuroblastoma durant 24 h amb TSA 0.5 μ M.

A



B

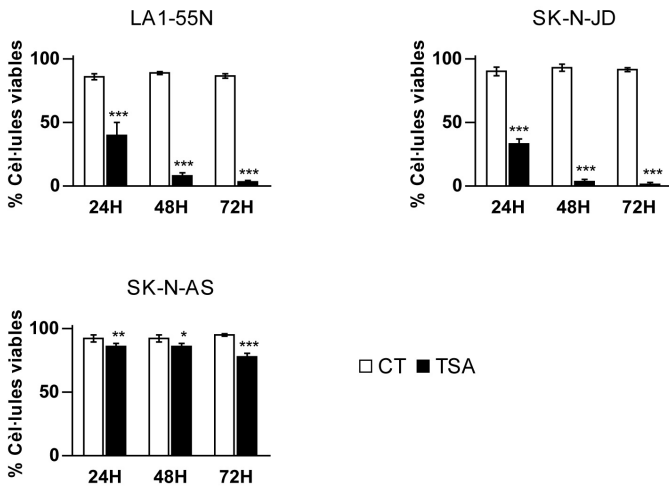


Figura 63. El TSA disminueix la viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma. A | Les cèl·lules de neuroblastoma es van tractar durant 24, 48 i 72 h amb diferents dosis de TSA. El número de cèl·lules viables es va determinar per MTT. Els resultats de les corbes dosi resposta representen el número de cèl·lules viables tractades amb TSA en comparació amb els controls (100%). B | Les línies cel·lulars LA1-55N, SK-N-JD i SK-N-AS van tractar-se durant diferents temps amb la dosi de TSA 0.5 μM . El recompte de cèl·lules viables es va realitzar pel mètode d'exclusió *trypan blue* (TB). Els resultats són la mitja \pm S.E.M de tres experiments independents. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (Anova + Dunnett).

L'anàlisi de la viabilitat, realitzat per MTT i per comptatge d'exclusió amb *Trypan Blue* (TB), mostra una disminució dosi i temps dependent de la viabilitat de les cèl·lules com a resposta a

l'exposició a TSA (Figura 63). No obstant, no tots els tipus cel·lulars mostren el mateix grau de sensibilitat al compost. Les cèl·lules tipus S SK-N-AS, resulten ser les més resistents, disminuint només un 40 % la seva viabilitat respecte les cèl·lules sense tractar a les 72 hores d'exposició a TSA 1 μ M, mentre que en les cèl·lules LA1-55N (tipus N) i SK-N-JD (tipus I) la dosi 0.5 μ M de TSA redueix la viabilitat un 50 i un 80 % respectivament.

Basant-nos en els resultats que acabem d'exposar, i en treballs previs realitzats en cèl·lules de neuroblastoma amb TSA (Muhlethaler-Mottet et al., 2006; Subramanian et al., 2007), varem decidir utilitzar la concentració de TSA 0.5 μ M per a la realització del nostre estudi, ja que aquesta dosi ens permet realitzar un estudi comparatiu dels efectes del TSA en els diferents tipus de cèl·lules de neuroblastoma utilitzades.

El TSA disminueix el creixement cel·lular

La inhibició de les HDACs ha estat descrit que afecta tant la supervivència com la proliferació cel·lular, induint diferenciació en algunes de les línies cel·lulars estudiades (Marks and Xu, 2009). La inspecció microscòpica de la morfologia cel·lular de les línies cel·lulars utilitzades en aquest estudi no mostra modificacions significatives que evidenciïn que el tractament amb TSA està induint diferenciació cel·lular (Figura 64A). No obstant, el número de cèl·lules totals es veu notablement reduït després de 48 i 72 hores de tractament (Figura 64C), especialment en les cèl·lules LA1-55N i SK-N-JD, però també en les cèl·lules SK-N-AS on la disminució de la viabilitat és mínima, suggerint que a més a més de mort cel·lular, el TSA podria estar induint una aturada de la proliferació cel·lular.

Per tal d'estudiar una mica més la disminució del creixement cel·lular, varem utilitzar com a marcadors de proliferació cel·lular les proteïnes S100 i Ki67. L'antigen Ki67 és una proteïna nuclear relacionada amb les ciclines, que s'expressa en cèl·lules proliferants en totes les fases del cicle cel·lular actiu (G1, S, G2 i M), però absent en les cèl·lules en senescència (G0) (Cattoretti et al., 1992; Iatropoulos and Williams, 1996). S100 en canvi és una proteïna d'unió a calci implicada en la diferenciació i la proliferació cel·lular, que s'expressa entre d'altres, en cèl·lules de Schwann, glials i en neoplàsies neuronals (Bronckart et al., 2001). El marcatge per immunohistiquímica d'aquestes dues proteïnes indicadores de proliferació es redueix dràsticament en les cèl·lules SK-N-AS després de 24 hores de tractament amb la concentració subtòxica de TSA 0.5 μ M, confirmant la disminució del creixement cel·lular observada per comptatge de cèl·lules (Figura 64B).

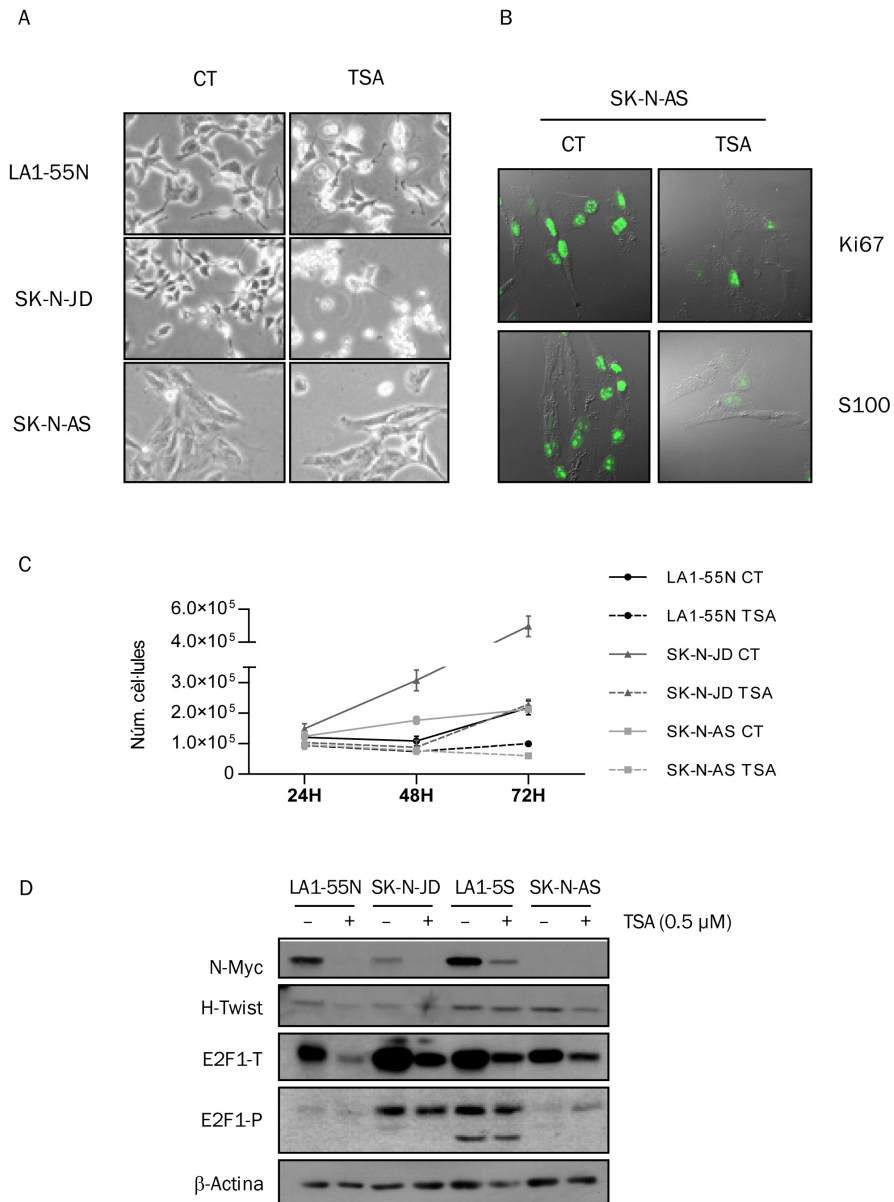


Figura 64. El tractament amb TSA disminueix els nivells de proliferació de les cèl·lules de neuroblastoma. A | Imatges de microscòpia confocal de les cèl·lules LA1-55N, SK-N-JD i SK-N-AS després de 24 h d'incubació en presència o absència de TSA 0.5 μM. **B** | Immunohistoquímica en les cèl·lules SK-N-AS contra les proteïnes indicadores de proliferació cel·lular S-100 i Ki67 després de 24 h d'incubació en presència o absència de 0.5 μM de TSA. **C** | Anàlisi del número de cèl·lules totals al llarg del temps en absència (línia contínua) o presència (línia discontinua) de TSA en les cèl·lules LA1-55N, SK-N-JD i SK-N-AS. Els valors són la mitjana ± S.E.M. de tres experiments independents. **D** | Disminució de l'expressió de proteïnes involucrades en la proliferació cel·lular. Anàlisi per *Western blot* dels nivells de proteïnes directament relacionades amb la capacitat proliferativa de les cèl·lules i associades a mal pronòstic en el neuroblastoma. Les quatre línies cel·lulars en estudi van ser tractades amb 0.5 μM de TSA durant 24 h.

Per *Western blot* varem analitzar els nivells d'expressió dels factors de transcripció N-Myc, H-Twist i E2F-1 en les quatre línies cel·lulars. N-Myc i H-Twist són dues oncoproteïnes que cooperen en el desenvolupament del neuroblastoma, N-Myc promovent la proliferació cel·lular i H-Twist contrarestant les seves propietats pro-apoptòtiques mitjançant el bloqueig de la via ARF/p53 (Puisieux et al., 2006; Valsesia-Wittmann et al., 2004). E2F1 forma part de la família de proteïnes E2F que regulen el cicle cel·lular, controlant la transcripció coordinada d'un elevat nombre de gens involucrats en la transició de la fase G1 a la S (Ohtani et al., 1995), sent E2F1 un dels membres activadors de la transcripció (Johnson et al., 1993). E2F1 a més a més, ha estat implicat en la regulació de l'expressió de N-Myc en els neuroblastomes (Strieder and Lutz, 2003). El tractament amb TSA 0.5 μ M durant 24 hores produeix una marcada disminució en el nivell d'expressió de les proteïnes directament relacionades amb la capacitat proliferativa, E2F1 i N-Myc, aquesta darrera únicament en les tres línies cel·lulars que la sobreexpressen. L'efecte observat en l'oncoproteïna H-Twist, tot i ser menys acusat, també sembla correspondre a un descens en els seus nivells d'expressió (Figura 64D). Addicionalment E2F1 pot ser fosforilada per proteïnes cinasa que responen al dany a l'ADN, conduint aquesta fosforilació a l'acumulació d'E2F1 i a la inducció de l'apoptosi (Stevens and La Thangue, 2004). L'anàlisi dels nivells de fosforilació d'E2F1 no mostra però alteracions com a resposta a l'exposició a TSA.

El TSA induïx apoptosi en línies cel·lulars de neuroblastoma

L'efecte apoptòtic de diferents HDIs ha estat demostrat en línies cel·lulars de neuroblastoma humà (Coffey et al., 2000; Subramanian et al., 2005a). Per tal d'investigar una possible inducció d'apoptosi per TSA en les nostres cèl·lules, varem realitzar un assaig de tinció amb iodur de propidi. Els resultats obtinguts mostren que el percentatge de la població cel·lular en sub-G1, corresponent a cèl·lules apoptòtiques, incrementa a mesura que augmenta el temps d'exposició a TSA en les quatre línies cel·lulars. La preincubació amb l'inhibidor general de caspases zVAD.fmk reverteix completament la detecció del pic subdiploïd induït per aquest HDI (Figura 65A). Aquestes dades suggereixen que el TSA està induïnt una mort cel·lular dependent de caspases en tots els tipus de cèl·lules neuroblastòmiques (tipus N, I i S). En la línia SK-N-AS, on no s'observa una evident disminució de la viabilitat a les 24 hores de tractament amb la dosi de TSA emprada, 0.5 μ M, es van augmentar els temps d'incubació fins a les 72 hores. Els resultats mostren un augment progressiu de sub-G1 al llarg del temps, que també es reverteix totalment en presència de zVAD.fmk (Figura 65B).

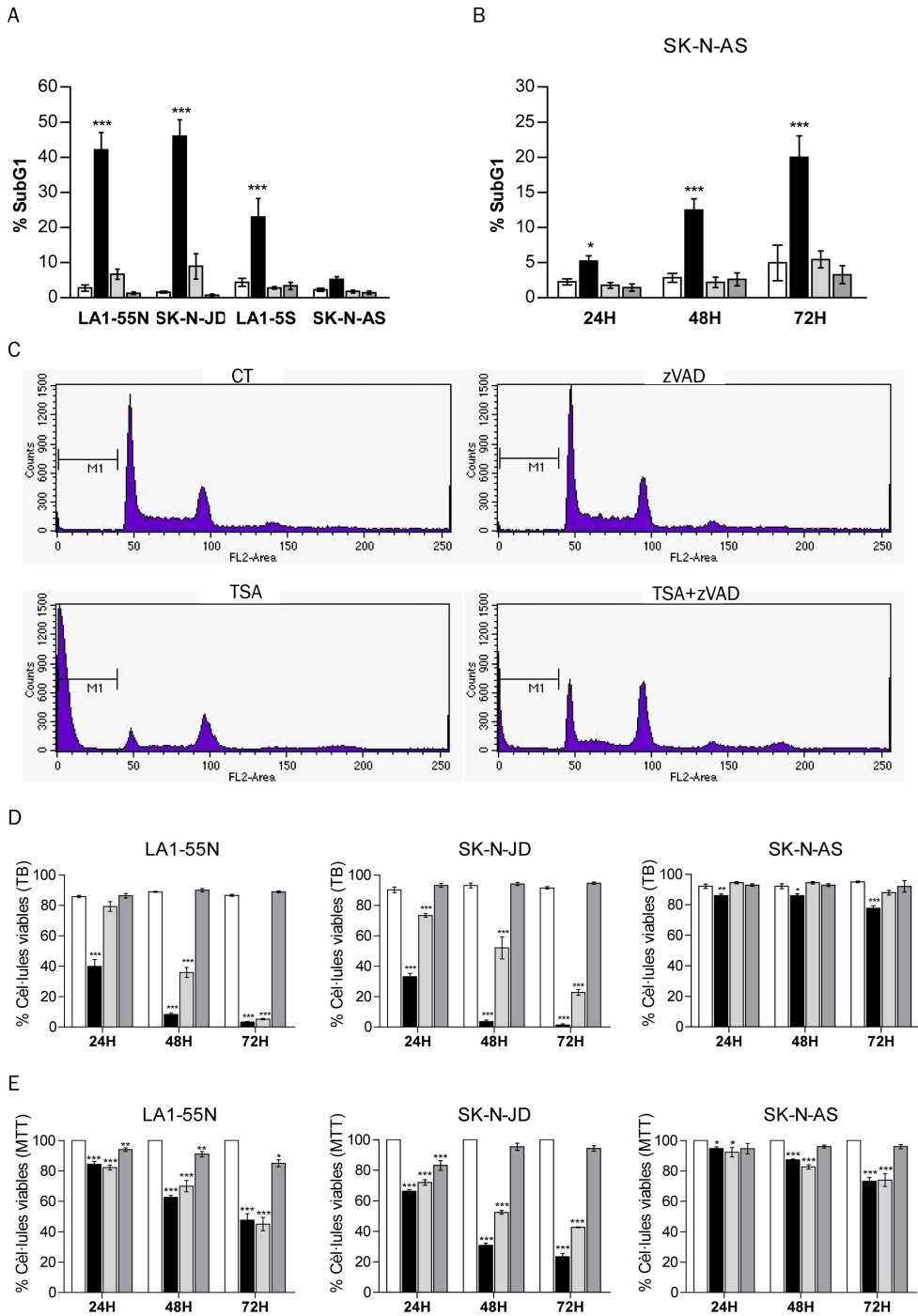


Figura 65. La tricostatina A induïx un increment en el nombre cèl·lules apoptòtiques.
A L'anàlisi de les cèl·lules apoptòtiques es va realitzar per citometria pel mètode de tinció amb iodur de propidi. Les cèl·lules de neuroblastoma van ser exposades a TSA 0.5 μ M durant 24 h. En tots els casos la preincubació de 1 h amb zVAD.fmk (100 μ M) es capaç de

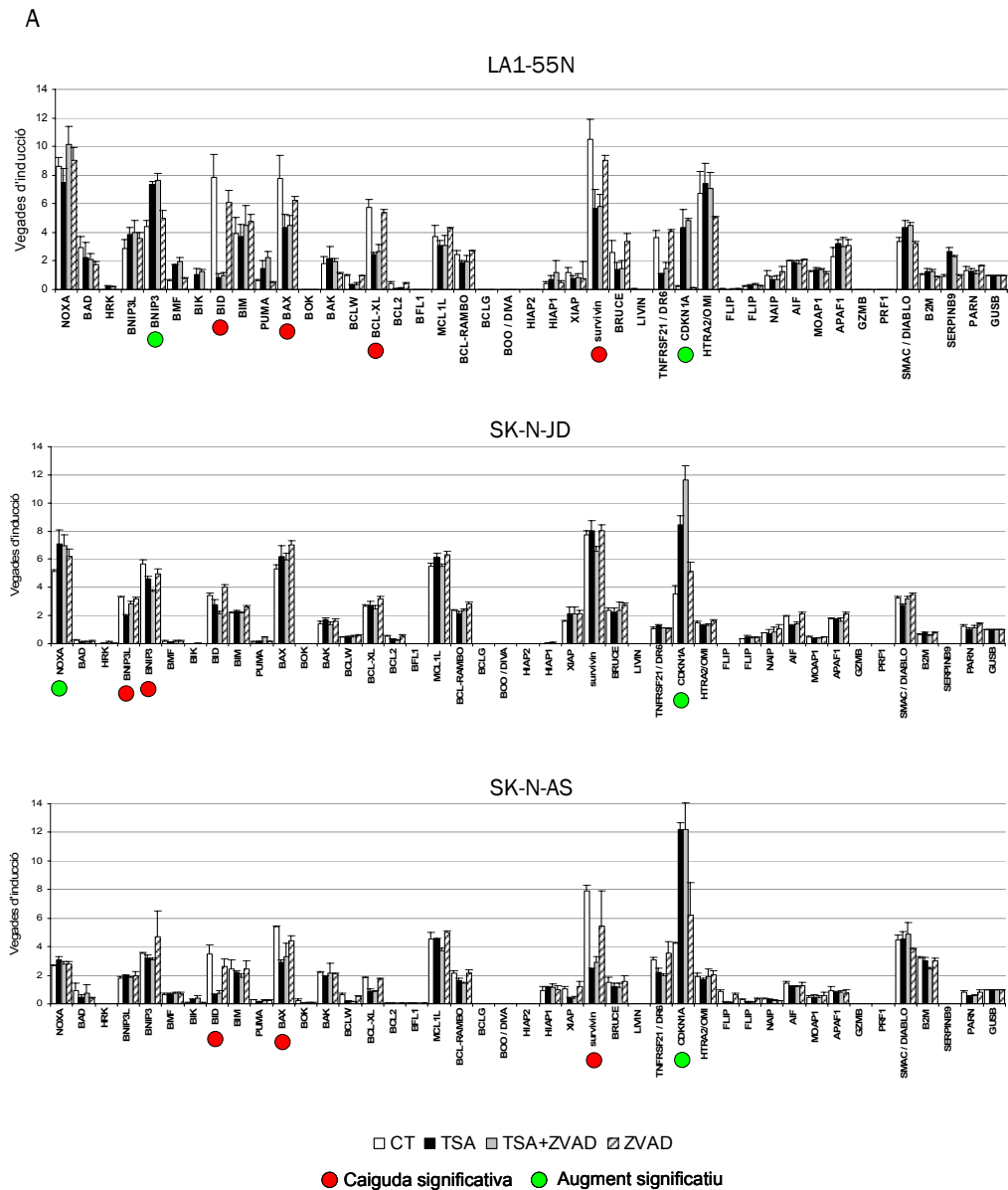
revertir l'efecte inductor d'apoptosi del TSA. **B** | Estudi al llarg del temps de l'efecte del TSA sobre la inducció d'apoptosi en les cèl·lules SK-N-AS i del tractament simultani amb zVAD.fmk. **C** | Es mostren de forma representativa els citogrames de la línia cel·lular SK-N-JD de l'experiment anterior, on s'evidencia la presència o absència del pic subdiploid (M1). **D** | Gràfiques de viabilitat de les línies de neuroblastoma LA1-55N, SK-N-JD i SK-N-AS front a TSA i zVAD.fmk durant diferents temps, mesurades pel mètode d'exclusió TB. **E** | Gràfiques de viabilitat de les línies de neuroblastoma LA1-55N, SK-N-JD i SK-N-AS front a TSA i zVAD.fmk durant diferents temps, mesurades per MTT. En els tots els casos els resultats són la mitja \pm S.E.M. d'un mínim de tres experiments. En l'apartat A l'estadística s'ha realitzat amb 2Way Anova+Bonferroni, per la resta Anova + Dunnett, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Una segona aproximació a l'efecte inductor d'apoptosi del TSA es va realitzar per assaig d'exclusió amb TB, també en absència o presència de zVAD.fmk. Els resultats obtinguts amb aquesta tècnica mostren que l'inhibidor general de caspases confereix una protecció únicament parcial front l'efecte citotòxic del TSA en les dues línies cel·lulars utilitzades sensibles al compost (Figura 65C). En les cèl·lules SK-N-JD la protecció de l'inhibidor general de caspases és manté constant fins a les 72 hores de tractament, protegint entre el 40 i el 50 % respecte les cèl·lules tractades únicament amb TSA. En les cèl·lules LA1-55N en canvi, la protecció del 35 % observada a les 24 hores disminueix gradualment a mesura que augmenta el temps d'incubació, essent inferior al 2 % a les 72 hores. Per últim en la línia SK-N-AS, el zVAD.fmk tampoc és capaç de recuperar totalment la lleu pèrdua de viabilitat induïda per l'HDI al temps 72 hores. Estudis de viabilitat abordats per MTT en les mateixes condicions corroboren aquests resultats, mostrant però aquest mètode una menor sensibilitat (Figura 65D).

Caracterització molecular de la mort cel·lular induïda per TSA

L'expressió de factors possiblement involucrats en el desencadenament de la mort cel·lular es va analitzar per RT-MLPA (tècnica explicada en detall en l'apartat de material i mètodes). Aquest procediment ens va permetre analitzar el patró d'expressió de 28 gens relacionats amb el desencadenament de la mort cel·lular, en condicions basals i després de 24 hores de tractament amb TSA 0.5 μ M, amb o sense preincubació amb zVAD.fmk (Figura 66A). Entre les modificacions observades destaquem els canvis en el perfil d'expressió de ARNm dels gens BID, SURVIVINA i CDKN1A, per presentar les alteracions més significatives i comuns entre els tres tipus de cèl·lules. El TSA disminueix dràsticament els nivells d'expressió del gen pro-apoptòtic BID tant en cèl·lules sensibles com en resistents al compost, sent reduït a valors propers al 10 % en les cèl·lules LA1-55N, i al voltant del 20 % en les SK-N-AS, no alterant-se aquests resultats al pretractar les cèl·lules amb zVAD.fmk. La línia cel·lular SK-N-JD presenta una disminució menys acusada en l'expressió d'aquest gen, amb valors propers al 80 % amb

TSA i al 60 % a l'afegir-hi zVAD.fmk. L'expressió del gen anti-apoptòtic SURVIVINA disminueix en les cèl·lules LA1-55N i SK-N-AS a nivells inferiors al 50%, tant en presència com en absència de zVAD.fmk, mentre que en les SK-N-JD el descens únicament és significatiu en la preincubació amb l'inhibidor general de caspases. Per últim el gen CDKN1A, que codifica per l'expressió de la proteïna p21^{Waf1/Cip1}, s'incrementa notablement en totes tres línies cel·lulars (Figura 66B).



B

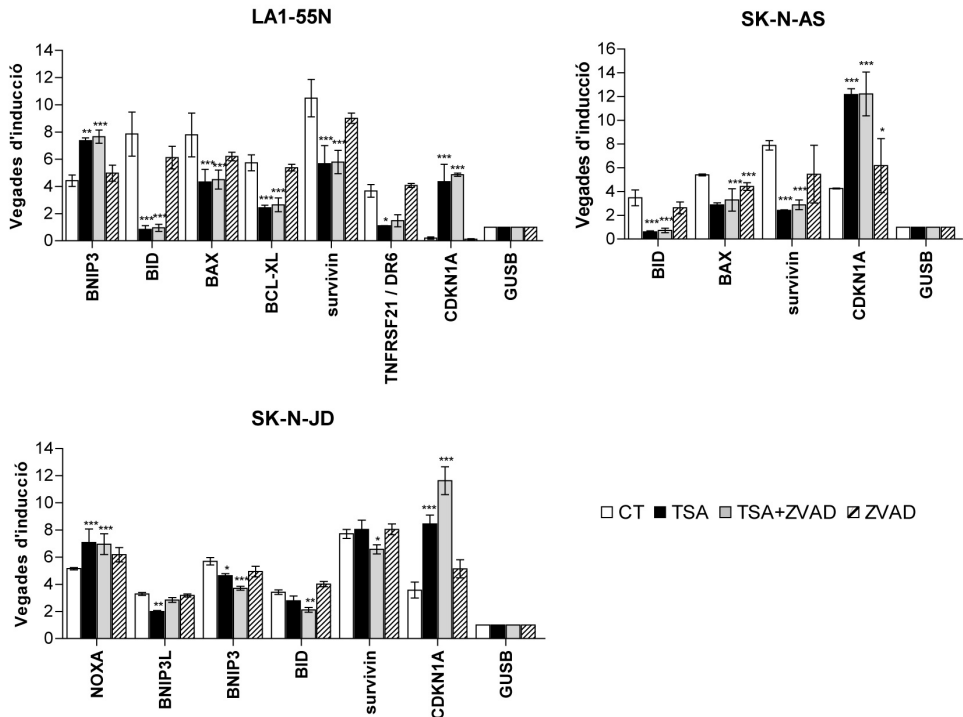


Figura 66. Perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi modificats pel tractament amb TSA. Les cèl·lules de neuroblastoma es van incubar durant 24 h amb TSA en presència o absència de l'inhibidor general de caspases zVAD.fmk (100 μ M). Les cèl·lules es van lisar i es va analitzar l'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi per RT-MLPA tal i com es descriu a l'apartat de Material i Mètodes. Els resultats es mostren com a vegades d'inducció vers les cèl·lules no tractades. Els nivells d'ARNm estan normalitzats per GUSB. **A** | Perfil d'expressió dels 28 gens relacionats amb l'apoptosi. Els cercles vermells i verds indiquen els gens que experimenten modificacions significatives. **B** | Gràfiques on es mostren els gens amb alteracions d'expressió significatives. Els resultats són la mitja \pm S.E.M de tres experiments independents. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (2WayAnova + Bonferroni)

Alguns d'aquests resultats van ser confirmats posteriorment a nivell d'expressió proteica per *Western Blot* (Figura 67). El tractament amb TSA 0.5 μ M durant 24 hores disminueix els nivells de les proteïnes *BH3-only* pro-apoptòtiques Bid, Puma, Bmf i Bnip3 en totes les cèl·lules. Una disminució que confirma els resultats obtinguts per RT-MLPA però que no explica la inducció de l'apoptosi desencadenada pel TSA, corroborada per la hidròlisi de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP). La proteïna anti-apoptòtica Survivina disminueix de forma més o menys

marcada en tots els casos, mentre l'expressió de la proteïna p21^{Waf1/Cip1} augmenta notablement en totes les cèl·lules a excepció de les SK-N-JD.

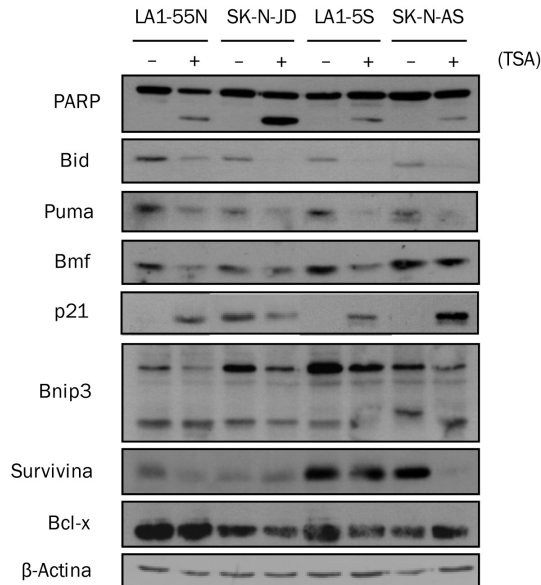


Figura 67. La tricostatina A altera els nivells d'expressió de proteïnes involucrades en el procés apoptòtic. Anàlisi de l'expressió proteica per *Western Blot* després d'haver tractat diferents línies cel·lulars de neuroblastoma durant 24 h amb TSA 0.5 µM.

Degut a que p21 és un dels efectors principals de la funció del supressor de tumors p53 com a resposta al dany a l'ADN (el-Deiry et al., 1993), varem voler comprovar en les mateixes condicions l'estat d'aquesta proteïna en les nostres línies cel·lulars. L'anàlisi per *Western blot* només ens va permetre detectar l'expressió proteica de p53 en una de les quatre línies estudiades, paradoxicament la SK-N-JD, l'única línia cel·lular on no veiem una clara inducció de p21 a nivell proteic (Figura 68). En aquestes cèl·lules p53 no mostra modificacions apreciables després del tractament amb TSA. L'estudi dels nivells de mdm2, un conegut inhibidor de p53, mostra una disminució dels seus nivells com a resultat a l'exposició a TSA en totes les cèl·lules, una disminució que no s'altera al preincubar les cèl·lules amb z-VAD.fmk.

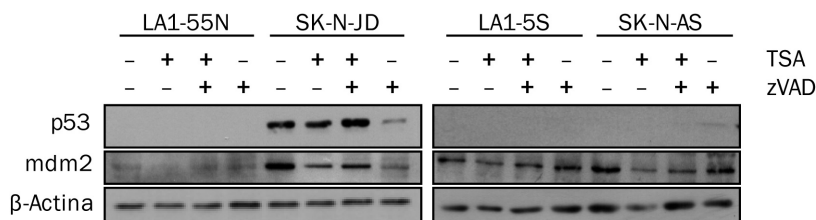


Figura 68. El TSA no sembla estar actuant sobre la proteïna supressora de tumors p53. Anàlisi de l'expressió proteica per *Western Blot* després d'haver tractat les diferents línies cel·lulars de neuroblastoma durant 24 h amb TSA 0.5 μ M, en presència o absència de z-VAD.fmk (100 μ M).

El TSA indueix autofàgia cel·lular

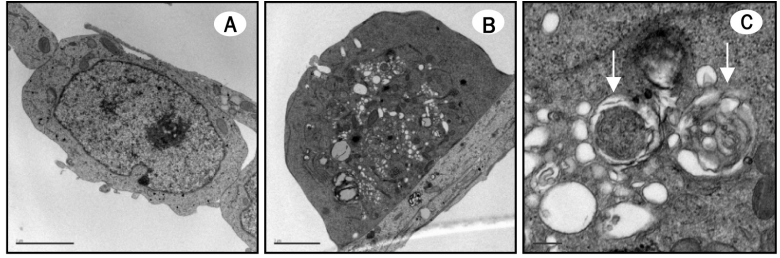
L'autofàgia és inicialment un mecanisme de supervivència cel·lular responsable de la degradació d'òrgànuls cel·lulars i proteïnes de vida mitja llarga mitjançant el seu encapsulament en vacuoles multimembrana que posteriorment es fusionen amb els lisosomes (Yorimitsu and Klionsky, 2005). Però també s'ha descrit que indueix un tipus de mort cel·lular alternativa a l'apoptosi, descrita com a mort cel·lular programada tipus II (Broker et al., 2005; Duprez et al., 2009). Els resultats prèviament exposats indiquen que l'apoptosi induïda per TSA no és l'únic mecanisme de mort responsable de la seva toxicitat, i l'autofàgia s'ha descrit que juga un paper en la mort cel·lular induïda per altres HDIs en diferents tipus de cèl·lules transformades (Hrzenjak et al., 2008; Shao et al., 2004; Watanabe et al., 2009). Per aquests motius varem avaluar la possible inducció d'autofàgia en les cèl·lules de neuroblastoma tractades amb aquest compost. La cerca de processos autofàgics ens va conduir a l'anàlisi de la morfologia ultraestructural per microscòpia electrònica. Les imatges obtingudes després del tractament amb TSA mostren diferències ultraestructurals compatibles amb processos de mort cel·lular dependents i independents de caspases (Figura 69). Les cèl·lules sense tractament mostren una morfologia normal, caracteritzada per una membrana plasmàtica amb un perfil ondulat, un gran nucli amb un o varis nuclèols i mitocondris tubulars amb crestes clarament delimitades. En les cèl·lules SK-N-AS a més a més observem un nombre particularment elevat de mitocondris, incusions compatibles amb cúmuls de glicogen, i la presència d'autofagosomes basals. Les cèl·lules exposades a TSA durant 24 hores mostren, junt amb la presència de cèl·lules necròtiques i apoptòtiques, la presència de cèl·lules clarament autofàgiques en les tres línies cel·lulars estudiades.

La morfologia indicativa d'apoptosi es caracteritza per condensació nuclear, fragmentació nuclear i vesiculació, mentre que la necrosi inclou l'inflament cel·lular i la ruptura de la membrana plasmàtica (Krysko et al., 2008). A més a més d'observar aquests dos tipus clàssics de mort cel·lular, en el tractament amb TSA varem observar nombroses cèl·lules amb una elevada densitat de grans vesícules amb inclusions en el seu interior que poden correspondre a diferents estadis d'evolució dels autofagolisosomes, i vacuoles autofàgiques o endosomes en diferents estadis de desenvolupament, amb un nucli i citoplasma molt electrodensos, un menor nombre de mitocondris i absència d'inflament cel·lular. La preincubació de les cèl·lules amb zVAD.fmk abans del tractament amb TSA, manté la presència de les mateixes característiques autofàgiques en totes tres línies cel·lulars, alhora que disminueix la presència de cèl·lules amb morfologia típicament apoptòtica. No observant-se diferències entre les cèl·lules sense tractar (CT) i les incubades únicament amb zVAD.fmk.

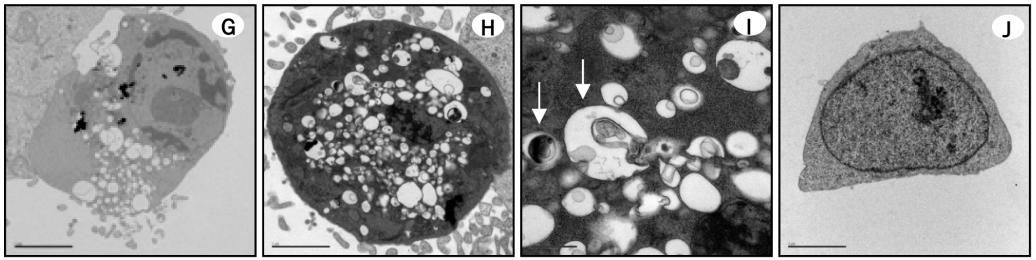
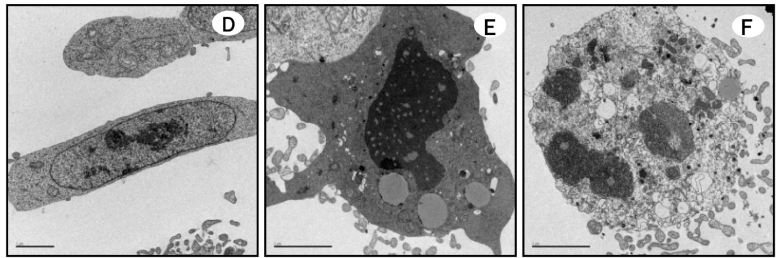
La magnificació de les imatges ens va permetre visualitzar vacuoles envoltades d'estructures de doble membrana, una morfologia típica de l'autofàgia, amb components citoplasmàtics en el seu interior, entre ells orgànuls cel·lulars.

Figura 69. Imatges de microscopia electrònica. Les cèl·lules van ser incubades durant 24 h sense cap compost, amb TSA 0.5 μ M, amb TSA 0.5 μ M + preincubació amb zVAD.fmk (100 μ M), o únicament amb zVAD.fmk (100 μ M). **A** | Cèl·lula LA1-55N sense tractar que mostra una morfologia normal. **B** | Cèl·lula LA1-55N autofàgica tractada amb TSA, caracteritzada per la presència de vacuoles autofàgiques. **C** | Ampliació del citoplasma de la imatge anterior on s'aprecien vacuoles de doble membrana que contenen orgànuls. **D** | Cèl·lula SK-N-JD sense tractar que mostra una morfologia normal. **E** | Cèl·lula SK-N-JD apoptòtica, tractada amb TSA. **F** | Cèl·lula SK-N-JD necròtica, tractada amb TSA. **G** | Cèl·lula SK-N-JD autofàgica, tractada amb TSA. **H** | Cèl·lula SK-N-JD autofàgica, tractada amb TSA+zVAD.fmk. **I** | Ampliació del citoplasma de la fotografia anterior on s'aprecien vacuoles de doble membrana que contenen orgànuls. **J** | Cèl·lula SK-N-JD tractada amb zVAD.fmk amb morfologia normal. **K** | Cèl·lules SK-N-AS sense tractar que mostren una morfologia normal. **L** | Ampliació del citoplasma de la cèl·lula anterior, on s'observa la presència d'un elevat nombre de mitocondris i autofagosomes basals. **M** | Ampliació del citoplasma d'una cèl·lula SK-N-AS sense tractament amb granulacions de glicogen. **N** | Cèl·lula SK-N-AS autofàgica, tractada amb TSA. **O** | Ampliació del citoplasma de la imatge anterior on s'observen vacuoles autofàgiques en diferents estadis de desenvolupament. **P** | Cèl·lula SK-N-AS autofàgica, tractada amb TSA+zVAD.fmk. **Q** | Cèl·lules SK-N-AS tractades amb zVAD.fmk de morfologia normal. La barra d'escala indica 2 μ m, excepte en les imatges magnificades on és 1 μ m. Les fletxes blanques senyalitzen de forma representativa algunes de les vacuoles autofàgiques, les negres les granulacions de glicogen, i la lletra M alguns dels mitocondris presents en les imatges.

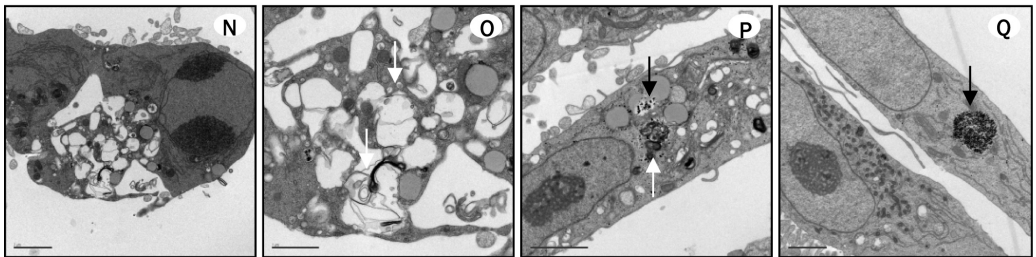
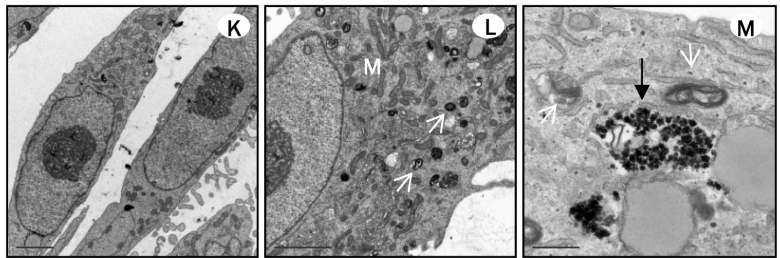
LA1-55N



SK-N-JD



SK-N-AS



Posteriorment varem analitzar la presència de marcadors autofàgics en lisats proteics de cèl·lules tractades en les mateixes condicions. La conversió de la forma lliure de LC3 (LC3-I) a la seva forma conjugada amb fosfatidiletanolamina (LC3-II), capaç d'unir-se als fosfolípids de membrana dels autofagosomes, ens va confirmar l'activació del procés autofàgic (Noda et al., 2009). El bloqueig de l'apoptosi amb zVAD.fmk augmenta notablement l'expressió proteica de LC3-II en presència de TSA (Figura 70), suggerint que la inhibició de les caspases podria estar potenciant l'autofàgia.

L'anàlisi d'altres factors involucrats en el procés d'autofàgia, com la Beclina, i les formes no conjugades d'Atg5 i Atg12, no mostra modificacions significatives en resposta al tractament amb TSA, ni a la inhibició de l'activació de les caspases, però evidència que es troben en concentracions suficients en la cèl·lula com per a ser considerades constitutives.

La proteòlisi dels factors indicadors d'apoptosi, PARP, caspasa 3 i Bid, i la protecció front aquest efecte per el pretractament amb zVAD.fmk, confirmen l'activació d'aquest procés de mort cel·lular

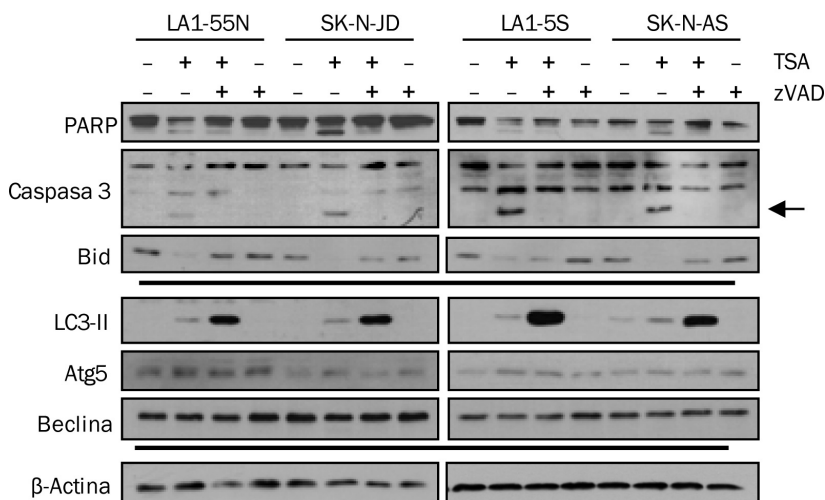


Figura 70. La tricostatina A activa tant indicadors d'apoptosi com d'autofàgia. Anàlisi de l'expressió de proteïnes involucrades en processos de mort cel·lular programada després del tractament de les cèl·lules de neuroblastoma SK-N-JD (tipus I, fenotip més agressiu) i les SK-N-AS (tipus S, fenotip més benigne) amb TSA 0.5 μM durant 24 h. Les condicions amb zVAD.fmk (100 μM) s'han preincubat durant 1 h amb aquest compost abans d'iniciar el tractament amb TSA.

Posteriorment varem realitzar un estudi al llarg del temps de l'expressió de factors indicadors d'apoptosi (PARP, caspasa 3, caspasa 8 i Bid) i de factors indicadors d'autofàgia (LC3, Atg 5, Atg 12 i Beclina) en les línies SK-N-JD i SK-N-AS, respectivament les més sensibles i les més resistents a TSA (Figura 71). Els resultats suggereix que ambdós processos semblen estar iniciant-se simultàniament en les SK-N-JD, a partir de les 12 hores de tractament. En les cèl·lules SK-N-AS en canvi, observem la presència de LC3-II ja a les 8 hores de tractament, mentre l'activació de la caspasa 3 i la proteòlisi de PARP no es produeixen fins a les 24 hores.

L'apoptosi sembla estar desencadenant-se per mecanismes intrínsecs, tal i com indica la proteòlisi de la pro-caspasa 3, però la implicació de la via extrínseca no pot ésser descartada, degut a l'augment observat de la forma fragmentada de la caspasa 8, especialment en la línia cel·lular SK-N-AS (Figura 71). Així doncs, en la disminució de l'expressió de Bid podria estar participant tant una disminució a nivell transcripcional, tal i com hem observat per RT-MLPA, com la seva hidròlisi per l'activació de la caspasa 8 o d'alguna altre proteasa.

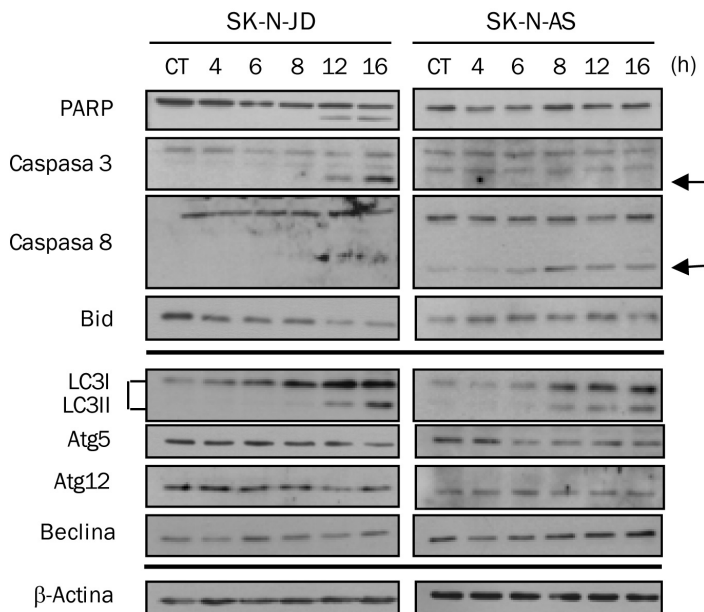


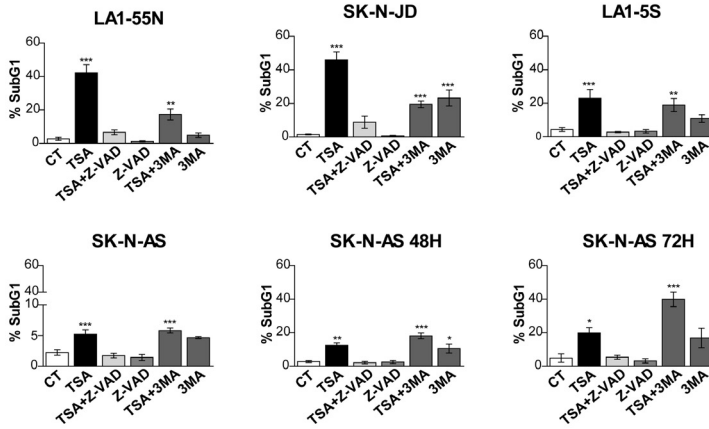
Figura 71. Els processos d'apoptosi i autofàgia s'indueixen quasi simultàniament en el temps en cèl·lules de neuroblastoma tractades amb tricotatina A. Anàlisi per *Western blot*, dels nivells de proteïnes involucrades en processos de mort cel·lular al llarg del temps, en les cèl·lules SK-N-JD (tipus I, fenotip més agressiu) i les SK-N-AS (tipus S, fenotip més benigne).

L'activació de l'autofàgia induïda pel TSA no té la mateixa finalitat en totes les cèl·lules de neuroblastoma

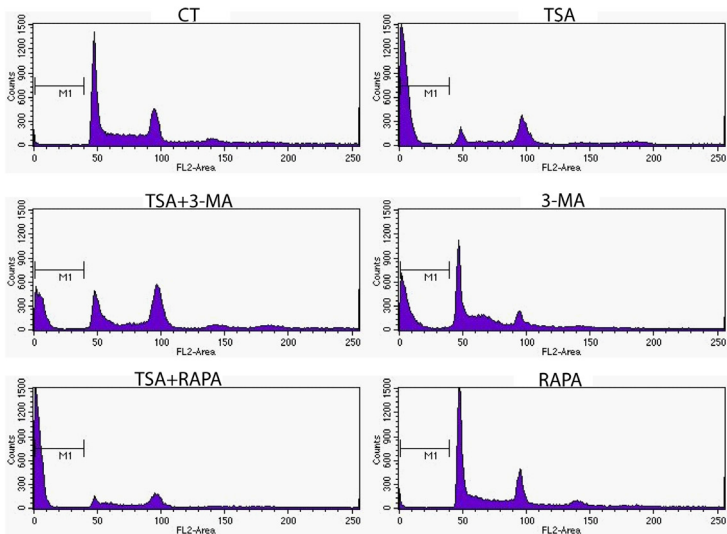
Tal i com hem esmentat abans, la funció de l'autofàgia podria definir-se com a paradoxal, podent servir tant per a protegir les cèl·lules com per a contribuir al dany cel·lular (Corcelle et al., 2009; Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009). Per tal d'avaluar el paper de l'autofàgia desencadenada pel TSA en les nostres cèl·lules, varem decidir bloquejar l'apoptosi amb 3-metiladenina (3-MA), un compost que és considerat com un inhibidor de l'autofàgia per ser capaç d'inhibir la formació de vacuoles autofàgiques. El tractament simultani de les cèl·lules amb TSA i 3-MA, reverteix notablement l'increment del pic subdiploïd induït pel TSA en les cèl·lules LA1-55N i SK-N-JD, i en menor proporció en les LA1-5S (Figura 72A). En les cèl·lules SK-N-AS en canvi, incrementa lenta però significativament la incidència d'apoptosi, tal i com indica l'augment progressiu del pic subdiploïd al llarg del temps. La dosi de 3-MA emprada esdevé tòxica per si sola en les cèl·lules SK-N-JD, però no en les altres cèl·lules. En aquest experiment varem incloure també una condició tractada amb el compost rapamicina (RAPA), un conegut inhibidor de la funció de mTOR i inductor de l'autofàgia (Takeuchi et al., 2005). Els resultats mostren que la inducció del procés autofàgic no produeix per si sol un increment del pic subdiploïd. No obstant, resultats preliminars realitzats amb la línia cel·lular SK-N-JD semblen indicar que la combinació de RAPA amb TSA estaria potenciant la mort cel·lular induïda per aquest darrer, tal i com mostra l'augment del pic subdiploïd (Figura 72B). Aquests resultats suggereixen que l'autofàgia, al menys en aquestes cèl·lules estaria jugant un paper en la mort cel·lular.

L'anàlisi de la viabilitat cel·lular pel mètode d'exclusió amb TB a diferents temps, confirma una marcada disminució de la mort cel·lular a les 24 hores de tractament en les cèl·lules LA1-55N i SK-N-JD (Figura 72D). A temps més llargs però, la 3-MA no mostra cap efecte protector. En les cèl·lules SK-N-AS la inhibició de l'autofàgia potencia l'efecte induït pel TSA, especialment a les 72 hores. Confirmant els resultats observats per citometria de flux. Aquests resultats semblen indicar que l'increment de l'autofàgia detectat en les cèl·lules SK-N-AS possiblement tingui un propòsit diferent que en la resta de línies estudiades, jugant un paper més aviat decantat cap a la supervivència cel·lular, que no pas cap a la mort (Figura 72C).

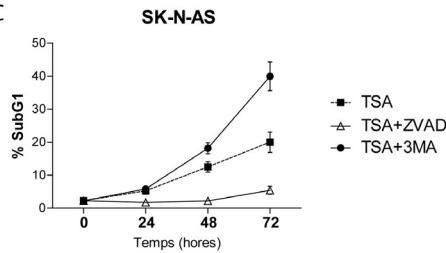
A



B



C



D

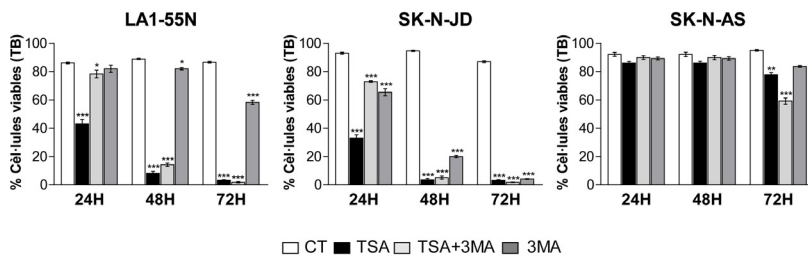


Figura 72. El patró de resposta cel·lular front al tractament amb 3-metiladenina, sola o en combinació amb tricostatina A, no és uniforme en les cèl·lules de neuroblastoma.
A | Anàlisi del percentatge de la població en fase SubG1 (indicatiu d'apoptosi) en les cèl·lules de neuroblastoma després de 24 h de incubació amb TSA (0.5 μ M), sol o en combinació amb zVAD (100 nM) o 3-MA (100 μ M). En el cas de les SK-N-AS l'estudi es va prolongar a les 48 i 72 h. **B** | Es mostren de forma representativa els citogrames de la línia cel·lular SK-N-JD de l'experiment anterior, on s'evidencia la presència o absència del pic subdiploid (M1). També es mostren resultats preliminars de la combinació de TSA amb RAPA. **C** | Gràfica on es comparen les poblacions en SubG1 de la línia cel·lular SK-N-AS després del tractament amb TSA sol, o en combinació amb zVAD o 3-MA durant diferents temps. **D** | Gràfiques de viabilitat de les línies de neuroblastoma LA1-55N, SK-N-JD i SK-N-AS front a TSA i zVAD.fmk durant diferents temps, mesurades pel mètode d'exclusió TB. Els resultats són la mitja \pm S.E.M de tres experiments independents. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (2WayAnova + Bonferroni).

El HDI TSA induïx un retard en la transició G2/M en cèl·lules de neuroblastoma

L'efecte del TSA en el cicle cel·lular de les cèl·lules de neuroblastoma es va mesurar per anàlisi de citometria de flux. Per a aquest fi les quatre línies cel·lulars es van exposar a TSA 0.5 μ M durant 24 hores, allargant els temps d'incubació fins les 48 i les 72 hores únicament en les cèl·lules SK-N-AS.

En totes les línies cel·lulars el tractament amb TSA induïx una acumulació de cèl·lules amb contingut d'ADN 4n, indicant una aturada del cicle cel·lular en la fase G2/M en tots els tipus de cèl·lules neuroblàstiques (N, I i S) i independentment de la sensibilitat de les cèl·lules al compost (Figura 73). Els efectes en el resta de fases del cicle cel·lular són variables, depenent de la línia cel·lular. En dues de les línies cel·lulars testades, les SK-N-AS i les SK-N-JD, aquest increment es correlaciona amb una disminució del nombre de cèl·lules en la fase S. En les LA1-55N és la població en fase G0/G1 la que resulta minvada, mentre que una disminució equitativa de les fases S i G0/G1 s'observa en les cèl·lules LA1-55N. La preincubació amb el inhibidor general de caspases zVAD.fmk no reverteix aquesta aturada en cap de les línies cel·lulars, indicant que l'aturada del cicle cel·lular en la fase G2/M induïda per TSA és independent de caspases. El tractament simultani de TSA amb l'inhibidor de l'autofàgia 3-MA, bloqueja només en les cèl·lules LA1-55N l'aturada del cicle cel·lular en G2/M, indicant una possible participació de l'autofàgia en el bloqueig del cicle cel·lular en aquestes cèl·lules. El 3-MA per si sol no induïx alteracions en les fases del cicle cel·lular en cap de les línies cel·lulars estudiades. L'augment del flux autofàgic induït pel compost RAPA, pràcticament tampoc modifica el cicle cel·lular, observant-se només lleus modificacions de les fases G0/G1 o S en algunes de les línies estudiades, però en cap cas en la fase G2/M.

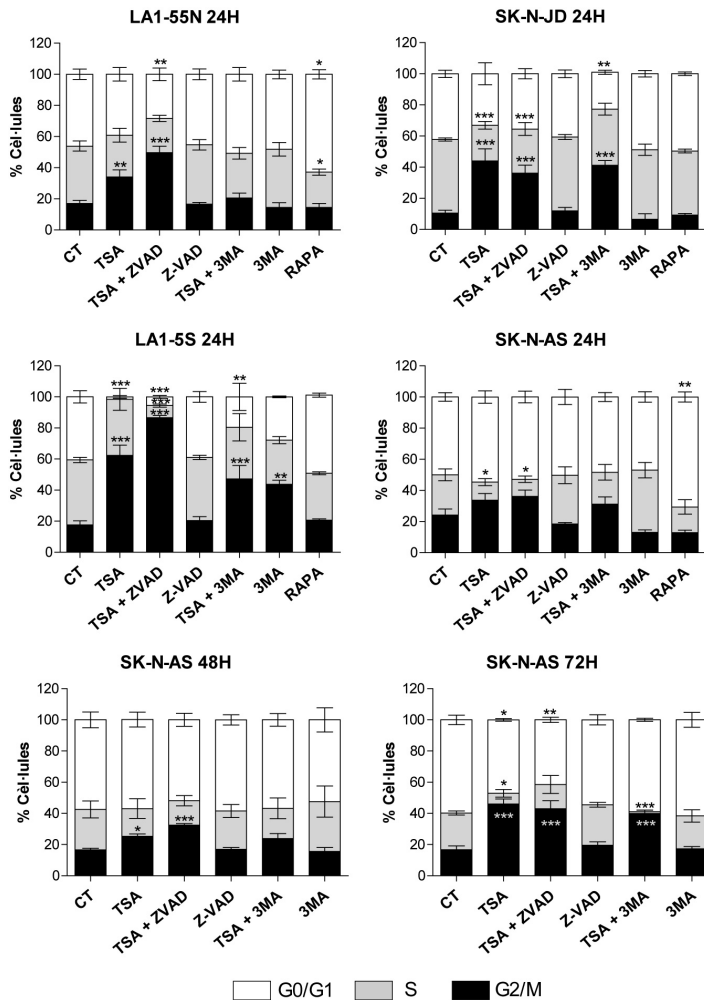


Figura 73. La tricostatina A indueix aturada del cicle cel·lular en G2/M. Anàlisi per citometria de flux de la distribució de les fases del cicle cel·lular de les cèl·lules LA1-55N, SK-N-JD, LA1-5S i SK-N-AS incubades durant 24 h en presència o absència del inhibidor general de caspases zVAD.fmk (100 μ M), o del inhibidor d'autofàgia 3-MA (10 mM). En el cas de les cèl·lules SK-N-AS es va realitzar un anàlisi també a temps més llargs, 48 i 72 h. Els resultats són la mitja \pm S.E.M de tres experiments independents. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (2WayAnova + Bonferroni).

Activació de la via supressora de tumors del RB

Nivells elevats de les proteïnes E2F1, N-Myc i Survivina en els neuroblastomes són indicatius de mal pronòstic (Ito et al., 2005; Oberthuer et al., 2005), estant totes tres proteïnes implicades en el procés de proliferació cel·lular. Els resultats exposats fins al moment ens indiquen que el TSA indueix una caiguda en els nivells d'expressió de N-Myc en les tres línies cel·lulars que

l'expressen, d'E2F1 en les quatre línies, i de Survivina en totes les cèl·lules a excepció de les SK-N-JD. A la vegada indueix un increment de la concentració de p21^{Waf1/Cip1}, una proteïna també involucrada en el creixement cel·lular, en totes elles a excepció també de les SK-N-JD. Degut a que l'activitat d'E2F-1 està controlada per la proteïna supressora de tumors retinoblastoma (pRB), l'efecte del TSA també s'ha estudiat sobre aquesta proteïna. Es sap que la pRb hipofosforilada reprimeix l'activitat d'E2F1 unint-se al seu domini de transactivació, restringint així la progressió pel cycle cel·lular (Weinberg, 1995). A més a més estudis recents semblen indicar que la pRb podria estar associant-se a una gran varietat de factors de transcripció i enzims remodeladors de la cromatina per a controlar l'expressió gènica (Macaluso et al., 2007).

El nostres resultats mostren que el TSA disminueix, en major o menor grau depenent de la línia cel·lular, els nivells de la proteïna pRB hiperfosforilada, alhora que incrementa els de la forma activa hipofosforilada en totes les cèl·lules de neuroblastoma (Figura 74). La preincubació amb zVAD.fmk indueix especialment en les línies LA1-55N i SK-N-JD, l'aparició d'un banda corresponent a un estadi intermedi de fosforilació de la proteïna.

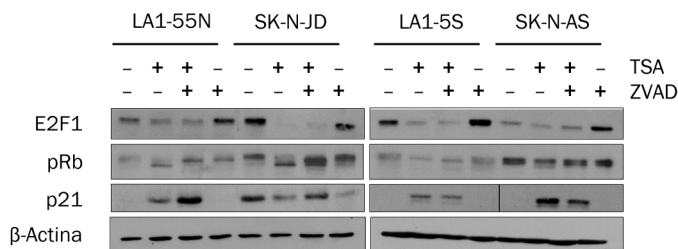


Figura 74. El tractament amb tricostatina A modifica l'expressió endògena de proteïnes involucrades en la regulació de la proliferació cel·lular. Anàlisi per *Western Blot*, dels nivells d'expressió de proteïnes relacionades amb la progressió pel cycle cel·lular en cèl·lules de neuroblastoma, després de ser incubades durant 24 h amb TSA 0.5 μM, en presència o absència de l'inhibidor general de caspases zVAD.fmk (100 μM).

Afectació de la viabilitat cel·lular per altres HDIs

Per últim varem voler comparar l'efecte del TSA sobre la viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma amb la d'altres HDIs. Amb aquesta finalitat varem utilitzar dos compostos pertanyents també a la classe estructural dels àcids hidroxàmics: el vorinostat (SAHA), que com

el TSA és considerat un inhibidor general de les HDACs, i que fins al moment és l'únic HDI que ha estat aprovat per la *US Food and Drug Administration* amb indicació oncològica (Marks, 2007), i l'àcid m-carboxicinàmic bis-hidroxiàmid (CBHA), un compost polar híbrid de síntesi pel qual encara no s'han descrit dianes HDAC específiques (Coffey et al., 2000; Glick et al., 1999). L'anàlisi per MTT mostra un perfil d'afectació de la viabilitat molt similar per als tres compostos en les diferents cèl·lules, resultant ser la línia SK-N-AS la més resistent front a l'acció dels HDIs, i la SK-N-JD la més sensible (Figura 75A).

L'estudi de la viabilitat cel·lular al llarg del temps (24, 48 i 72 hores) de les tres línies cel·lulars exposades a SAHA 2 μ M, amb i sense preincubació amb zVAD.fmk, no mostren protecció alguna de l'inhibidor general de caspases (Figura 75B). Resultats que semblen suggerir que SAHA podria estar induint l'activació de programes de mort cel·lular alternatius a l'apoptosi.

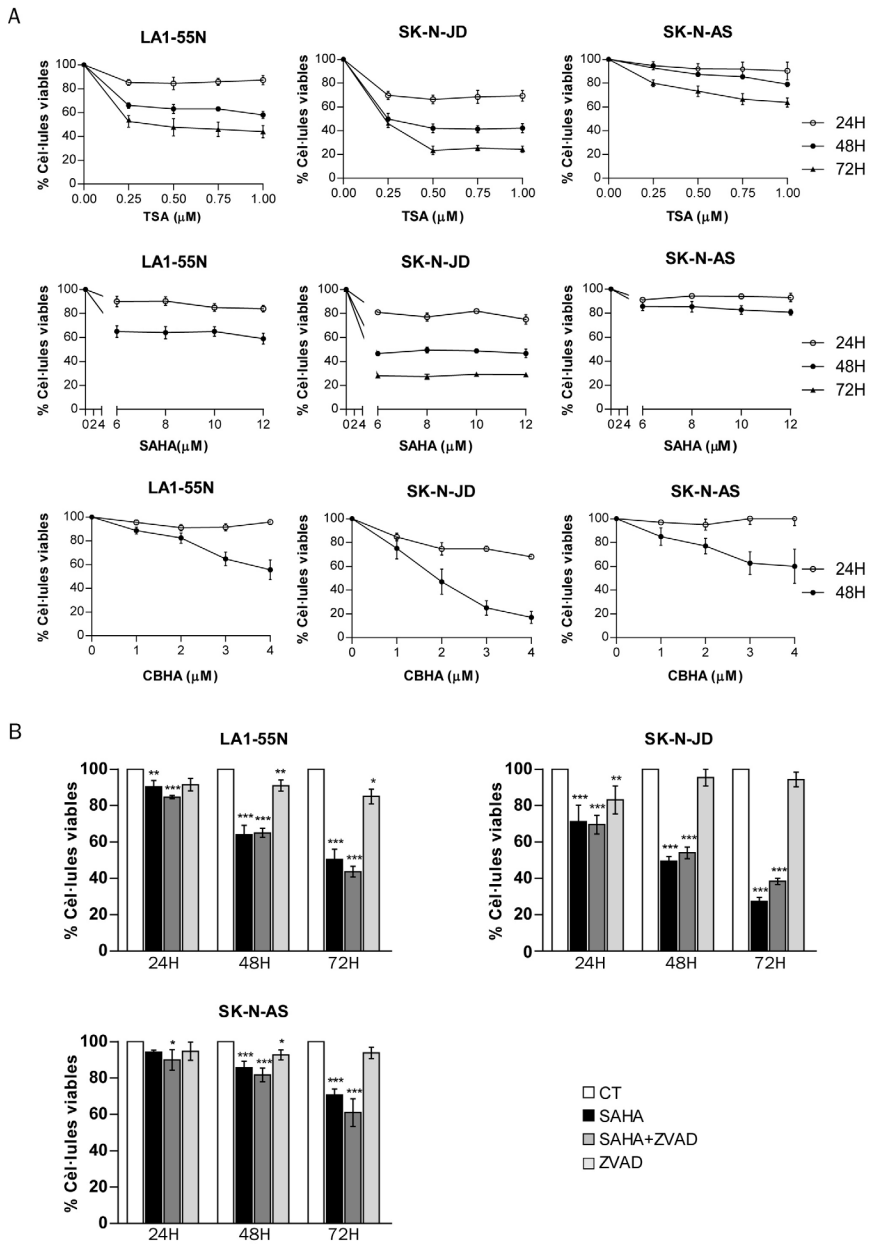


Figura 75. Perfils de viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma front a TSA, SAHA i CBHA.

A | Les cèl·lules de neuroblastoma es van tractar durant diferents temps amb les dosis de TSA, SAHA i CBHA indicades. El número de cèl·lules viables es va determinar per MTT. Els resultats de les corbes dosi resposta representen el número de cèl·lules viables tractades en comparació amb els controls (100%). **B** | Les cèl·lules de neuroblastoma van ser exposades a SAHA 2 μ M durant 25,48 i 72 h. En cap dels casos la preincubació d'1 h amb zVAD.fmk (100 μ M) és capaç de revertir la pèrdua de viabilitat induïda per SAHA. En ambdós casos els resultats són la mitja \pm S.E.M de tres experiments independents. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (2WayAnova + Bonferroni).

Discussió

L'eficàcia del TSA com a inhibidor d'histona desacetilases (HDI) s'ha comprovat mitjançant l'anàlisi dels nivells d'acetilació de les histones. L'exposició a TSA augmenta notablement l'acetilació de les histones H3 i H4 en totes les línies cel·lulars estudiades a les 24 hores de tractament amb la dosi 0.5 μ M, la concentració majoritàriament emprada al llarg de tot l'estudi.

L'estimació de la viabilitat cel·lular per MTT i TB mostra que la inhibició de l'acetilació resultant de l'exposició a TSA, va acompanyada d'una pèrdua de la viabilitat dosi i temps dependent. La línia cel·lular tipus S SK-N-AS ha resultat ser la menys sensible de les quatre estudiades, requerint dosis o temps força més llargs de tractament que les altres per a reflectir afectació de la viabilitat cel·lular. Tot i així es va optar per utilitzar la mateixa concentració per a totes les línies cel·lulars, per tal de poder realitzar així un estudi comparatiu dels efectes del TSA en els diferents tipus de cèl·lules d'aquest model experimental.

L'anàlisi per RT-MLPA de l'expressió de 28 gens relacionats amb l'apoptosi mostra modificacions en els nivells d'ARNm de varis d'aquests gens, la majoria d'elles per disminució de l'expressió. No obstant són poques les alteracions significatives comuns en les tres línies cel·lulars estudiades. L'expressió del gen CDKN1A que codifica per l'expressió de la proteïna p21^{Waf1/Cip1} s'incrementa notablement en totes tres línies cel·lulars, mentre el gen antiapoptòtic SURVIVINA i el proapoptòtic BID disminueixen de forma rellevant. Aquests resultats no es reverteixen a l'inhibir l'apoptosi amb z-VAD.fmk. L'augment de p21^{Waf1/Cip1} i la disminució de Survivina són dues modificacions àmpliament descrites després del tractament amb HDIs en diversos tipus de cèl·lules transformades (Marks and Xu, 2009), inclòs les de neuroblastoma (Witt et al., 2009a), i s'han relacionat amb la capacitat d'aquests compostos d'induir una disminució de la viabilitat i de la proliferació cel·lular.

Els HDIs indueixen aturada del cicle cel·lular tant en cèl·lules transformades com en cèl·lules normals (Xu et al., 2007). Concentracions baixes d'aquests compostos s'ha descrit que indueixen predominantment una aturada en G1, mentre concentracions elevades poden induir-la tant en G1 com en G2/M (Ouweland et al., 2005; Xu et al., 2007). Els resultats d'aquest treball, a diferència dels obtinguts en un estudi previ on s'indicava que l'HDI BL1521 induïa una aturada del cicle cel·lular en la fase G1 en cèl·lules de neuroblastoma (Ouweland et al., 2005), mostren una clara aturada en la fase G2/M en totes les cèl·lules estudiades. Aquesta aturada és independent de la sensibilitat d'aquestes cèl·lules al compost i de l'expressió de l'oncogen N-

Myc, i s'indueix tant en les cèl·lules tipus N, I com S. No obstant, degut a que les cèl·lules SK-N-AS tenen una menor velocitat de proliferació, només hem observat una clara aturada en G2/M en aquestes cèl·lules després de la incubació amb TSA a temps més llargs. No hem trobat una correlació entre, l'augment del nombre de cèl·lules en G2/M i la reducció de la fase G0/G1 o S, comú a les quatre línies cel·lulars. L'aturada en G2/M és en tots els casos independent de la inducció de les caspases, no podent ser revertida amb la preincubació amb z-VAD.fmk. Aquests resultats estant en concordança amb els descrits en una publicació recent amb cèl·lules de neuroblastoma tractades amb TSA, SAHA o NaB (Muhlethaler-Mottet et al., 2008). El bloqueig del procés autofàgic amb 3-MA tampoc modifica l'aturada en G2/M induïda pel TSA en tres de les quatre línies cel·lulars estudiades, només sent capaç de revertir en part aquest bloqueig en les cèl·lules LA1-55N. Resultats que suggereixen que l'autofàgia podria estar jugant, al menys en alguns casos, un paper important en la inducció de l'aturada del cicle cel·lular.

L'increment dels inhibidors de ciclines dependents de cinases (CDKs) i la disminució de ciclines induïda pels HDIs, podrien ser la causa de la poca activitat de les CDKs i causar l'aturada en G1 i G2 (Bolden et al., 2006; Marks and Xu, 2009). L' inhibidor de CDKs p21^{Waf1/Cip1} és un dels gens més comunament induïts pels HDIs (Bolden et al., 2006; Marks and Xu, 2009), i és un dels efectors principals de la funció del supressor de tumors p53 com a resposta al dany a l'ADN (el-Deiry et al., 1993), no obstant, la seva inducció pels HDIs s'ha descrit com a independent de la via de p53 en la majoria de cèl·lules transformades (Marks and Xu, 2009; Ocker and Schneider-Stock, 2007). L'augment de p21^{Waf1/Cip1} s'associa a l'habilitat d'aquests compostos d'induir alteracions en proteïnes relacionades amb el promotor d'aquest gen. En aquest sentit, fins ara s'ha descrit que correlaciona amb un augment de l'acetilació d'algunes de les lisines de les cues de les histones H3 i H4, amb una marcada disminució de l'HDAC1 i l'HDAC3 (ambdues implicades en la repressió dels dominis Sp1 del promotor de p21^{Waf1/Cip1}), amb la disminució de l'expressió de Myc, i amb la disminució del reclutament de la RNA polimerasa II (Gui et al., 2004; Ocker and Schneider-Stock, 2007). Els HDIs també poden contribuir al descens en l'expressió de la ciclina D1 i la ciclina A, contribuint així al bloqueig en G1 i G2, respectivament (Marks and Xu, 2009). L'inhibidor de CDKs p27, s'indueix també en alguns tipus de cèl·lules tumorals (Marks and Xu, 2009).

Una de les característiques descrites de l'acció dels HDIs en els neuroblastomes també és l'augment de l'expressió de **p21^{Waf1/Cip1}** (Coffey et al., 2000; Condorelli et al., 2008; de Ruijter et al., 2004; Jaboin et al., 2002; Wang et al., 2002). Tot i que s'ha observat que p21^{Waf1/Cip1} és disfuncional en algunes línies cel·lulars de neuroblastoma, l'augment de l'expressió de p21^{Waf1/Cip1} es considera que pot ser encara en part responsable de l'aturada produïda en G2/M ((McKenzie et al., 2003; Witt et al., 2009b). En tres de les quatre línies cel·lulars de

neuroblastoma estudiades en aquest treball observem un augment significatiu dels nivells proteics de p21^{Waf1/Cip1}. Aquesta inducció es produeix tant en cèl·lules tipus N com S, sent només les tipus I SK-N-JD les que presenten un comportament diferent, no observant-se un increment proteic de p21^{Waf1/Cip1} tot i l'augment observat en els seus nivells de mRNA. Fins al moment els estudis publicats respecte la possible correlació entre l'augment de p21^{Waf1/Cip1} i p53 en cèl·lules de neuroblastoma són contradictoris. El tractament amb l'HDI MS-27-275A induïx un augment de l'expressió de p21^{Waf1/Cip1} independent de l'estat de p53 (Jaboin et al., 2002), mentre el tractament amb els compostos butirat i àcid valproic (VPA) sí induïx p53, correlacionant aquest augment amb la inducció de l'expressió de p21^{Waf1/Cip1} (Condorelli et al., 2008). En el nostre cas, estudis realitzats per altres membres del nostre laboratori han mostrat una baixa expressió de p53 en les cèl·lules de neuroblastoma emprades. Nosaltres hem pogut comprovar l'expressió de p53 per *Western blot* només en la línia cel·lular SK-N-JD. Addicionalment, l'exposició a TSA no ha induït augments en els nivells d'ARNm de NOXA ni PUMA en les cèl·lules tipus N i S, dos gens normalment transactivats per p53. Només hem observat un augment significatiu en els nivells d'ARNm de NOXA en les cèl·lules tipus I, les úniques que expressen p53, però també les úniques que no sobreexpressen p21^{Waf1/Cip1}. És més, els nivells proteics de Puma disminueixen en resposta a TSA en les quatre línies cel·lulars estudiades. Així doncs, nosaltres no hem observat evidències clares per a un paper de p53 per sobre de la inducció de p21^{Waf1/Cip1} en l'apoptosi induïda per TSA.

p21^{Waf1/Cip1} ha estat descrit com a inductor de la via supressora de tumors del retinoblastoma (el-Deiry et al., 1993). La **proteïna del retinoblastoma pRB** regula la proliferació i la supervivència modulant l'activitat dels factors de transcripció E2F (Sherr and McCormick, 2002). Yu i col·laboradors van descriure al 2005 la ruta oncogènica pRb/E2F1 com a diana dels HDIs TSA i SAHA (Zhao et al., 2005). Quan la pRB es troba hipofosforilada s'uneix i segresta els factors de transcripció E2F, resultant en la repressió de gens associats amb la proliferació. La inactivació de la pRB resulta en un increment de l'activitat d'E2F1 i la consegüent transactivació de gens necessaris per a la progressió pel cicle cel·lular, conduint a una proliferació cel·lular aberrant (Ahlander and Bosco, 2009). La inactivació de la pRB pot succeir en molts tipus de tumors degut a alteracions d'altres components de la maquinària de regulació, com per exemple la sobreexpressió de CDK4. La sobreexpressió d'E2F1 també s'ha observat en varis tipus de tumors humans. Per aquests motius la disrupció de la funcionalitat normal de pRB/E2F és una de les alteracions més freqüents en la transformació maligna (Lapenna and Giordano, 2009; Sherr and McCormick, 2002). En el present treball el tractament de les cèl·lules de neuroblastoma amb TSA ha induït en totes les línies cel·lulars testades una disminució del nivell de fosforilació de la pRB. Resultats que estan en concordança amb els obtinguts en cèl·lules de neuroblastoma amb dos HDIs, el BL1521 (Ouweland et al., 2005) i la

toxina-HC (toxina fúngica *Helminthosporium Carbonum*) (Deubzer et al., 2008a; Deubzer et al., 2008b). En aquests dos darrers estudi la hipofosforilació de la pRB s'associa a l'activació de la seva via, tal i com demostra la disminució de l'expressió de N-Myc, E2F-1, Skp2, Mad2 i Survivina, tots ells marcadors de mal pronòstic en el neuroblastoma (Deubzer et al., 2008a; Deubzer et al., 2008b).

Els nostres resultats indiquen que l'expressió d'**E2F1** es veu clarament reduïda després de l'exposició a TSA durant 24 hores en totes les cèl·lules de neuroblastoma estudiades. Així doncs, la disminució d'E2F1 pot ser un segon factor que contribueixi a l'aturada de la proliferació cel·lular en les cèl·lules de neuroblastoma en resposta a la incubació amb TSA.

Un tercer factor ha tenir en compte per a explicar la disminució de la proliferació és **NMYC**. L'amplificació genòmica de l'oncogen NMYC és l'aberració genètica més habitualment associada a mal pronòstic en el neuroblastoma. L'amplificació d'aquest gen es troba aproximadament en el 20 % dels neuroblastomes, i és emprat com a marcador de mal pronòstic (Janoueix-Lerosey et al., 2010; Van Roy et al., 2009). NMYC pertany a la família d'oncògens MYC, i actua com a activador transcripcional formant heterodímers d'unió a l'ADN amb la proteïna MAX, un membre de la família MAX/MAD (Wenzel and Schwab, 1995), exercint la seva funció a través de la ret MYC/MAD/MAX i Id2 i pRB, podent ser aquest el motiu de l'elevada activitat proliferativa de les cèl·lules de neuroblastoma amb NMYC amplificat (Luscher, 2001). A més a més E2F1 i NMYC actuen conjuntament en el manteniment de la proliferació cel·lular (Strieder and Lutz, 2003). Entre l'elevat nombre de gens regulats per N-Myc trobem H-Twist, l'expressió del qual s'ha vist que es manté per N-Myc, sent H-Twist la causa de la inhibició de la via de p53 i associant-se la seva expressió a mal pronòstic en el neuroblastoma (Valesia-Wittmann et al., 2004). Els nostres resultats mostren una marcada disminució en l'expressió de N-Myc, i en menor grau d'H-Twist, en resposta al tractament amb TSA, que junt amb la disminució d'E2F1 podrien explicar l'aturada del cicle cel·lular i la reducció observada en la proliferació cel·lular. No obstant, aquesta aturada s'observa amb un patró molt similar tant en cèl·lules que tenen còpia única de NMYC (SK-N-AS) (Goldschneider et al., 2006; Nakamura et al., 2007), com en les que tenen NMYC amplificat (LA1-55N, SK-N-JD, LA1-5S), i en conseqüència el sobreexpressen. Aquests resultats suggereixen que l'expressió de NMYC no és un factor determinant en l'establiment de l'aturada en G2/M, estan en concordança aquests resultats amb els obtinguts en publicacions prèvies on s'estudiava l'efecte dels HDIs BL1521 i HC-toxin sobre el neuroblastoma (de Ruijter et al., 2004; Deubzer et al., 2008b). No obstant, tot i no ser determinant, creiem que la disminució de l'expressió d'aquest oncogen en les cèl·lules que el sobreexpressen pot estar participant en part en la disminució de la proliferació observada en resposta a l'exposició a TSA.

El quart factor estudiat ha estat la **Survivina**. La Survivina és una proteïna multifuncional que inhibeix l'apoptosi però també regula la divisió cel·lular i potencia l'angiogènesi. La seva expressió és molt poc freqüent en teixits adults diferenciats, però molt elevada en òrgans embrionaris i fetals, i present en la majoria de càncers (Altieri, 2004; Sah et al., 2006). La seva expressió correlaciona amb mal pronòstic tant en cèl·lules tumorals de càncers adults com pediàtrics (Duffy et al., 2007; Fangusaro et al., 2006), entre ells el neuroblastoma (Adida et al., 1998). La Survivina està altament regulada de manera dependent del cicle cel·lular, amb un marcat augment durant la fase G2/M (Fangusaro et al., 2006). El tractament amb TSA, induïx una disminució dels seus nivells d'ARNm en les cèl·lules LA1-55N i SK-N-AS, una disminució també observada a nivell proteic en les cèl·lules LA1-5S, i que no es reverteix amb la preincubació amb z-VAD.fmk. No obstant, no hem observat aquesta modificació en les cèl·lules SK-N-JD.

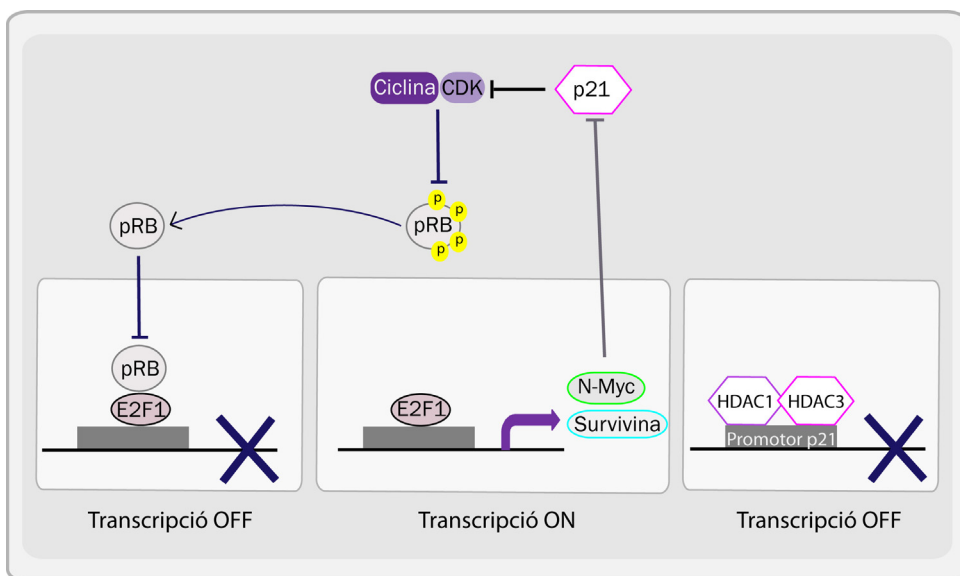


Figura 76 Representació esquemàtica de les interaccions entre les diferents factors involucrats en la proliferació cel·lular modificats pel tractament amb TSA.

Així doncs, la disminució de la proliferació i l'aturada del cicle cel·lular en G2/M induïda pel TSA en les cèl·lules de neuroblastoma, sembla ser el resultat d'un conjunt de modificacions, que poden incloure l'augment de l'expressió de l'inhibidor de CDKs $p21^{Waf1/Cip1}$ i l'activació de la via

supressora de tumors de la pRB, tal i com suggereix la disminució de l'expressió de N-Myc, E2F-1 i Survivina (Figura 76). No sent imprescindible que es produeixin totes aquestes alteracions simultàniament per a que es produeixi l'aturada en G2/M, tal i com indiquen els resultats obtinguts amb les cèl·lules SK-N-AS, que no sobreexpressen N-Myc, o les SK-N-JD, on no s'incrementen els nivells de p21 ni disminueixen els de Survivina.

En el nostre model experimental l'apoptosi es troba activada en totes les línies cel·lulars estudiades després del tractament amb TSA, tal i com indiquen l'activació de la caspasa 3 i la proteòlisi de PARP. No obstant només en les cèl·lules amb una elevada velocitat de proliferació l'apoptosi resulta en una pèrdua substancial de la viabilitat cel·lular durant les primeres 24 hores de tractament, resultant ser les SK-N-AS les més resistents a la citotoxicitat del compost. El grau de mort cel·lular en les cèl·lules SK-N-AS, les cèl·lules que presenten la menor taxa de creixement cel·lular i les úniques estudiades que manquen de l'amplificació i expressió de l'oncogen NMYC (Goldschneider et al., 2006 ;Nakamura et al., 2007), és una vegada més lent i baix, sent clarament apreciable només a les 72 hores de tractament.

Els HDIs, com la gran majoria de drogues anticanceroses, poden activar l'apoptosi, sent la via intrínseca o mitocodrial un dels mecanismes més importants de la mort cel·lular induïda per aquests compostos. Generalment els HDIs activen aquesta ruta mitjançant la inducció de l'alliberament de citocrom c des de l'espai intermembranós del mitocondri i activant la caspasa 9, havent-se comprovat la inhibició d'aquest mecanisme de mort per la sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-X, dos factors que protegeixen el mitocondri. A més a més, els HDIs poden augmentar l'expressió de proteïnes proapoptòtiques, com Bim, Bmf, Bax, Bak, i Bik, i disminuir la de les antiapoptòtiques Xiap i Survivina, així com la de varis dels membres de la família Bcl-2, com Bcl-2, Bcl-X, Bcl-w i Mcl-1 (Bolden et al., 2006; Marks and Xu, 2009; Shankar and Srivastava, 2008). No obstant, el mecanisme que condueix a aquests efectes no és encara ben conegut, ni homogeni entre les cèl·lules exposades a HDIs. De fet, el nivell basal d'aquestes proteïnes varia dràsticament en les diferents cèl·lules tumorals, observant-se en conseqüència també grans diferències en les modificacions induïdes per TSA (Xu et al., 2007). Tot i que la diana principal de les HDACs per a la seva funció fisiològica són les histones, l'efecte antitumoral dels HDIs també s'ha d'atribuir a mecanismes independents de transcripció, per modulació de l'estat d'acetilació d'una sèrie de dianes no histona. Així, l'acetilació de Ku70 condueix a un augment dels nivells de Bax lliure, que segons alguns autors podria ser el causant de l'apoptosi induïda per HDIs en cèl·lules de neuroblastoma (Subramanian et al., 2005a). Alguns articles indiquen la

reducció del creixement de tumors *in vivo* tant en tractament únicament amb HDIs, com en combinació amb altres modalitats de tractament (Coffey et al., 2000; Jaboin et al., 2002; Muhlethaler-Mottet et al., 2008).

En el neuroblastoma considerem que el TSA indueix majoritàriament una apoptosi de desencadenament intrínsec, si bé el paper de la dràstica disminució de Bid i la possible implicació de la via extrínseca queda per a aclarir. Sembla d'una banda que l'expressió de Bid està fortament afectada per l'acetilació de les histones, tal i com mostra la disminució de l'expressió del seu ARNm. Aquest fet, ja predisposaria de per sí a una dificultat per a respondre a mecanismes mediatos pels receptors de mort i per les caspases 8/10. El paper d'aquestes caspases en el neuroblastoma és a més a més força controvertit, especialment el de la caspasa 8, havent-se estimat la pèrdua d'expressió d'aquesta caspasa en aproximadament un 25-35 %, predominantment en tumors considerats d'alt risc (Hopkins-Donaldson et al., 2000; Poulaki et al., 2001; van Noesel and Versteeg, 2004). En el nostre laboratori s'ha assajat el tractament de neuroblastomes amb gamma-interferò, per tal d'induir o augmentar l'expressió de la caspasa 8 (treball de fi de grau d'Anna López, presentat a la UAB el 2008). Els resultats indiquen que en les nostres línies la caspasa 8 poc o molt s'expressa, i que aquesta expressió augmenta considerablement amb l'exposició al gamma-interferò. No obstant, d'aquest increment no en resulta ni una pèrdua de viabilitat, ni una major sensibilitat front a l'activació de receptors de mort com Fas o TNFR1. D'altra banda, la disminució del contingut proteic de Bid induïda pel TSA es recupera, al menys parcialment, a l'inhibir les caspases amb z-VAD.fmk. Resultats que semblen indicar que malgrat la disminució en la seva expressió, els nivells de Bid romanents en la cèl·lula estan sent proteolitzats per l'acció de caspases. En les dues línies cel·lulars en les que s'ha estudiat l'estat de la caspasa 8, SK-N-JD i SK-N-AS, el tractament amb TSA indueix un augment de la seva forma activa, essent aquest especialment marcat en les SK-N-AS. Hem de tenir em compte però, que Bid també és diana d'altres proteases, entre elles la caspasa 2 (Krumshabel et al., 2009a), i s'ha descrit que en les cèl·lules de neuroblastoma SHEP i IMR-32, el tractament amb TSA, SAHA o NaB indueix l'activació d'aquesta caspasa (Muhlethaler-Mottet et al., 2008).

Addicionalment els HDIs poden augmentar l'expressió dels receptors de mort i dels seus lligams en cèl·lules transformades, tant *in vitro* com *in vivo*. Induint o incrementant els nivells d'expressió de TRAIL, TRAIL-R2 (DR5), Fas, Fas-L i TNF- α , i disminuint els de c-FLIP, un inhibidor de la via de receptors de mort (Bolden et al., 2006; Carew et al., 2008a; Marks and Xu, 2009; Shankar and Srivastava, 2008). En el nostre model cel·lular ha estat descrit que l'HDI CBHA indueix una mort dependent de caspases i associada a un augment dels elements CD95/CD95-L (Glick et al., 1999). En aquest estudi però, l'anàlisi per RT-MLPA dels nivells del receptor TNFR

en la línia LA1-55N mostra una disminució en la seva expressió. Resultats que haurien però de ser confirmats a nivell proteic.

Resultats recents semblen indicar que el tractament amb diferents HDIs, com l'àcid valproic, SAHA i MS-275, coopera amb l'interferó-gamma en la inducció de la reexpressió de caspasa 8 en cèl·lules de neuroblastoma i medulloblastoma que no l'expressaven probablement degut a silenciament epigenètic, sensibilitzant les cèl·lules a la mort induïda per TRAIL (Hacker et al., 2009). A més a més, el tractament amb HDIs condueix a la hiperacetilació de la H4, associada al promotor de la caspasa 8 i a la seva activació (Witt et al., 2009a), i en el nostre cas el tractament amb TSA augmenta notablement l'estat d'acetilació de la histona H4.

Així doncs, el conjunt d'aquests resultats sembla indicar que, poc o molt, la via apoptòtica extrínseca o de receptors de mort podria estar present en el procés desencadenat per TSA en el neuroblastoma.

El TSA està induint apoptosi en les cèl·lules de neuroblastoma, no obstant la pèrdua de viabilitat només es reverteix parcialment amb la preincubació amb z-VAD.fmk, indicant la implicació d'altres mecanismes de mort cel·lular. En aquest sentit ha estat descrit que Bid pot jugar un paper important en les interdependències existents entre l'apoptosi i l'autofàgia. La proteòlisi de Bid s'associa a l'activació de la via apoptòtica mitocondrial, però a més a més la seva presència podria estar frenant l'autofàgia en la cèl·lula (Lamparska-Przybysz et al., 2006). L'autofàgia és un procés cel·lular autocatabòlic en el que constituents citoplasmàtics són segregats en vesícules de doble membrana que es fusionen posteriorment amb els lisosomes per a la seva degradació (Mizushima et al., 2008). Degut a que aquesta activitat catabòlica genera energia, l'autofàgia sovint s'indueix en condicions de limitació de nutrients, proporcionant un mecanisme que permet mantenir la viabilitat cel·lular, però podent ser utilitzat també per les cèl·lules canceroses com a mecanisme de supervivència front a condicions d'estrès metabòlic (Corcelle et al., 2009; Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009). No obstant, una autofàgia progressiva pot ser citotòxica, podent substituir, acompanyar o precedir a l'apoptosi en la inducció de la mort cel·lular en determinades condicions (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009).

L'anàlisi per microscopia electrònica (ME) de la morfologia ultraestructural de les cèl·lules després de 24 hores d'exposició a TSA 0.5 μ M, mostra la presència de processos apoptòtics i

necròtics, però també autofàgics, en totes les línies cel·lulars testades, inclòs en les SK-N-AS on les condicions utilitzades pràcticament no afecten la viabilitat cel·lular. La presència d'estructures típicament autofàgiques s'acompanya a més a més en tots els casos d'un augment de LC3-II, la forma proteica de LC3 que es localitza en les membranes preautofagosomals i autofagosomals, i que s'utilitza com a marcador autofàgic (Tanida et al., 2004).

Actualment són dos els membres de la família de les HDACs que han estat involucrats en el procés autofàgic. L'HDAC6 està directament implicada en la degradació proteica per autofàgia de proteïnes mal plegades per l'anomenada via de l'agrosoma, una via independent del proteosoma (Simms-Waldrip et al., 2008). L'HDAC1 també s'ha suggerit que podria estar participant en el procés autofàgic, ja que la seva inhibició amb un inhibidor específic (FK228) o amb siRNA indueix autofàgia en cèl·lules HeLa (Oh et al., 2008). A més a més, recentment s'ha descrit la inducció d'autofàgia per diferents compostos HDI ((Marks and Xu, 2009). El FK228 indueix apoptosi i autofàgia en cèl·lules de tumor rhabdoid maligne, tant *in vitro* com *in vivo* (Watanabe et al., 2009). SAHA indueix apoptosi o autofàgia en línies cel·lulars de condrosarcoma (Yamamoto et al., 2008). I per últim, H40 i SAHA indueixen mort cel·lular en cèl·lules de càncer de pròstata predominantment per inducció d'autofàgia (Long et al., 2009). Aquests resultats suggereixen que l'eficàcia d'aquests agents podria correlacionar amb la seva habilitat d'estimular l'autofàgia com a mecanisme de mort cel·lular. No obstant, aquestes conclusions són encara molt preliminars, especialment si tenim en compte que la majoria d'aquestes situacions també s'indueix apoptosi. De fet, dos estudis recents han mostrat que la combinació d'inhibidors de l'autofàgia amb HDIs o agents alquilants incrementa significativament l'activitat anticancerosa d'aquests darrers (Carew et al., 2008a; Carew et al., 2008b).

Fins al moment no existeixen referències a la inducció d'autofàgia en cèl·lules de neuroblastoma humà com a conseqüència del tractament amb HDIs. No obstant, M. Zhou i col·laboradors van publicar fa poc un treball en el que demostren un increment de l'autofàgia durant la diferenciació cel·lular en cèl·lules de neuroblastoma de ratolí, havent observat que la diferenciació cel·lular s'atura en presència d'inhibidors de l'autofàgia, o es retarda en absència del gen regulador de l'autofàgia Beclina 1 (Zeng and Zhou, 2008).

L'estudi al llarg del temps de marcadors típicament apoptòtics (PARP, caspasa 3, caspasa 8 i Bid) i autofàgics (LC3-II, Atg5, Atg12 i Beclina) en les cèl·lules SK-N-JD, les més sensibles a TSA, indica una activació simultània d'ambdós processos en aquestes cèl·lules a partir de les 12 hores de tractament. El mateix anàlisi en les cèl·lules més resistents a TSA, les SK-N-AS, mostra

com a esdeveniment inicial l'augment de LC3-II a les 8 hores d'exposició al compost, no observant-se proteòlisi de PARP ni activació de la caspasa 3 ni Bid fins a les 24 hores. Resultats que junt amb la menor sensibilitat observada en aquetes cèl·lules front a TSA, suggereixen que en aquest cas l'autofàgia estaria desencadenant-se com a mecanisme de supervivència.

Són cada cop més les evidències que suggereixen una relació entre l'apoptosi i l'autofàgia, degut principalment a que factors relacionats amb l'apoptosi estan críticament involucrats en l'autofàgia, com Bcl-2; Bcl-X o Atg5. Ha estat descrit a més a més, que la inhibició de l'apoptosi pot desencadenar l'autofàgia, mentre que la inhibició de l'autofàgia pot tant induir com atenuar l'apoptosi (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009; Eisenberg-Lerner et al., 2009; Tan et al., 2009). Per aquest motiu varem decidir examinar el significat funcional de l'autofàgia detectada en el nostre model cel·lular en relació a la mort induïda per TSA.

El bloqueig de l'apoptosi induïda per TSA amb zVAD.fmk inhibeix l'aparició del pic subdiploid, indicatiu de cèl·lules apoptòtiques, en totes les cèl·lules estudiades. No obstant només atenua parcialment la pèrdua de viabilitat cel·lular mesurada per MTT i TB, alhora que potencia la inducció del marcador autofàgic LC3-II. La preincubació amb zVAD.fmk no promou autofàgia, ni és capaç de revertir la presència d'estructures autofàgiques degudes al tractament amb TSA. Els resultats obtinguts utilitzant 3-MA com a inhibidor de l'autofàgia, indiquen una disminució significativa del percentatge de cèl·lules mortes i de l'apoptosi induïda per TSA a les 24 hores de tractament en les cèl·lules LA1-55N, SK-N-JD i LA1-5S. A temps més llargs de incubació però, els resultats s'igualen als obtinguts amb el tractament amb TSA sol. El tractament amb 3-MA 10 mM resulta tòxic de per si en les cèl·lules SK-N-JD, però no per a les altres línies. En la línia cel·lular SK-N-AS la inhibició de l'autofàgia indueix en canvi un increment en la mort cel·lular detectada per ambdues tècniques, indicant una potenciació de l'efecte citotòxic induït pel TSA en aquestes cèl·lules. La inhibició de l'autofàgia reverteix de forma significativa l'aturada del cycle cel·lular únicament en les cèl·lules LA1-55N. Caldria veure si la inhibició de l'autofàgia per siRNA d'Atg 7, 5 o Beclina 1, suprimiria l'activació de les caspases i atenuaria la mort cel·lular, o pel contrari potenciarà la mort per apoptosi induïda per TSA, ja que en varis models s'ha descrit que l'autofàgia és necessària per a que es produeixi l'apoptosi (Eisenberg-Lerner and Kimchi, 2009; Tan et al., 2009).

Així doncs, els resultats obtinguts fins al moment suggereixen que apoptosi i autofàgia podrien estar actuant conjuntament en la inducció de mort cel·lular en les cèl·lules més sensibles a TSA, degut a que els dos mecanismes semblen estar induint-se simultàniament, i perquè la inhibició farmacològica d'un d'ells sembla compensar-se mitjançant l'augment de l'altre, assegurant així la mort cel·lular. En les cèl·lules més resistents, les SK-N-AS, l'autofàgia podria estar activant-se

com a mecanisme de supervivència, precedint l'activació de marcadors autofàgics a la dels apoptòtics, i observant-se un augment de la mort cel·lular induïda per TSA al inhibir l'autofàgia. Actuant probablement en aquest darrer cas apoptosi i autofàgia com a dos processos antagònics (Figura 77).

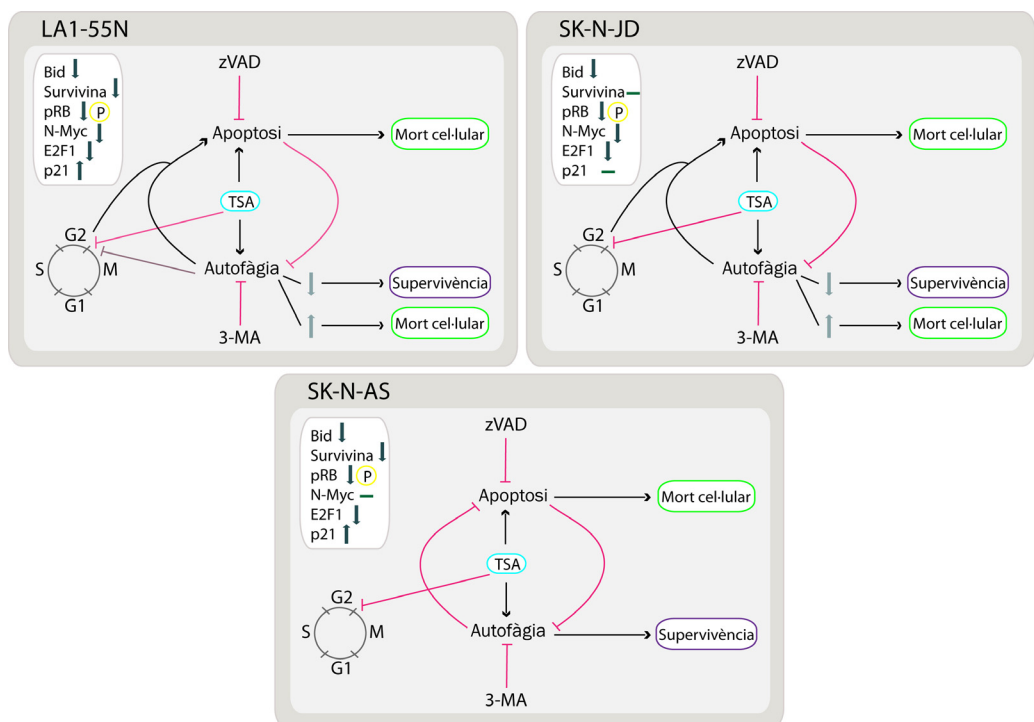


Figura 77. Esquema on es resumeixen els efectes induïts pel TSA en les diferents línies de neuroblastoma humà. LA1-55N, cèl·lules tipus N; SK-N-JD, cèl·lules tipus I; SK-N-AS, cèl·lules tipus S.

En aquest treball hem trobat que el tractament amb tricostatina A (TSA), inhibidor general dels HDACs tipus I/II en cèl·lules eucariotes, indueix una aturada del cicle cel·lular en G2/M, i mort cel·lular per activació de mecanismes apoptòtics, però també autofàgics, en les 4 línies de neuroblastoma humà estudiades.

L'activació de l'autofàgia en cèl·lules canceroses segueix sent controvertida, no sabent-se amb exactitud si representa un mecanisme que permet als tumors sobreviure a la teràpia, o pel contrari un mecanisme per a iniciar una forma no apoptòtica de mort cel·lular programada. Els nostres resultats mostren que la inhibició de l'autofàgia per 3-MA, disminueix només inicialment la pèrdua de la viabilitat cel·lular induïda per TSA en les tres línies més sensibles al compost, adquirint-se valors molt similars als del tractament amb TSA sol quan el temps d'exposició es perllonga més de 24 hores. Mentre que en les cèl·lules més resistents al TSA, les SK-N-AS, la inhibició de l'autofàgia potencia la pèrdua de viabilitat.

Així doncs, l'autofàgia desencadenada per el compost TSA en el neuroblastoma sembla tenir una finalitat dual, actuant predominantment com a mecanisme inductor de mort cel·lular en unes cèl·lules, i com a recurs per a la supervivència en d'altres (Figura 78). Aquesta variabilitat en la resposta de les línies cel·lulars a TSA pot estar reflectint la natura de les alteracions genètiques i de les rutes de transducció de senyals alterades en les diferents línies cel·lulars.

Tot i que no hi ha dubte de que el paper de l'autofàgia en el càncer és complex, i que encara falta molt per a conèixer dels detalls moleculars de la regulació i la finalitat de l'autofàgia en les cèl·lules tumorals, els resultats obtinguts en aquest estudi suggereixen que els mecanismes implicats en l'autofàgia podrien ser considerats com a potencials dianes terapèutiques en el neuroblastoma, especialment en aquells tumors amb processos apoptòtics deficients. No obstant, tal i com succeeix amb altres tumors, seria necessari realitzar prèviament una caracterització del neuroblastoma primari, o de les formes metastàsiques o recidivants, per tal conèixer el seu comportament front a l'autofàgia i poder seleccionar així el tractament més eficient.

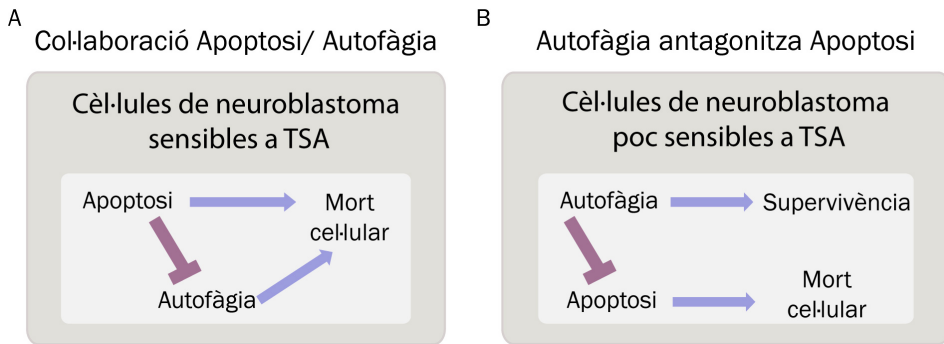


Figura 78. Representació esquemàtica de la connexió entre l'apoptosi i l'autofàgia en cèl·lules de neuroblastoma. **A** | En les cèl·lules LA1-55N, SK-N-JD i LA1-5S, apoptosi i autofàgia semblen estar actuant conjuntament, ambdós mecanismes conduint a la mort cel·lular i probablement actuant per vies paral·leles independents, tot i que podrien influenciar-se mútuament. **B** | En les cèl·lules SK-N-AS l'autofàgia sembla antagonitzar l'apoptosi, promovent la supervivència i bloquejant els estímuls que conduirien a la resposta apoptòtica.

Discussió general

Discussió general

El neuroblastoma segueix sent el major problema en l'oncologia pediàtrica, sent responsable d'una de cada 8 morts pediàtriques per càncer. Aproximadament el 40% de tots els infants amb neuroblastoma són designats com pacients d'alt risc en base a la presència de marcadors de malignitat, consistint el tractament en aquests casos en una seqüència coordinada de quimioteràpia, cirurgia i radiació (Matthay, 1999; Pearson et al., 2008). Però tot i l'agressivitat del tractament, menys del 40 % dels infants aconseguiran una cura a llarg termini (Matthay, 1999; Pearson et al., 2008; Zage et al., 2008). Davant les limitacions en el tractament del neuroblastoma, especialment per l'aparició de resistències a múltiples fàrmacs en tumors ja tractats, i a la carència d'una quimioteràpia específica i eficient contra aquests tumors (Berthold and Hero, 2000; Brodeur, 2003), ens varem proposar testar en línies de neuroblastoma humà nous compostos anticancerosos, per a posteriorment caracteritzar el mecanisme d'acció d'aquells que poguessin resultar d'interès.

L'any 2000 Hanahan i Weinberg van enumerar les sis alteracions essencials que caracteritzen la majoria de càncers humans: autosuficiència en senyals de creixement, evasió de la mort programada, potencial replicatiu il·limitat, angiogènesi mantinguda, invasió de teixits i metàstasi (Hanahan and Weinberg, 2000). Recentment s'han proposat altres trets distintius comuns en les cèl·lules tumorals, incloent una potenciació de l'anabolisme (Kroemer and Pouyssegur, 2008), l'evitació de la immunovigilància (Zitvogel et al., 2008) i la supressió de l'autofàgia (Morselli et al., 2009). Característiques que col·lectivament confereixen el fenotip maligne a les cèl·lules, proporcionant la capacitat de créixer de forma descontrolada, envaint i danyant teixits de l'organisme. Els tractaments emprats contra el càncer es centren principalment en evitar que el tumor avanci o produir la seva recessió, emprant amb aquest propòsit agents citostàtics, que produeixen una aturada del cicle cel·lular i la conseqüent diferenciació de les cèl·lules, o agents citotòxics, els quals indueixen la mort de les cèl·lules transformades.

Durant la realització d'aquesta tesi s'han utilitzat fins a 9 línies diferents de neuroblastoma. La intenció inicial era de desenvolupar tots els estudis en totes les línies, però això va resultar un propòsit mastodòntic que feia alentir els resultats i acabar relativitzant la seva fiabilitat. Així doncs l'estudi es va anar desenvolupant progressivament en un tipus o altre de cèl·lules, iniciant-se amb les SH-SY5Y com a principals protagonistes, per ser les més utilitzades en la literatura, però progressivament decantant-nos cap a la utilització de cèl·lules que ens resultaven més constants en quant al seu comportament. Tot i així pensem que globalment l'ús

del conjunt de totes aquestes línies ens pot haver permès fer-nos una idea del comportament del neuroblastoma front als compostos estudiats.

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat buscar nous abordatges farmacològics de possible aplicació en el tractament del neuroblastoma. Els criteris per decidir els compostos que hem utilitzat en aquest treball s'han basat principalment en els coneixements moleculars de la malaltia, i en l'anàlisi dels fàrmacs que es descriuen a la literatura com ha inductors de mort cel·lular en altres tipus cel·lulars, o en el mateix model experimental, quan els seus efectes encara no eren ben coneguts. Així, després d'alguns intents infructuosos, varem decidir estudiar el procés de mort desencadenat pel pigment bacterià prodigiosina (PG), d'acció molecular no ben coneguda, i per la inhibició de la desacetilació de proteïnes, utilitzant la tricostatina A (TSA) com a compost d'acció més ben definida.

La PG ha mostrat tenir un efecte citotòxic i citostàtic en les línies de neuroblastoma. Indueix mort cel·lular per mecanismes apoptòtics dependents de caspases, i especialment en les cèl·lules de neuroblastoma tipus N, les fenotípicament més agressives. No obstant la inhibició de l'activació de les caspases no reverteix completament la mort cel·lular, indicant la implicació d'altres mecanismes de mort cel·lular en el procés desencadenat per PG. L'aturada de la proliferació cel·lular és en canvi molt més acusada en les cèl·lules tipus S, tot i que és un fenomen observat en totes les cèl·lules estudiades. A més a més, en el present treball hem descrit com la PG, després de la seva entrada per difusió en la cèl·lula, s'acumula especialment en els mitocondris, induint un efecte desacoblant entre la cadena respiratòria i l'activitat de l'ATPasa- F_0-F_1 mitocondrial de les cèl·lules de neuroblastoma. Com a resultat, la producció d'ATP es veu disminuïda notablement però la taxa de consum d'oxigen no s'altera. Nosaltres suggerim que l'explicació a aquest fet podria trobar-se en l'habilitat que té la PG per a atrapar protons a pH fisiològic, modificant així els gradients de pH intracel·lulars, no tant sols els vesiculars i els lisosomals, si no també molt possiblement els intramitocondrials.

Un problema inherent a la utilització de prodigiosina és la seva elevada liposolubilitat a pH fisiològic. Això en dificulta la seva absorció per via digestiva i provoca la seva acumulació en teixit gras, com hem pogut comprovar tractant ratolins de forma subcutània (Annex). Així doncs, tot i que considerem que l'ús de la prodigiosina pel tractament del neuroblastoma o altres tipus de tumors pot ser eficaç, i mereix tenir-se en compte, hi ha un problema farmacològic a resoldre, el de la seva absorció i distribució per via sanguínia. Possiblement l'ús de derivats de la prodigiosina més solubles, com la cicloprodigiosina, podria facilitar-ho. Una altra possibilitat a assajar podria ser l'administració de prodigiosina en liposomes acidificats, per a assegurar la

seva forma protonada més soluble. No obstant, aquest és un problema que deixem per resoldre als farmacòlegs.

Al capítol dos es descriuen els resultats de l'estudi del tractament de les cèl·lules de neuroblastoma amb TSA. El TSA indueix una aturada del cicle cel·lular en G2/M i apoptosi, però també autofàgia, procés fins al moment no descrit en aquestes cèl·lules com a resposta a l'exposició a HDIs, no havent-se observat diferències en aquests efectes entre les cèl·lules neuroblàstiques tipus N, S i I. En concordança amb estudis previs, la disminució de la proliferació i l'aturada en G2/M ha resultat ser conseqüència d'un procés independent de les caspases. Probablement associat a l'augment d'expressió de l'inhibidor de CDKs p21^{WAF/Cip1} i a l'activació de la via supressora de tumors del RB, tal i com suggereix la disminució de l'expressió de N-Myc, E2F-1 i Survivina, tots ells implicats en aquesta via, i a més a més marcadors de mal pronòstic en el neuroblastoma. Podent ser la disminució de la Survivina responsable per si sola del desencadenament de l'apoptosi.

No obstant, l'efecte del TSA no ha estat el mateix en totes les línies cel·lulars de neuroblastoma estudiades, sent les cèl·lules SK-N-AS les més resistents. En aquestes cèl·lules, tot i activar-se els mateixos mecanismes que en la resta de cèl·lules estudiades, la disminució de la viabilitat és molt reduïda i, a les dosis utilitzades, sembla prevaldre un efecte citostàtic. És més, mentre en les cèl·lules LA1-55N, SK-N-JD i LA1-5S, apoptosi i autofàgia semblen estar induint-se simultàniament i col·laborar en la mort cel·lular induïda pel TSA, en les SK-N-AS els resultats suggereixen que aquests dos mecanismes tenen finalitats antagòniques, de manera que l'autofàgia promou la supervivència cel·lular.

El comportament de les cèl·lules SK-N-AS front a PG i TSA ha resultat ser sensiblement diferent al de la resta de les línies cel·lulars estudiades. Es tracta de cèl·lules que en comparació amb les altres tenen un rang de proliferació força inferior, probablement degut a que no sobreexpressen l'oncogen N-Myc, i presenten un menor consum d'oxigen i una major resistència a tòxics. En l'estudi de l'ultraestructura de les línies cel·lulars per microscòpia electrònica, hem comprovat únicament en aquestes cèl·lules la presència de vacuoles i grànuls citoplasmàtics basals, compatibles amb vacuoles autofàgiques i amb la presència de glicogen respectivament. De fet ha estat descrit que alguns tipus cel·lulars de neuroblastoma són capaços de sintetitzar i emmagatzemar glicogen, fet que els proporciona una major resistència metabòlica (Passonneau and Crites, 1976).

Així doncs, els resultats obtinguts indiquen que els dos compostos són capaços d'induir una disminució de la viabilitat cel·lular deguda a una aturada de la proliferació i/o a la mort cel·lular,

depenent el seu efecte final de la línia cel·lular utilitzada, i del temps d'exposició al compost. A més a més, els resultats de l'exposició de les cèl·lules als dos compostos són prou diferents als produïts pels anticancerígens convencionals, com per considerar-se el seu assaig en diferents combinacions amb altres quimioteràpics. En els intents realitzats per nosaltres, la combinació de PG amb CisPt ha resultat en una predominança clara de l'efecte de la PG. La combinació de PG amb TSA no ha mostrat un efecte additiu pel que fa a la disminució de viabilitat, com d'entrada ens podíem imaginar, tot i que aquests estudis encara s'estan desenvolupant en el nostre laboratori.

L'estudi de la PG i el TSA en cultius cel·lulars ha estat un abordatge que ens ha permès delimitar en bona part els seus mecanismes d'acció, no obstant resten algunes preguntes importants per respondre. Hem observat que la inhibició de l'apoptosi potencialment augmenta l'autofàgia, però l'aturada de l'autofàgia només augmenta l'apoptosi a llarg termini (72 hores), mentre que en algunes cèl·lules a curt termini sembla reduir l'apoptosi. Així doncs, en algunes línies cel·lulars de neuroblastoma apoptosi i autofàgia estarien col·laborant (p.e. LA1-55N), mentre que en altres l'autofàgia semblaria retardar l'apoptosi (SK-N-AS). Caldria doncs una bona caracterització del tipus de cèl·lules front a les que ens trobem, per tal de saber si el més beneficiós en termes terapèutics, és induir o aturar l'autofàgia. Els mateixos estudis i caracteritzacions caldria realitzar-los també en cultius primaris, ja que la majoria de línies cel·lulars de neuroblastomes provenen de cèl·lules que han metastatitzat.

L'anàlisi actual dels resultats obtinguts amb la PG, ens fan pensar en la possibilitat que aquest agent també estigui induint autofàgia en les cèl·lules de neuroblastoma, de nou com a mecanisme promort en les cèl·lules més sensibles al compost, i prosupervivència en les més resistents. De fet, la proteòlisi de la caspasa 2 i l'augment de Grp78 suggereixen la implicació de mecanismes d'estrès reticular, i aquest fet pot ben estar relacionat amb l'aparició d'autofàgia. Respecte al tractament amb TSA, caldria confirmar que la inhibició dels mecanismes fins ara descrits per a l'autofàgia reverteixen l'aparició d'autofagolisosomes, i la repercussió que això pot tenir en la viabilitat cel·lular. També caldria aclarir en quin grau afectaria aquesta inhibició a l'activació dels processos apoptòtics observats com a resposta a l'exposició a TSA en cada una de les línies cel·lulars utilitzades en l'estudi.

En aquest estudi s'ha utilitzat el TSA com a HDI, per ser aquest compost considerat l'HDI general (pan) per excel·lència, per la seva gran potencia com ha inhibidor d'HDACs, i per la seva similitud estructural amb SAHA, l'ara anomenat vorinostat (l'únic HDI aprovat fins al moment en el tractament oncològic). Els resultats de viabilitat ens indiquen que el comportament del TSA i

de SAHA en cèl·lules de neuroblastoma sembla ser anàleg, tot i que caldria comprovar si el mateix es pot dir per tots els paràmetres aquí descrits.

Caldria així mateix analitzar l'efecte dels dos compostos *in vivo*, emprant ratolins atòmics en els que prèviament hauríem desenvolupat tumors tipus neuroblastoma per inoculació de les línies utilitzades (Annex).

Esperem que les dades aportades en aquest estudi, serveixin per a millorar el coneixement dels mecanismes de resposta de les cèl·lules de neuroblastoma humanes a l'exposició a possibles nous agents antineoplàsics. Proporcionant noves pistes per al desenvolupament d'agents més efectius i selectius contra aquesta greu patologia pediàtrica.

Conclusions

Conclusions

Dels resultats presentats en aquest estudi se'n poden extreure les següents conclusions:

1. La viabilitat de la major part de les línies de neuroblastoma humà assajades resulta dràsticament reduïda pel tractament amb prodigiosina a unes dosis que no resulten tòxiques per a les cèl·lules no canceroses. L'efecte de la prodigiosina està relacionat amb el grau de proliferació cel·lular, essent superior per a les cèl·lules més proliferants. Les cèl·lules més resistents a l'acció de la prodigiosina han resultat ser les SK-N-AS de llinatge S o glioblàstic.
2. La prodigiosina actua com a agent citoestàtic, induint una disminució de la proliferació cel·lular en totes les línies cel·lulars de neuroblastoma, però especialment en les cèl·lules SK-N-AS.
3. La prodigiosina interfereix en els gradients de protons intracel·lulars, s'acumula en l'interior del mitocondri, i molt possiblement actua com a agent desacoblant mitocondrial.
4. La prodigiosina indueix apoptosi molt possiblement alterant la funció mitocondrial. No obstant, tot i que les caspases estan involucrades en el procés de mort induït per prodigiosina, la seva participació no és imprescindible per a que es produeixi la pèrdua de viabilitat cel·lular.
5. La inhibició de les histona desacetilases comporta una significativa disminució de la viabilitat de les cèl·lules de neuroblastoma, molt més acusada en les cèl·lules de llinatge més neuroblàstic i/o que expressen el factor oncogènic N-Myc.
6. L'inhibidor d'histona desacetilases tricostatina A indueix una aturada del cicle cel·lular en la fase G2/M en totes les línies cel·lulars, una aturada que és independent de caspases i de la sensibilitat de les cèl·lules al compost, però amb diferents característiques dosi-temporals.
7. La disminució de la proliferació i l'aturada del cicle en G2/M semblen ser el resultat d'un conjunt de modificacions que inclouen l'augment de l'expressió de p21^{Waf1/Cip1} i l'activació de la via supressora de tumors del retinoblastoma, tal i com suggereix la

disminució de l'expressió de N-Myc, E2F-1 i Survivina. Factors que molt possiblement siguin també determinants en la inducció de programes de mort cel·lular.

8. Els resultats obtinguts suggereixen que l'apoptosi i l'autofàgia podrien estar actuant conjuntament en la inducció de la mort cel·lular en les cèl·lules de neuroblastoma més sensibles a tricostatina A, mentre que en les cèl·lules més resistents l'autofàgia sembla antogantitzar l'apoptosi promovent la supervivència.
9. Com a conclusió global, creiem que els mecanismes implicats en l'autofàgia podrien ser considerats com a potencials dianes terapèutiques en el neuroblastoma, especialment en aquells tumors amb processos apoptòtics deficients. Caldria però caracteritzar prèviament el neuroblastoma, per a conèixer el seu comportament front l'autofàgia i poder seleccionar el tractament més eficient.

Annex

Obtenció de models animals de neuroblastoma

Un cop comprovada la capacitat anticancerosa de la PG *in vitro*, varem procedir a desenvolupar models de tumors neuroblàstics humans en ratolins immunodeprimits, emprant amb aquesta finalitat les mateixes línies cel·lulars estudiades en cultiu. L'objectiu d'aquests experiments va ser l'obtenció de models animals de neuroblastoma on poder avaluar la capacitat quimioterapèutica dels compostos a assajar *in vivo*.

Obtenció de models de neuroblastoma

Objectiu

Implantació ectòpica de línies tumorals humanes de neuroblastoma en ratolins atímics (immunodeprimits), amb la consegüent obtenció de tumors. A partir del moment de la detecció de dits tumors, estudiar la seva evolució i desenvolupament, avaluant la seva mida i velocitat de creixement, per tal de poder dissenyar la corba de creixement tumoral. Addicionalment, valorarem la vascularització, grau de necrosis del tumor, i la possible aparició de metàstasi en altres òrgans.

Material

Animals. Per a la realització d'aquests estudis es varen utilitzar ratolins atímics mascle de 4-5 setmanes, de la cepa Balb/c Nude (Charles River Laboratories Espanya, S.A.). Els ratolins es van mantenir en càmeres aïllades per a evitar el contacte directe amb patògens. La temperatura es va mantenir controlada entre 20-22 °C, i els cicles de llum/foscor varen ser de 12/12 hores. El menjar i la beguda se'ls hi va proporcionar *ad libitum*. Els ratolins van ser estabulats en l'animalari de petits rosegadors de l'Institut de Recerca Oncològic (ara IDIBELL). L'experimentació es va dur a terme en cabines de flux laminar vertical, en condicions específiques lliures de patògens. Tots els procediments als que van ser sotmesos els animals, es varen realitzar d'acord amb les recomanacions per al correcte tracte i ús dels animals al laboratori. Els procediments de treball varen ser minuciosament avaluats per un comitè ètic especialista en experimentació animal.

Línies cel·lulars. Els tres tipus fenotípics presents en les línies cel·lulars de neuroblastoma tenen diferents potencials tumorogènics. Les tipus S semblen no ser malignes, al mostra nul o mínim creixement independent d'ancoratge en agar tou i no formar tumors en ratolins atímics. Les N formen tumors en un 30- 100 % dels ratolins atímics inoculats, i tenen eficiències de creixement en agar tou força superiors a la de les S, mentre el fenotip I és el que mostra una major capacitat per formar tumors i les millors eficiències de creixement dels tres tipus cel·lulars (Spengler et al., 1997). De moment, degut a la necessitat d'obtenir un elevat nombre de cèl·lules per a les inoculacions, s'han utilitzat dues de les línies cel·lulars amb major capacitat proliferativa, les SH-SY-5Yhp i les LAN-1, totes dues tipus N.

Disseny i metodologia

Inducció de tumors. Les línies cel·lulars SH-SY5Yhp i LAN-1, lliures de micoplasma, es van mantenir en cultiu exponencial *in vitro*. En els dos darrers cultius abans de la inoculació en els ratolins, es van eliminar els antibiòtics del medi de cultiu. Els tumors ectòpics es van induir, en base a publicacions prèvies (Beppu et al., 2004; Coffey et al., 2000; Engler et al., 2001; Michigami et al., 2001), inoculant de manera subcutània (SC) 20×10^6 o 40×10^6 cèl·lules d'un cultiu de SH-SY5Yhp o LAN-1 resuspeses en un volum de 200 μ l de medi DMEM sense antibiòtics i sense FBS. El procediment es va realitzar elevant la pell de la zona dorsal de l'animal, en el quadrant posterior dret o esquerra, i posteriorment introduint l'agulla (podent bellugar-la amb llibertat cap als dos laterals), procedint llavors a la introducció de les cèl·lules. Com a resultat varem obtenir tumors experimentals ben localitzats.

Seguiment del creixement del tumor. Una vegada el tumor primari fou externament palpable i mesurable, es va mesurar la seva mida cada 2-3 dies amb un peu de rei per a seguir la seva evolució. El registre del diàmetre longitudinal (L) i el transversal (l) ens varen servir per a calcular el volum total del tumor mitjançant la fórmula $V = (L \times l^2 \times \pi) / 6$ (Coffey et al., 2000). Quan el tumor havia adquirit un volum de 100-800 mm³, aproximadament 1x1 cm, es va procedir a la seva extirpació (exèresi). Per a realitzar aquest procediment els animals varen ser sacrificats per atmosfera saturada en CO₂. Posteriorment es va procedir a la seva necròpsia.

Processament de les mostres per a anatomia patològica

Els tumors varen ser processats per tal d'analitzar la histologia del teixit, i avaluar la seva morfologia, així com el grau d'angiogènesi i necrosi d'aquest. El protocol realitzat va ser el següent:

1. Fixació: immersió en una solució de paraformaldehid al 10 % durant 16-24 hores.
2. Aclarir amb aigua destil·lada.
3. Es van col·locar en unes caixetes de plàstic individuals anomenades cassettes, les quals van ser prèviament etiquetades per a poder identificar les mostres un cop dins del processador de teixits.
4. Deshidratació : 5 hores en alcohol 70°, 12 hores en alcohol 96°, i 3 hores en alcohol 100°.
5. 1 hora 30 minuts en xilol.
6. Inclusió en parafina: submergir tota la nit en parafina. Posteriorment es submergeix de nou, durant un mínim de 2 hores, en un altre bany de parafina neta.
7. Es fan els blocs de parafina amb ajuda de motlles metàl·lics, i es deixen refredar.
8. Es realitzen talls de 5 cm de gruix amb el micròtom i es recullen en portaobjectes.
9. Per a desparafinar els talls, aquests es submergeixen durant 10 minuts en dos banys de xilol consecutius.
10. Posteriorment es rehidraten, submergeint-los en alcohol 100° durant 3 minuts, 3 minuts en alcohol 96°, i 3 minuts en alcohol 70°. Posteriorment s'aclareixen amb aigua destil·lada. A continuació podem fer les tincions desitjades: hematoxilina-eosina (punt 11) o immunohistoquímica amb Ki67 (punt 14).
11. Tinció amb hematoxilina-eosina: es submergeixen durant 2 minuts en hematoxilina. Després s'esbandeixen amb aigua de l'aixeta, per a submergir-se de nou en alcohol clorhídric (1%). S'aclareix varies vegades amb aigua de l'aixeta. Finalment es submergeix 4 minuts en eosina, i es procedeix al seu aclariment amb aigua destil·lada.
12. Deshidratació: es submergeixen en alcohol al 70° durant 3 minuts, 3 minuts més en alcohol al 96°, i 3 minuts en alcohol al 100°.
13. Es cobreixen els talls amb xilol durant un minut, i un minut amb xilol:eucaliptol (1:1) (Punt 20).
14. Immunohistoquímica K67. Bloqueig de les peroxidases del teixit. Prèviament es realitza un rentat de 5 minuts amb PBS. Es submergeixen les mostres durant 15 minuts a les fosques en una cubeta que conté una solució de : PBS (140ml) + metanol (60ml) + aigua destil·lada al 30 % (2ml). A continuació es fan dos rentats de 5 minuts en PBS.
15. Desemascarar l'antigen. Es submergeixen durant 30 minuts a temperatura ambient amb una solució de saponina (0.05gr saponina/100 ml d'aigua milliqui).
16. Bloqueig. Dos rentats de 5 minuts amb PBS, seguits de dos rentats amb PBS-tritó 0.2 %. Després es posa sobre la mostra una solució de PBS 0.2% + tritó 0.2 % + FHS 0.2 % (100 µl /tall mostra). Es deixa durant 2 hores a la cambra humida a temperatura ambient.

17. Incubació amb l'anticòs primari. Utilitzem una dilució 1/50 de l'anticòs Ki67 (en la solució anterior + 1 % FHS).
18. Incubació de l'anticòs secundari. Temperar durant 30 minuts a temperatura ambient. Realitzar dos rentats de 5 minuts amb trítol 0.2 %, seguits de 2 rentats amb PBS. Finalment es realitza una incubació amb una preparació comercial que conté l'anticòs secundari, durant 30 minuts.
19. Revelat amb DAB
20. Muntatge. Es col·loca una gota de resina sintètica DPX sobre la preparació, i es disposa en un cobreobjectes. Es deixa assecar.

Resultats

Inducció de tumors de neuroblastoma.

10 animals varen ser inoculats per a crear tumors ectòpics:

5 ratolins van ser inoculats subcutàniament amb 20×10^6 cèl·lules SH-SY-5Yhp.

5 ratolins van ser inoculats subcutàniament amb 20×10^6 cèl·lules LAN-1.

5 ratolins van ser inoculats subcutàniament amb 40×10^6 cèl·lules LAN-1.

Els resultats obtinguts (Taula A1), mostren una eficiència del 100 % en la formació de tumors en ratolins inoculats amb la línia cel·lular SH-SY5Yhp, mentre l'eficiència va ser únicament del 10 % en els animals inoculats amb la mateixa quantitat de cèl·lules LAN-1. En aquest darrer cas 4 dels 5 animals van evolucionar reabsorbint l'inòcul, o les tumoracions tot i ser palpables eren tant petites que no podien ser mesurades. Per aquest motiu va realitzar-se un tercer experiment inoculant 40×10^6 cèl·lules LAN-1. Els resultats en aquest cas mostren una eficiència del 60 %.

Taula A1

	20×10^6 SC SH-SY-5Yhp Tumor (L x l (cm))	20×10^6 SC LAN-1 Tumor (L x l (cm))	40×10^6 SC LAN-1 Tumor (L x l (cm))
Individuo 1	0.8 x 0.8	0	1.2 x 1.1
Individuo 2	1 x 0.85	No mesurable	1.4 x 0.5
Individuo 3	0.95 x 0.7	1.2 x 0.9	1.3 x 0.5
Individuo 4	1.3 x 0.8	0	0
Individuo 5	0.8 x 0.5	0	0

Mesures dels tumors corresponents al moment de l'exèresi.

Els tumors SC van mostrar una aparença externa saludable, sense nafres ni zones necrosades, com pot observar-se en la figura A1.



Figura A1. Imatge d'un ratolí atímic en el que s'ha desenvolupat un tumor neuroblàstic ectòpic a partir d'un inòcul de cèl·lules SH-SY5Yhp.

L'evolució dels pesos dels ratolins durant els estudis va ser molt similar en els tres experiments, observant-se un lleuger augment progressiu del pes (Figura A2). L'estat de salut dels tres grups de ratolins va ser molt similar.

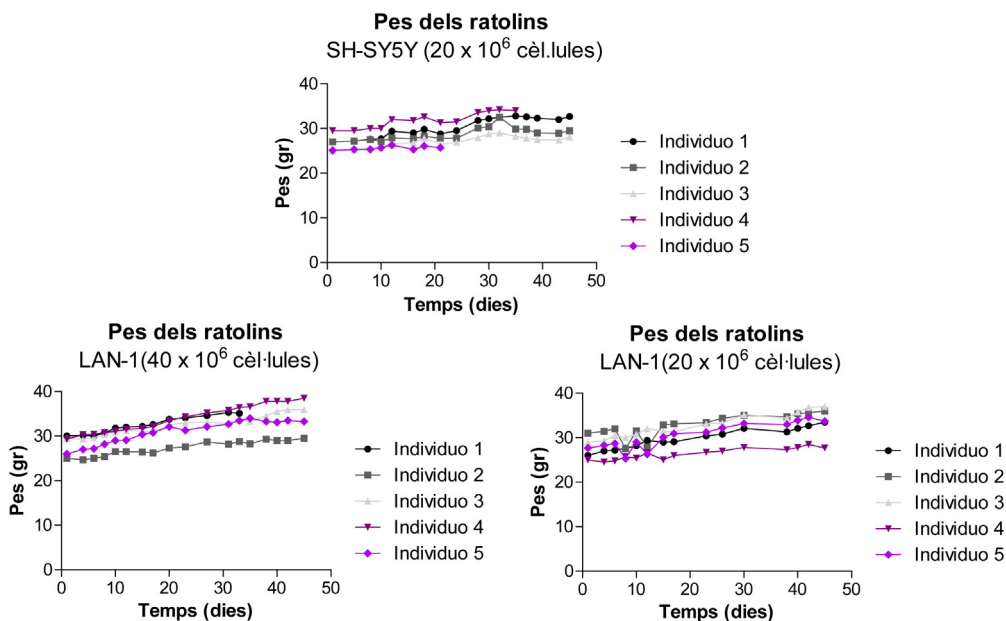


Figura A2. Control del pes dels ratolins. Gràfiques on es mostra l'evolució del pes dels animals que formaven part dels 3 grups experimentals al llarg del temps.

Respecte el creixement dels tumors, aquests van seguir un creixement exponencial en un curt període de temps, després d'un període de latència més o menys llarg (Figura A3). En la línia SH-SY5Yhp el tumor va trigar 10 dies en ser detectable, mentre en la línia LAN-1 aquest període oscil·la entre uns 10-20 dies.

Dels tumors inoculats amb cèl·lules SH-SY5Yhp, l'individu número 5 va presentar un creixement exponencial molt acusat, però als pocs dies va començar a remetre de manera espontània. Varem sacrificar l'animal per al seu anàlisi. En el lloc de la inoculació varem trobar una petita tumoració que posteriorment va ser analitzada histològicament.

En tots els casos en el moment de realitzar l'exèresi es va procedir al sacrifici de l'animal. L'anàlisi posterior dels ratolins no va mostrar signes de disseminació de la malaltia en cap dels ratolins utilitzats.

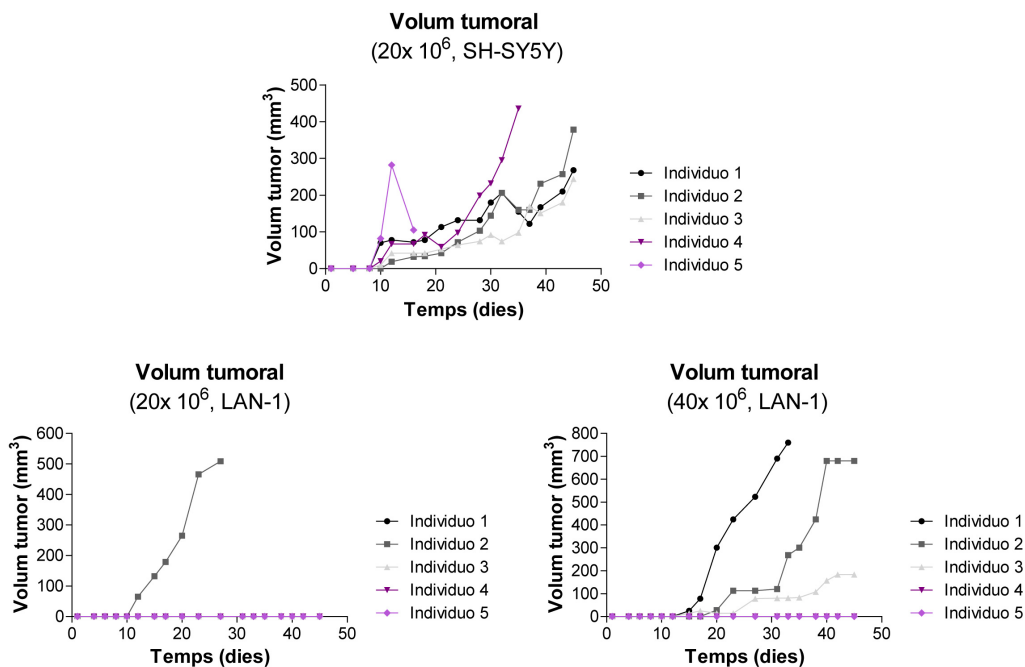


Figura A3. Control del volum dels tumors ectòpics. Gràfiques on es mostra l'evolució del creixement tumoral dels animals que formaven part dels 3 grups experimentals al llarg del temps.

Estudi anatomopatològic dels tumors.

La morfologia dels tumors va ser estimada per microscopia òptica després del seu processament i posterior tinció histològica amb hematoxilina-eosina, o amb el marcatge immunohistoquímic amb Ki67.

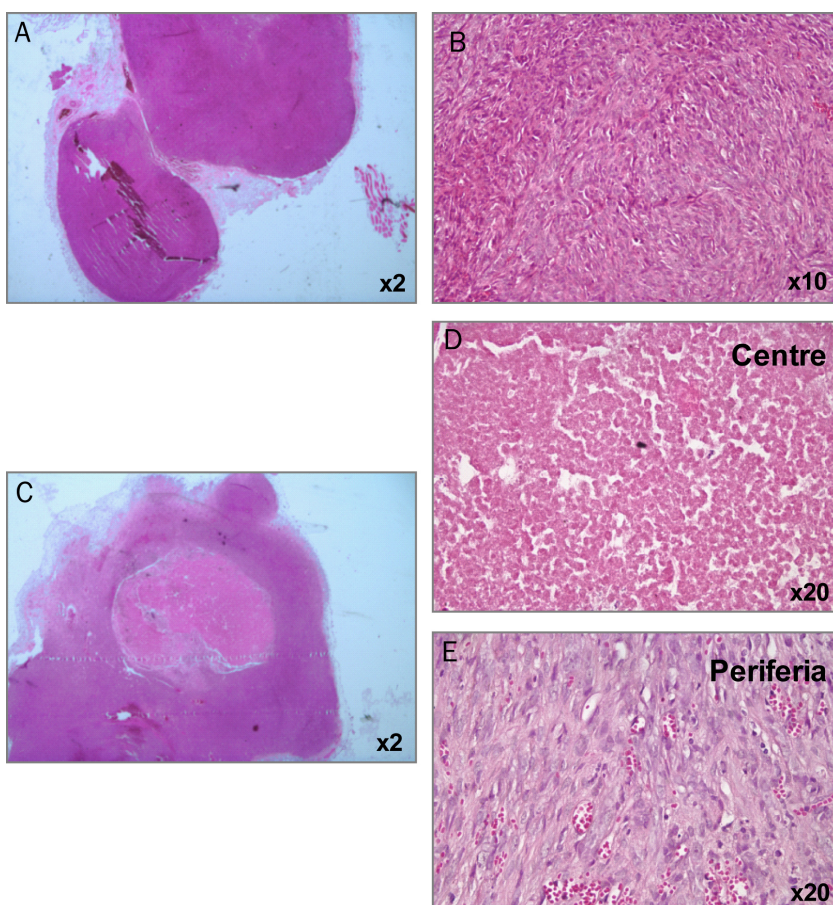


Figura A4. Talls del tumors després de la tinció amb hematoxilina-eosina.

En les fotografies de la figura A4, podem observar diferents talls de 2 tumors ectòpics diferents formats després de la inoculació de les cèl·lules SH-SY5Yhp. En la figura A4A i A4C es mostren dos tumors representatius que presenten nòduls molt evidents. Si tenim en compte la

classificació histològica dels neuroblastomes, la presència d'aquests nòduls ens permet classificar-los com a ganglioneuroblastomes nodulars (Shimada et al., 1999a; Umehara et al., 2000). El primer tumor està format per dos nòduls, tots dos amb una elevada densitat de cèl·lules neurobàstiques molt poc diferenciades (Figura A4B). En el segon tumor observem un nòdul central amb un marcatge amb hematoxilina-eosina més tènue que el teixit que l'envolta. Les cèl·lules en el interior del nòdul estan molt compactades, amb una morfologia arrodonida que no indica diferenciació (Figura A4D). La porció més externa del tumor revela la presència de cèl·lules de mida més gran i una major quantitat d'estroma, però també una major vascularització (Figura A4E). Els tumors acostumen a estar envoltats de teixit adipós, amb una vascularització que es limita a la part més externa d'aquest (Figura A5). No varem observar la presència de zones necròtiques en cap dels dos tumors analitzats.

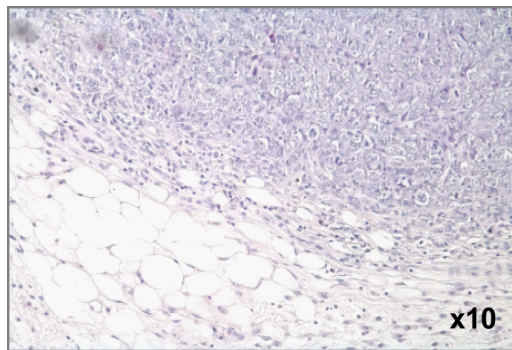


Figura A5. Tall d'un tumor tenyit amb hematoxilina-eosina. El teixit adipós es localitza en la imatge en el quadrant inferior esquerra.

La tinció de dos talls consecutius d'un tercer tumor amb hematoxilina-eosina i amb el marcador de proliferació cel·lular Ki67, evidencia que la zona central, on les cèl·lules són menys diferenciades, es correspon amb un marcatge més intens de ki67, indicant una major proliferació en aquesta regió del tumor (Figura A6). Resultats que suggereixen que possiblement les cèl·lules en una situació hipòxica es mantenen indiferenciades i proliferatives. També observem aquesta coloració marronosa més intensa en la capa més perifèrica que envolta el tumor.

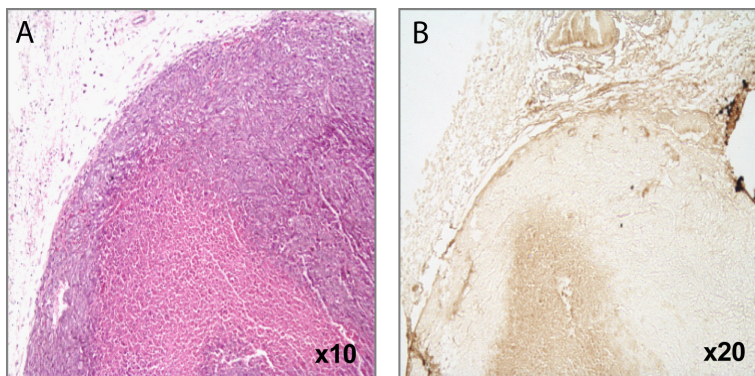


Figura A6. Talls d'un mateix tumor neuroblàstic. **A** | Tinció amb hematoxilina-eosina. **B** | Immunohistoquímica contra Ki67.

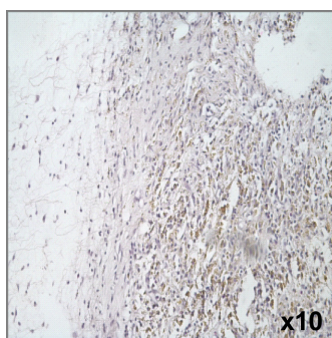


Figura A7. Tall d'un tumor que aparentment va remetre espontàniament, tenyit amb hematoxilina-eosina.

L'anàlisi morfològic del tumor que va involucionar de forma espontània mostra l'aparença d'un tumor poc compacte, amb cèl·lules més disperses i una major quantitat d'estroma que els tumors que varen seguir un creixement exponencial fins a la final de l'estudi (Figura A7). No descartem però, la possibilitat que en aquest cas hi hagués algun problema inflamatori associat que interferís en l'apreciació de la mida del tumor.

Podem concloure que les línies de neuroblastoma humà tipus N SH-SY5Yhp i LAN-1 indueixen tumors ectòpics en ratolins atímics després d'haver estat inoculats amb 20×10^6 i 40×10^6 cèl·lules respectivament. La seva corba de creixement avarca un període de latència que varia entre uns 10 i uns 20 dies, i uns altres 20 dies per a arribar a una mida aproximada de 1x1 cm. La línia cel·lular SH-SY5Yhp ha resultat ser més tumorigènica que la LAN-1, ja que la seva

eficiència és del 100% amb un inòcul que contenia 20×10^6 cèl·lules, la meitat de cèl·lules necessàries per a desenvolupar tumors amb la línia cel·lular LAN-1.

Aquests tumors ectòpics, difereixen en quan a localització i gènesi dels tumors que poden aparèixer en l'infant, els qual s'originen majoritàriament a partir de la medulla adrenal. Tot i així, aquests tumors poden resultar una bona eina per a l'assaig farmacològic de nous compostos amb potencial quimioterapèutic. La seva localització concreta i el seu abordatge i seguiment, de manera no traumàtica per a l'animal, els converteix en un model valuós per a l'estudi del tractament del neuroblastoma.

Els problemes d'absorció i distribució del fàrmac en l'administració perifèrica podrien resoldre's amb l'administració intratumoral del compost a estudiar. Aquest procediment s'ha assajat en el nostre laboratori, duent-nos a establir-ne algunes limitacions: caldria trobar un disseny d'agulla que limiti el màxim el traumatisme induït per la mera punció, alhora que permeti penetrar sense excessiva dificultat en l'estructura altament compacta dels tumors. En un intent per solvatar aquest problema, varem realitzar proves preliminars amb puncions perifèriques del tumor amb el compost PG, però aquest compost va resultar quedar atrapat en el teixit adipós que envolta el tumor.

Bibliografia

- Abeliovich, H., Dunn, W. A., Jr, Kim, J. and Klionsky, D. J.** (2000). Dissection of Autophagosome Biogenesis into Distinct Nucleation and Expansion Steps. *J. Cell Biol.* **151**, 1025-1034.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. and Akey, C. W.** (2002). Three-Dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation. *Mol. Cell* **9**, 423-432.
- Adams, J. M. and Cory, S.** (2007). The Bcl-2 Apoptotic Switch in Cancer Development and Therapy. *Oncogene* **26**, 1324-1337.
- Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M. and Altieri, D. C.** (1998). Anti-Apoptosis Gene, Survivin, and Prognosis of Neuroblastoma. *Lancet* **351**, 882-883.
- Ahlander, J. and Bosco, G.** (2009). The RB/E2F Pathway and Regulation of RNA Processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 280-283.
- Akgul, C., Moulding, D. A. and Edwards, S. W.** (2004). Alternative Splicing of Bcl-2-Related Genes: Functional Consequences and Potential Therapeutic Applications. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2189-2199.
- Allen, E. G.** (1967). Conditions of the Colour Change of Prodigiosin. *Nature* **216**, 929-931.
- Altieri, D. C.** (2004). Molecular Circuits of Apoptosis Regulation and Cell Division Control: The Survivin Paradigm. *J. Cell. Biochem.* **92**, 656-663.
- Ambros, I. M., Hata, J., Joshi, V. V., Roald, B., Dehner, L. P., Tuchler, H., Potschger, U. and Shimada, H.** (2002). Morphologic Features of Neuroblastoma (Schwannian Stroma-Poor Tumors) in Clinically Favorable and Unfavorable Groups. *Cancer* **94**, 1574-1583.

Ambros, I. M., Zellner, A., Roald, B., Amann, G., Ladenstein, R., Printz, D., Gadner, H. and

Ambros, P. F. (1996). Role of Ploidy, Chromosome 1p, and Schwann Cells in the Maturation of Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1505-1511.

Antignani, A. and Youle, R. J. (2006). How do Bax and Bak Lead to Permeabilization of the Outer Mitochondrial Membrane? *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 685-689.

Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L. and

Korsmeyer, S. J. (1985). Cloning the Chromosomal Breakpoint of t(14;18) Human Lymphomas: Clustering Around JH on Chromosome 14 and Near a Transcriptional Unit on 18. *Cell* **41**, 899-906.

BALAMUTH, W. and BRENT, M. M. (1950). Biological Studies on *Entamoeba Histolytica*. IV.

Direct Action of the Antibiotic, Prodigiosin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **75**, 374-378.

Baldino, C. M., Parr, J., Wilson, C. J., Ng, S. C., Yohannes, D. and Wasserman, H. H. (2006).

Indoloprodigiosins from the C-10 Bipyrrrolic Precursor: New Antiproliferative Prodigiosin Analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 701-704.

Banhegyi, G., Baumeister, P., Benedetti, A., Dong, D., Fu, Y., Lee, A. S., Li, J., Mao, C., Margittai,

E., Ni, M. et al. (2007). Endoplasmic Reticulum Stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1113**, 58-71.

Batty, N., Malouf, G. G. and Issa, J. P. (2009). Histone Deacetylase Inhibitors as Anti-Neoplastic

Agents. *Cancer Lett.* **280**, 192-200.

Baylin, S. B. and Ohm, J. E. (2006). Epigenetic Gene Silencing in Cancer - a Mechanism for Early

Oncogenic Pathway Addiction? *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 107-116.

Beg, A. A. and Baltimore, D. (1996). An Essential Role for NF-kappaB in Preventing TNF-Alpha-

Induced Cell Death. *Science* **274**, 782-784.

- Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G. and Gil, J.** (1998). Mitoxantrone, a Topoisomerase II Inhibitor, Induces Apoptosis of B-Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells. *Br. J. Haematol.* **100**, 142-146.
- Bellosillo, B., Dalmau, M., Colomer, D. and Gil, J.** (1997). Involvement of CED-3/ICE Proteases in the Apoptosis of B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Blood* **89**, 3378-3384.
- Ben-Baruch, A.** (2009). Site-Specific Metastasis Formation: Chemokines as Regulators of Tumor Cell Adhesion, Motility and Invasion. *Cell. Adh Migr.* **3**, 328-333.
- Bennett, J. W. and Bentley, R.** (2000). Seeing Red: The Story of Prodigiosin. *Adv. Appl. Microbiol.* **47**, 1-32.
- Beppu, K., Jaboine, J., Merchant, M. S., Mackall, C. L. and Thiele, C. J.** (2004). Effect of Imatinib Mesylate on Neuroblastoma Tumorigenesis and Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 46-55.
- Berthold, F. and Hero, B.** (2000). Neuroblastoma: Current Drug Therapy Recommendations as Part of the Total Treatment Approach. *Drugs* **59**, 1261-1277.
- Blagosklonny, M. V.** (2005). Carcinogenesis, Cancer Therapy and Chemoprevention. *Cell Death Differ.* **12**, 592-602.
- Blommaart, E. F., Krause, U., Schellens, J. P., Vreeling-Sindelarova, H. and Meijer, A. J.** (1997). The Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors Wortmannin and LY294002 Inhibit Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **243**, 240-246.
- Blommaart, E. F., Luiken, J. J., Blommaart, P. J., van Woerkom, G. M. and Meijer, A. J.** (1995). Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 is Inhibitory for Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 2320-2326.

Bolden, J. E., Peart, M. J. and Johnstone, R. W. (2006). Anticancer Activities of Histone Deacetylase Inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 769-784.

Bown, N., Cotterill, S., Lastowska, M., O'Neill, S., Pearson, A. D., Plantaz, D., Meddeb, M., Danglot, G., Brinkschmidt, C., Christiansen, H. et al. (1999). Gain of Chromosome Arm 17q and Adverse Outcome in Patients with Neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1954-1961.

Bras, M., Queenan, B. and Susin, S. A. (2005). Programmed Cell Death Via Mitochondria: Different Modes of Dying. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 231-239.

Brenner, S. (1974). The Genetics of *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics* **77**, 71-94.

Brodeur, G. M. (2003). Neuroblastoma: Biological Insights into a Clinical Enigma. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 203-216.

Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castelberry, R. P., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M. and Hedborg, F. (1993). Revisions of the International Criteria for Neuroblastoma Diagnosis, Staging, and Response to Treatment. *J. Clin. Oncol.* **11**, 1466-1477.

Broker, L. E., Kruyt, F. A. and Giaccone, G. (2005). Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3155-3162.

Bronckart, Y., Decaestecker, C., Nagy, N., Harper, L., Schafer, B. W., Salmon, I., Pochet, R., Kiss, R. and Heizman, C. W. (2001). Development and Progression of Malignancy in Human Colon Tissues are Correlated with Expression of Specific Ca(2+)-Binding S100 Proteins. *Histol. Histopathol.* **16**, 707-712.

Budd, R. C., Yeh, W. C. and Tschopp, J. (2006). CFLIP Regulation of Lymphocyte Activation and Development. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 196-204.

-
- Burger, S. R. and Bennett, J. W.** (1985). Droplet Enrichment Factors of Pigmented and Nonpigmented *Serratia Marcescens*: Possible Selective Function for Prodigiosin. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 487-490.
- Campas, C., Dalmau, M., Montaner, B., Barragan, M., Bellosillo, B., Colomer, D., Pons, G., Perez-Tomas, R. and Gil, J.** (2003). Prodigiosin Induces Apoptosis of B and T Cells from B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia* **17**, 746-750.
- Canonico, P. G. and Bird, J. W.** (1969). The use of Acridine Orange as a Lysosomal Marker in Rat Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* **43**, 367-371.
- Cardenas, M. E., Cutler, N. S., Lorenz, M. C., Di Como, C. J. and Heitman, J.** (1999). The TOR Signaling Cascade Regulates Gene Expression in Response to Nutrients. *Genes Dev.* **13**, 3271-3279.
- Carew, J. S., Giles, F. J. and Nawrocki, S. T.** (2008a). Histone Deacetylase Inhibitors: Mechanisms of Cell Death and Promise in Combination Cancer Therapy. *Cancer Lett.* **269**, 7-17.
- Carew, J. S., Nawrocki, S. T., Giles, F. J. and Cleveland, J. L.** (2008b). Targeting Autophagy: A Novel Anticancer Strategy with Therapeutic Implications for Imatinib Resistance. *Biologics* **2**, 201-204.
- Casey, J. R., Grinstein, S. and Orlowski, J.** (2010). Sensors and Regulators of Intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 50-61.
- Castillo-Avila, W., Abal, M., Robine, S. and Perez-Tomas, R.** (2005). Non-Apoptotic Concentrations of Prodigiosin (H⁺/Cl⁻ Symporter) Inhibit the Acidification of Lysosomes and Induce Cell Cycle Blockage in Colon Cancer Cells. *Life Sci.* **78**, 121-127.

Castleberry, R. P. (1997). Biology and Treatment of Neuroblastoma. *Pediatr. Clin. North Am.* **44**, 919-937.

Castro, A. F., Rebhun, J. F., Clark, G. J. and Quilliam, L. A. (2003). Rheb Binds Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) and Promotes S6 Kinase Activation in a Rapamycin- and Farnesylation-Dependent Manner. *J. Biol. Chem.* **278**, 32493-32496.

Castro, A. J. (1967). Antimalarial Activity of Prodigiosin. *Nature* **213**, 903-904.

Cattoretti, G., Becker, M. H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J. and Gerdes, J. (1992). Monoclonal Antibodies Against Recombinant Parts of the Ki-67 Antigen (MIB 1 and MIB 3) Detect Proliferating Cells in Microwave-Processed Formalin-Fixed Paraffin Sections. *J. Pathol.* **168**, 357-363.

Cecchetto, G., Mosseri, V., De Bernardi, B., Helardot, P., Monclair, T., Costa, E., Horcher, E., Neuenschwander, S., Toma, P., Rizzo, A. et al. (2005). Surgical Risk Factors in Primary Surgery for Localized Neuroblastoma: The LNESG1 Study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8483-8489.

Cecconi, F. and Levine, B. (2008). The Role of Autophagy in Mammalian Development: Cell Makeover rather than Cell Death. *Dev. Cell.* **15**, 344-357.

Chen, N. and Karantza-Wadsworth, V. (2009). Role and Regulation of Autophagy in Cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1516-1523.

Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L. and Green, D. R. (2006). Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization during Apoptosis: The Innocent Bystander Scenario. *Cell Death Differ.* **13**, 1396-1402.

Ciccarone, V., Spengler, B. A., Meyers, M. B., Biedler, J. L. and Ross, R. A. (1989). Phenotypic Diversification in Human Neuroblastoma Cells: Expression of Distinct Neural Crest Lineages. *Cancer Res.* **49**, 219-225.

Coco, S., Defferrari, R., Scaruffi, P., Cavazzana, A., Di Cristofano, C., Longo, L., Mazzocco, K., Perri, P., Gambini, C., Moretti, S. et al. (2005). Genome Analysis and Gene Expression Profiling of Neuroblastoma and Ganglioneuroblastoma Reveal Differences between Neuroblastic and Schwannian Stromal Cells. *J. Pathol.* **207**, 346-357.

Codd, R., Braich, N., Liu, J., Soe, C. Z. and Pakchung, A. A. (2009). Zn(II)-Dependent Histone Deacetylase Inhibitors: Suberoylanilide Hydroxamic Acid and Trichostatin A. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 736-739.

Coffey, D. C., Kutko, M. C., Glick, R. D., Swendeman, S. L., Butler, L., Rifkind, R., Marks, P. A., Richon, V. M. and LaQuaglia, M. P. (2000). Histone Deacetylase Inhibitors and Retinoic Acids Inhibit Growth of Human Neuroblastoma in Vitro. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**, 577-581.

Condorelli, F., Gnemmi, I., Vallario, A., Genazzani, A. A. and Canonico, P. L. (2008). Inhibitors of Histone Deacetylase (HDAC) Restore the p53 Pathway in Neuroblastoma Cells. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 657-668.

Corcelle, E. A., Puustinen, P. and Jaattela, M. (2009). Apoptosis and Autophagy: Targeting Autophagy Signalling in Cancer Cells -'Trick Or Treats'? *FEBS J.* **276**, 6084-6096.

Cress, W. D. and Seto, E. (2000). Histone Deacetylases, Transcriptional Control, and Cancer. *J. Cell. Physiol.* **184**, 1-16.

Dahmer, M. K. (2005). Caspases-2, -3, and -7 are Involved in Thapsigargin-Induced Apoptosis of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *J. Neurosci. Res.* **80**, 576-583.

D'Alessio, R., Bargiotti, A., Carlini, O., Colotta, F., Ferrari, M., Gnocchi, P., Isetta, A., Mongelli, N., Motta, P., Rossi, A. et al. (2000). Synthesis and Immunosuppressive Activity of Novel Prodigiosin Derivatives. *J. Med. Chem.* **43**, 2557-2565.

Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell Death: Critical Control Points. *Cell* **116**, 205-219.

de Ruijter, A. J., Kemp, S., Kramer, G., Meinsma, R. J., Kaufmann, J. O., Caron, H. N. and van Kuilenburg, A. B. (2004). The Novel Histone Deacetylase Inhibitor BL1521 Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Neuroblastoma Cells. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1279-1288.

de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. and van Kuilenburg, A. B. (2003). Histone Deacetylases (HDACs): Characterization of the Classical HDAC Family. *Biochem. J.* **370**, 737-749.

Deorukhkar, A. A., Chander, R., Ghosh, S. B. and Sainis, K. B. (2007). Identification of a Red-Pigmented Bacterium Producing a Potent Anti-Tumor N-Alkylated Prodigiosin as *Serratia Marcescens*. *Res. Microbiol.* **158**, 399-404.

Deorukhkar, A. A., Chander, R., Pandey, R. and Sainis, K. B. (2008). A Novel N-Alkylated Prodigiosin Analogue Induced Death in Tumour Cell through Apoptosis Or Necrosis Depending upon the Cell Type. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 355-363.

Deubzer, H. E., Ehemann, V., Kulozik, A. E., Westermann, F., Savelyeva, L., Kopp-Schneider, A., Riester, D., Schwab, M. and Witt, O. (2008a). Anti-Neuroblastoma Activity of *Helminthosporium Carbonum* (HC)-Toxin is Superior to that of Other Differentiating Compounds in Vitro. *Cancer Lett.* **264**, 21-28.

Deubzer, H. E., Ehemann, V., Westermann, F., Heinrich, R., Mechttersheimer, G., Kulozik, A. E., Schwab, M. and Witt, O. (2008b). Histone Deacetylase Inhibitor *Helminthosporium Carbonum*

(HC)-Toxin Suppresses the Malignant Phenotype of Neuroblastoma Cells. *Int. J. Cancer* **122**, 1891-1900.

Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S. and Reed, J. C. (1998). IAPs Block Apoptotic Events Induced by Caspase-8 and Cytochrome c by Direct Inhibition of Distinct Caspases. *EMBO J.* **17**, 2215-2223.

Diaz-Ruiz, C., Montaner, B. and Perez-Tomas, R. (2001). Prodigiosin Induces Cell Death and Morphological Changes Indicative of Apoptosis in Gastric Cancer Cell Line HGT-1. *Histol. Histopathol.* **16**, 415-421.

Drummond, D. C., Noble, C. O., Kirpotin, D. B., Guo, Z., Scott, G. K. and Benz, C. C. (2005). Clinical Development of Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 495-528.

Duffy, M. J., O'Donovan, N., Brennan, D. J., Gallagher, W. M. and Ryan, B. M. (2007). Survivin: A Promising Tumor Biomarker. *Cancer Lett.* **249**, 49-60.

Dunn, W. A., Jr. (1990). Studies on the Mechanisms of Autophagy: Formation of the Autophagic Vacuole. *J. Cell Biol.* **110**, 1923-1933.

Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P. (2009). Major Cell Death Pathways at a Glance. *Microbes Infect.* **11**, 1050-1062.

Eberharter, A. and Becker, P. B. (2002). Histone Acetylation: A Switch between Repressive and Permissive Chromatin. Second in Review Series on Chromatin Dynamics. *EMBO Rep.* **3**, 224-229.

Eckelman, B. P. and Salvesen, G. S. (2006). The Human Anti-Apoptotic Proteins cIAP1 and cIAP2 Bind but do Not Inhibit Caspases. *J. Biol. Chem.* **281**, 3254-3260.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. and Jones, P. A. (2004). Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy. *Nature* **429**, 457-463.

Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. U. and Kimchi, A. (2009). Life and Death Partners: Apoptosis, Autophagy and the Cross-Talk between them. *Cell Death Differ.* **16**, 966-975.

Eisenberg-Lerner, A. and Kimchi, A. (2009). The Paradox of Autophagy and its Implication in Cancer Etiology and Therapy. *Apoptosis* **14**, 376-391.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. *Cell* **75**, 817-825.

Engler, S., Thiel, C., Forster, K., David, K., Bredehorst, R. and Juhl, H. (2001). A Novel Metastatic Animal Model Reflecting the Clinical Appearance of Human Neuroblastoma: Growth Arrest of Orthotopic Tumors by Natural, Cytotoxic Human Immunoglobulin M Antibodies. *Cancer Res.* **61**, 2968-2973.

Esteller, M. (2008). Epigenetics in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148-1159.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A. and Henson, P. M. (2000). A Receptor for Phosphatidylserine-Specific Clearance of Apoptotic Cells. *Nature* **405**, 85-90.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. and Henson, P. M. (1992). Exposure of Phosphatidylserine on the Surface of Apoptotic Lymphocytes Triggers Specific Recognition and Removal by Macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207-2216.

Fangusaro, J. R., Caldas, H., Jiang, Y. and Altura, R. A. (2006). Survivin: An Inhibitor of Apoptosis in Pediatric Cancer. *Pediatr. Blood Cancer.* **47**, 4-13.

- Fenrick, R. and Hiebert, S. W.** (1998). Role of Histone Deacetylases in Acute Leukemia. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **30-31**, 194-202.
- Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E. and Blenis, J.** (2002). Mammalian Cell Size is Controlled by mTOR and its Downstream Targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* **16**, 1472-1487.
- Friedman, G. K. and Castleberry, R. P.** (2007). Changing Trends of Research and Treatment in Infant Neuroblastoma. *Pediatr. Blood Cancer.* **49**, 1060-1065.
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S.** (2004). The Protein Structures that Shape Caspase Activity, Specificity, Activation and Inhibition. *Biochem. J.* **384**, 201-232.
- Fulda, S., Poremba, C., Berwanger, B., Hacker, S., Eilers, M., Christiansen, H., Hero, B. and Debatin, K. M.** (2006). Loss of Caspase-8 Expression does Not Correlate with MYCN Amplification, Aggressive Disease, Or Prognosis in Neuroblastoma. *Cancer Res.* **66**, 10016-10023.
- Gammill, L. S. and Bronner-Fraser, M.** (2003). Neural Crest Specification: Migrating into Genomics. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 795-805.
- Gao, X., Zhang, Y., Arrazola, P., Hino, O., Kobayashi, T., Yeung, R. S., Ru, B. and Pan, D.** (2002). Tsc Tumour Suppressor Proteins Antagonize Amino-Acid-TOR Signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 699-704.
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C. and Kroemer, G.** (2006). Mechanisms of Cytochrome c Release from Mitochondria. *Cell Death Differ.* **13**, 1423-1433.
- Gaughran, E. R.** (1969). From Superstition to Science: The History of a Bacterium. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **31**, 3-24.

Gerber, N. N. (1969). Prodigiosin-Like Pigments from *Actinomadura* (*Nocardia*) *Pelletieri* and *Actinomadura Madurae*. *Appl. Microbiol.* **18**, 1-3.

Glick, R. D., Swendeman, S. L., Coffey, D. C., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Richon, V. M. and La Quaglia, M. P. (1999). Hybrid Polar Histone Deacetylase Inhibitor Induces Apoptosis and CD95/CD95 Ligand Expression in Human Neuroblastoma. *Cancer Res.* **59**, 4392-4399.

Glozak, M. A., Sengupta, N., Zhang, X. and Seto, E. (2005). Acetylation and Deacetylation of Non-Histone Proteins. *Gene* **363**, 15-23.

Goldschneider, D., Horvilleur, E., Plassa, L. F., Guillaud-Bataille, M., Million, K., Wittmer-Dupret, E., Danglot, G., de The, H., Benard, J., May, E. et al. (2006). Expression of C-Terminal Deleted p53 Isoforms in Neuroblastoma. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5603-5612.

Gomez-Santos, C., Francisco, R., Gimenez-Xavier, P. and Ambrosio, S. (2007). Dopamine Induces TNF α and TNF-R1 Expression in SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *Neuroreport* **18**, 1725-1728.

Gozuacik, D. and Kimchi, A. (2004). Autophagy as a Cell Death and Tumor Suppressor Mechanism. *Oncogene* **23**, 2891-2906.

Gozuacik, D. and Kimchi, A. (2006). DAPk Protein Family and Cancer. *Autophagy* **2**, 74-79.

Gray, S. G. and Teh, B. T. (2001). Histone acetylation/deacetylation and Cancer: An "Open" and "Shut" Case? *Curr. Mol. Med.* **1**, 401-429.

Gregoretta, I. V., Lee, Y. M. and Goodson, H. V. (2004). Molecular Evolution of the Histone Deacetylase Family: Functional Implications of Phylogenetic Analysis. *J. Mol. Biol.* **338**, 17-31.

Grimmer, M. R. and Weiss, W. A. (2006). Childhood Tumors of the Nervous System as Disorders of Normal Development. *Curr. Opin. Pediatr.* **18**, 634-638.

- Grimont, P. A. and Grimont, F.** (1978). Biotyping of *Serratia Marcescens* and its use in Epidemiological Studies. *J. Clin. Microbiol.* **8**, 73-83.
- Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L.** (2002). Deacetylase Enzymes: Biological Functions and the use of Small-Molecule Inhibitors. *Chem. Biol.* **9**, 3-16.
- Gui, C. Y., Ngo, L., Xu, W. S., Richon, V. M. and Marks, P. A.** (2004). Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Activation of p21WAF1 Involves Changes in Promoter-Associated Proteins, Including HDAC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1241-1246.
- Guicciardi, M. E. and Gores, G. J.** (2009). Life and Death by Death Receptors. *FASEB J.* **23**, 1625-1637.
- Guo, C., White, P. S., Hogarty, M. D., Brodeur, G. M., Gerbing, R., Stram, D. O. and Maris, J. M.** (2000). Deletion of 11q23 is a Frequent Event in the Evolution of MYCN Single-Copy High-Risk Neuroblastomas. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**, 544-546.
- Hacker, S., Dittrich, A., Mohr, A., Schweitzer, T., Rutkowski, S., Krauss, J., Debatin, K. M. and Fulda, S.** (2009). Histone Deacetylase Inhibitors Cooperate with IFN-Gamma to Restore Caspase-8 Expression and Overcome TRAIL Resistance in Cancers with Silencing of Caspase-8. *Oncogene* **28**, 3097-3110.
- Han, K. K. and Martinage, A.** (1992). Post-Translational Chemical Modification(s) of Proteins. *Int. J. Biochem.* **24**, 19-28.
- Han, S. B., Kim, H. M., Kim, Y. H., Lee, C. W., Jang, E. S., Son, K. H., Kim, S. U. and Kim, Y. K.** (1998). T-Cell Specific Immunosuppression by Prodigiosin Isolated from *Serratia Marcescens*. *Int. J. Immunopharmacol.* **20**, 1-13.

- Han, S. B., Park, S. H., Jeon, Y. J., Kim, Y. K., Kim, H. M. and Yang, K. H.** (2001). Prodigiosin Blocks T Cell Activation by Inhibiting Interleukin-2Ralpha Expression and Delays Progression of Autoimmune Diabetes and Collagen-Induced Arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 415-425.
- Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F. and Ohsumi, Y.** (2007). The Atg12-Atg5 Conjugate has a Novel E3-Like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 37298-37302.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.** (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hearn, W. R., Elson, M. K., Williams, R. H. and Medina-Castro, J.** (1970). Prodigiosene [5-(2-Pyrryl)-2,2'-dipyrrolylmethene] and some Substituted Prodigiosenes. *J. Org. Chem.* **35**, 142-146.
- Hearn, W. R., Medina-Castro, J. and Elson, M. K.** (1968). Colour Change of Prodigiosin. *Nature* **220**, 170-171.
- Hejazi, A. and Falkiner, F. R.** (1997). *Serratia Marcescens*. *J. Med. Microbiol.* **46**, 903-912.
- Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R.** (1994). *C. Elegans* Cell Survival Gene Ced-9 Encodes a Functional Homolog of the Mammalian Proto-Oncogene Bcl-2. *Cell* **76**, 665-676.
- Ho, T. F., Ma, C. J., Lu, C. H., Tsai, Y. T., Wei, Y. H., Chang, J. S., Lai, J. K., Cheuh, P. J., Yeh, C. T., Tang, P. C. et al.** (2007). Undecylprodigiosin Selectively Induces Apoptosis in Human Breast Carcinoma Cells Independent of p53. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **225**, 318-328.
- Ho, T. F., Peng, Y. T., Chuang, S. M., Lin, S. C., Feng, B. L., Lu, C. H., Yu, W. J., Chang, J. S. and Chang, C. C.** (2009). Prodigiosin Down-Regulates Survivin to Facilitate Paclitaxel Sensitization in Human Breast Carcinoma Cell Lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **235**, 253-260.

- Holt, D. W., Mueller, E. A., Kovarik, J. M., van Bree, J. B. and Kutz, K.** (1994). The Pharmacokinetics of Sandimmun Neoral: A New Oral Formulation of Cyclosporine. *Transplant. Proc.* **26**, 2935-2939.
- Hood, D. W., Heidstra, R., Swoboda, U. K. and Hodgson, D. A.** (1992). Molecular Genetic Analysis of Proline and Tryptophan Biosynthesis in *Streptomyces Coelicolor* A3(2): Interaction between Primary and Secondary Metabolism—a Review. *Gene* **115**, 5-12.
- Hopkins-Donaldson, S., Bodmer, J. L., Bourloud, K. B., Brognara, C. B., Tschopp, J. and Gross, N.** (2000). Loss of Caspase-8 Expression in Highly Malignant Human Neuroblastoma Cells Correlates with Resistance to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Induced Apoptosis. *Cancer Res.* **60**, 4315-4319.
- Hrzenjak, A., Kremser, M. L., Strohmeier, B., Moinfar, F., Zatloukal, K. and Denk, H.** (2008). SAHA Induces Caspase-Independent, Autophagic Cell Death of Endometrial Stromal Sarcoma Cells by Influencing the mTOR Pathway. *J. Pathol.* **216**, 495-504.
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G. and Youle, R. J.** (1997). Cytosol-to-Membrane Redistribution of Bax and Bcl-X(L) during Apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 3668-3672.
- Hu, Y., Krishan, A., Nie, W., Sridhar, K. S., Mayer, L. D. and Bally, M.** (2004). Synergistic Cytotoxicity of Pyrazoloacridine with Doxorubicin, Etoposide, and Topotecan in Drug-Resistant Tumor Cells. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1160-1169.
- Huh, J. E., Yim, J. H., Lee, H. K., Moon, E. Y., Rhee, D. K. and Pyo, S.** (2007). Prodigiosin Isolated from *Hahella chejuensis* Suppresses Lipopolysaccharide-Induced NO Production by Inhibiting p38 MAPK, JNK and NF-kappaB Activation in Murine Peritoneal Macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 1825-1833.

- Hutchins, M. U. and Klionsky, D. J.** (2001). Vacuolar Localization of Oligomeric Alpha-Mannosidase Requires the Cytoplasm to Vacuole Targeting and Autophagy Pathway Components in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 20491-20498.
- Iatropoulos, M. J. and Williams, G. M.** (1996). Proliferation Markers. *Exp. Toxicol. Pathol.* **48**, 175-181.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. and Guarente, L.** (2000). Transcriptional Silencing and Longevity Protein Sir2 is an NAD-Dependent Histone Deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
- Inoue, J., Gohda, J., Akiyama, T. and Semba, K.** (2007). NF-kappaB Activation in Development and Progression of Cancer. *Cancer. Sci.* **98**, 268-274.
- Irmier, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C. et al.** (1997). Inhibition of Death Receptor Signals by Cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-195.
- Ishola, T. A. and Chung, D. H.** (2007). Neuroblastoma. *Surg. Oncol.* **16**, 149-156.
- Ito, R., Asami, S., Motohashi, S., Ootsuka, S., Yamaguchi, Y., Chin, M., Shichino, H., Yoshida, Y., Nemoto, N., Mugishima, H. et al.** (2005). Significance of Survivin mRNA Expression in Prognosis of Neuroblastoma. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 565-568.
- Jaboin, J., Wild, J., Hamidi, H., Khanna, C., Kim, C. J., Robey, R., Bates, S. E. and Thiele, C. J.** (2002). MS-27-275, an Inhibitor of Histone Deacetylase, has Marked in Vitro and in Vivo Antitumor Activity Against Pediatric Solid Tumors. *Cancer Res.* **62**, 6108-6115.
- Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G. and Delattre, O.** (2010). Molecular Pathogenesis of Peripheral Neuroblastic Tumors. *Oncogene* **29**, 1566-1579.
- Jenuwein, T. and Allis, C. D.** (2001). Translating the Histone Code. *Science* **293**, 1074-1080.

- Jeong, H., Yim, J. H., Lee, C., Choi, S. H., Park, Y. K., Yoon, S. H., Hur, C. G., Kang, H. Y., Kim, D., Lee, H. H. et al.** (2005). Genomic Blueprint of *Hahella Chejuensis*, a Marine Microbe Producing an Algicidal Agent. *Nucleic Acids Res.* **33**, 7066-7073.
- Johnsen, J. I., Kogner, P., Albiñ, A. and Henriksson, M. A.** (2009). Embryonal Neural Tumours and Cell Death. *Apoptosis* **14**, 424-438.
- Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D. and Nevins, J. R.** (1993). Expression of Transcription Factor E2F1 Induces Quiescent Cells to Enter S Phase. *Nature* **365**, 349-352.
- Johnstone, R. W.** (2002). Histone-Deacetylase Inhibitors: Novel Drugs for the Treatment of Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 287-299.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.** (2004). LC3, GABARAP and GATE16 Localize to Autophagosomal Membrane Depending on Form-II Formation. *J. Cell. Sci.* **117**, 2805-2812.
- Kalbe, C., Marten, P. and Berg, G.** (1996). Strains of the Genus *Serratia* as Beneficial Rhizobacteria of Oilseed Rape with Antifungal Properties. *Microbiol. Res.* **151**, 433-439.
- Kamata, K., Okamoto, S., Oka, S., Kamata, H., Yagisawa, H. and Hirata, H.** (2001). Cycloprodiginin Hydrochloride Suppresses Tumor Necrosis Factor (TNF) Alpha-Induced Transcriptional Activation by NF-kappaB. *FEBS Lett.* **507**, 74-80.
- Kaneko, Y.** (1990). Cytogenetics in Pediatric Solid Tumors. *Rinsho Byori* **38**, 1047-1052.
- Kataoka, T., Muroi, M., Ohkuma, S., Waritani, T., Magae, J., Takatsuki, A., Kondo, S., Yamasaki, M. and Nagai, K.** (1995). Prodigiosin 25-C Uncouples Vacuolar Type H(+)-ATPase, Inhibits Vacuolar Acidification and Affects Glycoprotein Processing. *FEBS Lett.* **359**, 53-59.

Kawauchi, K., Shibutani, K., Yagisawa, H., Kamata, H., Nakatsuji, S., Anzai, H., Yokoyama, Y., Ikegami, Y., Moriyama, Y. and Hirata, H. (1997). A Possible Immunosuppressant, Cycloprodigiosin Hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas Denitrificans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 543-547.

Kazantsev, A. G. and Thompson, L. M. (2008). Therapeutic Application of Histone Deacetylase Inhibitors for Central Nervous System Disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 854-868.

Kelland, L. (2006). Discontinued Drugs in 2005: Oncology Drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs* **15**, 1309-1318.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.

Keshelava, N., Davicioni, E., Wan, Z., Ji, L., Sposto, R., Triche, T. J. and Reynolds, C. P. (2007). Histone Deacetylase 1 Gene Expression and Sensitization of Multidrug-Resistant Neuroblastoma Cell Lines to Cytotoxic Agents by Depsipeptide. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 1107-1119.

Khalfan, W. A. and Klionsky, D. J. (2002). Molecular Machinery Required for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting (Cvt) Pathway in *S. Cerevisiae*. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 468-475.

Khanna, K. K. and Jackson, S. P. (2001). DNA Double-Strand Breaks: Signaling, Repair and the Cancer Connection. *Nat. Genet.* **27**, 247-254.

Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2001). Beclin-Phosphatidylinositol 3-Kinase Complex Functions at the Trans-Golgi Network. *EMBO Rep.* **2**, 330-335.

Kim, D., Kim, J. F., Yim, J. H., Kwon, S. K., Lee, C. H. and Lee, H. K. (2008). Red to Red - the Marine Bacterium *Hahella Chejuensis* and its Product Prodigiosin for Mitigation of Harmful Algal Blooms. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1621-1629.

Kim, H. S., Hayashi, M., Shibata, Y., Wataya, Y., Mitamura, T., Horii, T., Kawauchi, K., Hirata, H., Tsuboi, S. and Moriyama, Y. (1999a). Cycloprodigiosin Hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas Denitrificans* is a Potent Antimalarial Agent. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 532-534.

Kim, J., Dalton, V. M., Eggerton, K. P., Scott, S. V. and Klionsky, D. J. (1999b). Apg7p/Cvt2p is Required for the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting, Macroautophagy, and Peroxisome Degradation Pathways. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1337-1351.

Kim, J. S., Baek, S. J., Sali, T. and Eling, T. E. (2005). The Conventional Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Sulindac Sulfide Arrests Ovarian Cancer Cell Growth Via the Expression of NAG-1/MIC-1/GDF-15. *Mol. Cancer. Ther.* **4**, 487-493.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1999). Formation Process of Autophagosome is Traced with Apg8/Aut7p in Yeast. *J. Cell Biol.* **147**, 435-446.

Kisenge, R. R., Toyoda, H., Kang, J., Tanaka, S., Yamamoto, H., Azuma, E. and Komada, Y. (2003). Expression of Short-Form Caspase 8 Correlates with Decreased Sensitivity to Fas-Mediated Apoptosis in Neuroblastoma Cells. *Cancer. Sci.* **94**, 598-605.

Kitahara, J., Sakamoto, H., Tsujimoto, M. and Nakagawa, Y. (2000). Involvement of NF-kappaB in the Protection of Cell Death by Tumor Necrosis Factor in L929 Derived TNF Resistant C12 Cells. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 397-401.

Kitevskaja, T., Spencer, D. M. and Hawkins, C. J. (2009). Caspase-2: Controversial Killer Or Checkpoint Controller? *Apoptosis* **14**, 829-848.

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr, Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. et al. (2003). A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Dev. Cell.* **5**, 539-545.

Kobayashi, N. and Ichikawa, Y. (1989). A Protein Associated with Prodigiosin Formation in *Serratia Marcescens*. *Microbiol. Immunol.* **33**, 257-263.

Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. and Kondo, S. (2005). The Role of Autophagy in Cancer Development and Response to Therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **5**, 726-734.

Konno, H., Matsuya, H., Okamoto, M., Sato, T., Tanaka, Y., Yokoyama, K., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H. H. and Ohkuma, S. (1998). Prodigiosins Uncouple Mitochondrial and Bacterial F-ATPases: Evidence for their H⁺/Cl⁻ Symport Activity. *J. Biochem.* **124**, 547-556.

Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M. J., Fenton, W. and Reed, J. C. (1993). Investigation of the Subcellular Distribution of the Bcl-2 Oncoprotein: Residence in the Nuclear Envelope, Endoplasmic Reticulum, and Outer Mitochondrial Membranes. *Cancer Res.* **53**, 4701-4714.

Kristensen, L. S., Nielsen, H. M. and Hansen, L. L. (2009). Epigenetics and Cancer Treatment. *Eur. J. Pharmacol.* **625**, 131-142.

Kroemer, G. and Pouyssegur, J. (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell.* **13**, 472-482.

Krumschnabel, G., Manzl, C. and Villunger, A. (2009a). Caspase-2: Killer, Savior and Safeguard—Emerging Versatile Roles for an Ill-Defined Caspase. *Oncogene* **28**, 3093-3096.

Krumschnabel, G., Sohm, B., Bock, F., Manzl, C. and Villunger, A. (2009b). The Enigma of Caspase-2: The Laymen's View. *Cell Death Differ.* **16**, 195-207.

- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K. and Vandenabeele, P.** (2008). Apoptosis and Necrosis: Detection, Discrimination and Phagocytosis. *Methods* **44**, 205-221.
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P. and Flavell, R. A.** (1998). Reduced Apoptosis and Cytochrome c-Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9. *Cell* **94**, 325-337.
- Kushner, B. H. and Cheung, N. K.** (2004). Treatment Reduction for Neuroblastoma. *Pediatr. Blood Cancer.* **43**, 619-621.
- Kushner, B. H., Cheung, N. K., LaQuaglia, M. P., Ambros, P. F., Ambros, I. M., Bonilla, M. A., Ladanyi, M. and Gerald, W. L.** (1996). International Neuroblastoma Staging System Stage 1 Neuroblastoma: A Prospective Study and Literature Review. *J. Clin. Oncol.* **14**, 2174-2180.
- Kushner, B. H., Laquaglia, M. P., Kramer, K., Modak, S. and Cheung, N. K.** (2008). Recurrent Metastatic Neuroblastoma Followed by Myelodysplastic Syndrome: Possible Leukemogenic Role of Temozolomide. *Pediatr. Blood Cancer.* **51**, 552-554.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P.** (2007). Caspases in Cell Survival, Proliferation and Differentiation. *Cell Death Differ.* **14**, 44-55.
- Lamparska-Przybysz, M., Gajkowska, B. and Motyl, T.** (2006). BID-Deficient Breast Cancer MCF-7 Cells as a Model for the Study of Autophagy in Cancer Therapy. *Autophagy* **2**, 47-48.
- Lane, A. A. and Chabner, B. A.** (2009). Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5459-5468.
- Lapenna, S. and Giordano, A.** (2009). Cell Cycle Kinases as Therapeutic Targets for Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 547-566.

Lauferska, U., Vinas, M., Loren, J. G. and Guinea, J. (1983). Enhancement by Polymyxin B of Proline-Induced Prodigiosin Biosynthesis in Non-Proliferating Cells of *Serratia Marcescens*. *Microbiologica* **6**, 155-162.

Lehrmann, H., Pritchard, L. L. and Harel-Bellan, A. (2002). Histone Acetyltransferases and Deacetylases in the Control of Cell Proliferation and Differentiation. *Adv. Cancer Res.* **86**, 41-65.

Levine, B. and Klionsky, D. J. (2004). Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Dev. Cell.* **6**, 463-477.

Li, J. and Lee, A. S. (2006). Stress Induction of GRP78/BiP and its Role in Cancer. *Curr. Mol. Med.* **6**, 45-54.

Lin, H. Y., Chen, C. S., Lin, S. P., Weng, J. R. and Chen, C. S. (2006). Targeting Histone Deacetylase in Cancer Therapy. *Med. Res. Rev.* **26**, 397-413.

Linder, M. C. and Hazegh-Azam, M. (1996). Copper Biochemistry and Molecular Biology. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 797S-811S.

Liu, T., Tee, A. E., Porro, A., Smith, S. A., Dwarte, T., Liu, P. Y., Iraci, N., Sekyere, E., Haber, M., Norris, M. D. et al. (2007). Activation of Tissue Transglutaminase Transcription by Histone Deacetylase Inhibition as a Therapeutic Approach for Myc Oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18682-18687.

Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996). Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. *Cell* **86**, 147-157.

Llagostera, E., Soto-Cerrato, V., Joshi, R., Montaner, B., Gimenez-Bonafe, P. and Perez-Tomas, R. (2005). High Cytotoxic Sensitivity of the Human Small Cell Lung Doxorubicin-Resistant

Carcinoma (GLC4/ADR) Cell Line to Prodigiosin through Apoptosis Activation. *Anticancer Drugs* **16**, 393-399.

Long, J., Zhao, J., Yan, Z., Liu, Z. and Wang, N. (2009). Antitumor Effects of a Novel Sulfur-Containing Hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitor H40. *Int. J. Cancer* **124**, 1235-1244.

Longatti, A. and Tooze, S. A. (2009). Vesicular Trafficking and Autophagosome Formation. *Cell Death Differ.* **16**, 956-965.

Look, A. T., Hayes, F. A., Shuster, J. J., Douglass, E. C., Castleberry, R. P., Bowman, L. C., Smith, E. I. and Brodeur, G. M. (1991). Clinical Relevance of Tumor Cell Ploidy and N-Myc Gene Amplification in Childhood Neuroblastoma: A Pediatric Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* **9**, 581-591.

Luger, K., Rechsteiner, T. J., Flaus, A. J., Waye, M. M. and Richmond, T. J. (1997). Characterization of Nucleosome Core Particles Containing Histone Proteins made in Bacteria. *J. Mol. Biol.* **272**, 301-311.

Luscher, B. (2001). Function and Regulation of the Transcription Factors of the Myc/Max/Mad Network. *Gene* **277**, 1-14.

Macaluso, M., Montanari, M., Noto, P. B., Gregorio, V., Bronner, C. and Giordano, A. (2007). Epigenetic Modulation of Estrogen Receptor-Alpha by pRb Family Proteins: A Novel Mechanism in Breast Cancer. *Cancer Res.* **67**, 7731-7737.

Magae, J., Miller, M. W., Nagai, K. and Shearer, G. M. (1996). Effect of Metacycloprodigiosin, an Inhibitor of Killer T Cells on Murine Skin and Heart Transplants. *J. Antibiot. (Tokyo)* **49**, 86-90.

Mahlknecht, U., Schnittger, S., Ottmann, O. G., Schoch, C., Mosebach, M., Hiddemann, W. and Hoelzer, D. (2000). Chromosomal Organization and Localization of the Human Histone Deacetylase 5 Gene (HDAC5). *Biochim. Biophys. Acta* **1493**, 342-348.

Mai, A., Massa, S., Lavu, S., Pezzi, R., Simeoni, S., Ragno, R., Mariotti, F. R., Chiani, F., Camilloni, G. and Sinclair, D. A. (2005). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Sirtinol Analogues as Class III histone/protein Deacetylase (Sirtuin) Inhibitors. *J. Med. Chem.* **48**, 7789-7795.

Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A. and Kroemer, G. (2009a). Autophagy Regulation by p53. *Curr. Opin. Cell Biol.*

Maiuri, M. C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J. M., Carnuccio, R. and Kroemer, G. (2009b). Control of Autophagy by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cell Death Differ.* **16**, 87-93.

Mallick, S. A. (1996). Cell Surface Hydrophobicity and its Relation to Outer Membrane Proteins of *Serratia Marcescens*. *Indian. J. Exp. Biol.* **34**, 107-110.

Manderville, R. A. (2001). Synthesis, Proton-Affinity and Anti-Cancer Properties of the Prodigiosin-Group Natural Products. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **1**, 195-218.

Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. and Cohn, S. L. (2007). Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106-2120.

Marks, P., Rifkind, R. A., Richon, V. M., Breslow, R., Miller, T. and Kelly, W. K. (2001). Histone Deacetylases and Cancer: Causes and Therapies. *Nat. Rev. Cancer.* **1**, 194-202.

Marks, P. A. (2007). Discovery and Development of SAHA as an Anticancer Agent. *Oncogene* **26**, 1351-1356.

Marks, P. A. and Jiang, X. (2005). Histone Deacetylase Inhibitors in Programmed Cell Death and Cancer Therapy. *Cell. Cycle* **4**, 549-551.

Marks, P. A., Richon, V. M., Miller, T. and Kelly, W. K. (2004). Histone Deacetylase Inhibitors. *Adv. Cancer Res.* **91**, 137-168.

Marks, P. A. and Xu, W. S. (2009). Histone Deacetylase Inhibitors: Potential in Cancer Therapy. *J. Cell. Biochem.* **107**, 600-608.

Marmorstein, R. (2004). Structural and Chemical Basis of Histone Acetylation. *Novartis Found. Symp.* **259**, 78-98; discussion 98-101, 163-9.

Martin, M., Kettmann, R. and Dequiedt, F. (2007). Class IIa Histone Deacetylases: Regulating the Regulators. *Oncogene* **26**, 5450-5467.

Martinez-Vicente, M. and Cuervo, A. M. (2007). Autophagy and Neurodegeneration: When the Cleaning Crew Goes on Strike. *Lancet Neurol.* **6**, 352-361.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. and White, E. (2007). Role of Autophagy in Cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **7**, 961-967.

Matthay, K. K. (1999). Intensification of Therapy using Hematopoietic Stem-Cell Support for High-Risk Neuroblastoma. *Pediatr. Transplant.* **3 Suppl 1**, 72-77.

McKenzie, P. P., Danks, M. K., Kriwacki, R. W. and Harris, L. C. (2003). P21Waf1/Cip1 Dysfunction in Neuroblastoma: A Novel Mechanism of Attenuating G0-G1 Cell Cycle Arrest. *Cancer Res.* **63**, 3840-3844.

Mei, S., Ho, A. D. and Mahlknecht, U. (2004). Role of Histone Deacetylase Inhibitors in the Treatment of Cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **25**, 1509-1519.

Meier, P. and Vousden, K. H. (2007). Lucifer's Labyrinth--Ten Years of Path Finding in Cell Death. *Mol. Cell* **28**, 746-754.

Melvin, M. S., Wooton, K. E., Rich, C. C., Saluta, G. R., Kucera, G. L., Lindquist, N. and Manderville, R. A. (2001). Copper-Nuclease Efficiency Correlates with Cytotoxicity for the 4-Methoxypyrrrolic Natural Products. *J. Inorg. Biochem.* **87**, 129-135.

Michaelis, M., Cinatl, J., Anand, P., Rothweiler, F., Kotchetkov, R., von Deimling, A., Doerr, H. W., Shogen, K. and Cinatl, J., Jr. (2007). Onconase Induces Caspase-Independent Cell Death in Chemoresistant Neuroblastoma Cells. *Cancer Lett.* **250**, 107-116.

Michigami, T., Ihara-Watanabe, M., Yamazaki, M. and Ozono, K. (2001). Receptor Activator of Nuclear Factor kappaB Ligand (RANKL) is a Key Molecule of Osteoclast Formation for Bone Metastasis in a Newly Developed Model of Human Neuroblastoma. *Cancer Res.* **61**, 1637-1644.

Miller, M. A., Karacay, B., Zhu, X., O'Dorisio, M. S. and Sandler, A. D. (2006). Caspase 8L, a Novel Inhibitory Isoform of Caspase 8, is Associated with Undifferentiated Neuroblastoma. *Apoptosis* **11**, 15-24.

Minucci, S. and Pelicci, P. G. (2006). Histone Deacetylase Inhibitors and the Promise of Epigenetic (and More) Treatments for Cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **6**, 38-51.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. and Klionsky, D. J. (2008). Autophagy Fights Disease through Cellular Self-Digestion. *Nature* **451**, 1069-1075.

Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is Required for the Function of the Apg12p-Apg5p Conjugate in the Yeast Autophagy Pathway. *EMBO J.* **18**, 3888-3896.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T. (2001). Dissection of Autophagosome Formation using Apg5-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Cell Biol.* **152**, 657-668.

Monclair, T., Brodeur, G. M., Ambros, P. F., Brisse, H. J., Cecchetto, G., Holmes, K., Kaneko, M., London, W. B., Matthay, K. K., Nuchtern, J. G. et al. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Staging System: An INRG Task Force Report. *J. Clin. Oncol.* **27**, 298-303.

Monneret, C. (2005). Histone Deacetylase Inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **40**, 1-13.

Montaner, B., Castillo-Avila, W., Martinell, M., Ollinger, R., Aymami, J., Giralt, E. and Perez-Tomas, R. (2005). DNA Interaction and Dual Topoisomerase I and II Inhibition Properties of the Anti-Tumor Drug Prodigiosin. *Toxicol. Sci.* **85**, 870-879.

Montaner, B., Navarro, S., Pique, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E., Gil, J. and Perez-Tomas, R. (2000). Prodigiosin from the Supernatant of *Serratia Marcescens* Induces Apoptosis in Haematopoietic Cancer Cell Lines. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 585-593.

Montaner, B. and Perez-Tomas, R. (2001). Prodigiosin-Induced Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. *Life Sci.* **68**, 2025-2036.

Montaner, B. and Perez-Tomas, R. (2002). Prodigiosin Induces Caspase-9 and Caspase-8 Activation and Cytochrome C Release in Jurkat T Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**, 246-249.

Montaner, B. and Perez-Tomas, R. (2003). The Prodigiosins: A New Family of Anticancer Drugs. *Curr. Cancer. Drug Targets* **3**, 57-65.

Mora, J., Cheung, N. K., Juan, G., Illei, P., Cheung, I., Akram, M., Chi, S., Ladanyi, M., Cordon-Cardo, C. and Gerald, W. L. (2001a). Neuroblastic and Schwannian Stromal Cells of Neuroblastoma are Derived from a Tumoral Progenitor Cell. *Cancer Res.* **61**, 6892-6898.

Mora, J., Gerald, W. L., Qin, J. and Cheung, N. K. (2001b). Molecular Genetics of Neuroblastoma and the Implications for Clinical Management: A Review of the MSKCC Experience. *Oncologist* **6**, 263-268.

Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Vicencio, J. M., Criollo, A., Maiuri, M. C. and Kroemer, G. (2009). Anti- and Pro-Tumor Functions of Autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1524-1532.

Mortellaro, A., Songia, S., Gnocchi, P., Ferrari, M., Fornasiero, C., D'Alessio, R., Isetta, A., Colotta, F. and Golay, J. (1999). New Immunosuppressive Drug PNU156804 Blocks IL-2-Dependent Proliferation and NF-Kappa B and AP-1 Activation. *J. Immunol.* **162**, 7102-7109.

Mortimore, G. E. and Poso, A. R. (1986). The Lysosomal Pathway of Intracellular Proteolysis in Liver: Regulation by Amino Acids. *Adv. Enzyme Regul.* **25**, 257-276.

Muhlethaler-Mottet, A., Flahaut, M., Boursaud, K. B., Auderset, K., Meier, R., Joseph, J. M. and Gross, N. (2006). Histone Deacetylase Inhibitors Strongly Sensitise Neuroblastoma Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by a Caspases-Dependent Increase of the Pro- to Anti-Apoptotic Proteins Ratio. *BMC Cancer* **6**, 214.

Muhlethaler-Mottet, A., Meier, R., Flahaut, M., Boursaud, K. B., Nardou, K., Joseph, J. M. and Gross, N. (2008). Complex Molecular Mechanisms Cooperate to Mediate Histone Deacetylase Inhibitors Anti-Tumour Activity in Neuroblastoma Cells. *Mol. Cancer.* **7**, 55.

Mullasery, D., Dominici, C., Jesudason, E. C., McDowell, H. P. and Losty, P. D. (2009). Neuroblastoma: Contemporary Management. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **94**, 177-185.

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA Fragmentation. *Exp. Cell Res.* **256**, 12-18.

Nakagawara, M., Hanai, H. and Kajimura, M. (2004). Images in Clinical Medicine. Detection of Liver Abscesses by T1-Weighted Magnetic Resonance Imaging. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1013.

- Nakamura, A., Magae, J., Tsuji, R. F., Yamasaki, M. and Nagai, K.** (1989). Suppression of Cytotoxic T Cell Induction in Vivo by Prodigiosin 25-C. *Transplantation* **47**, 1013-1016.
- Nakamura, Y., Ozaki, T., Niizuma, H., Ohira, M., Kamijo, T. and Nakagawara, A.** (2007). Functional Characterization of a New p53 Mutant Generated by Homozygous Deletion in a Neuroblastoma Cell Line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 892-898.
- Nakashima, T., Iwashita, T., Fujita, T., Sato, E., Niwano, Y., Kohno, M., Kuwahara, S., Harada, N., Takeshita, S. and Oda, T.** (2008). A Prodigiosin Analogue Inactivates NADPH Oxidase in Macrophage Cells by Inhibiting Assembly of p47phox and Rac. *J. Biochem.* **143**, 107-115.
- Nakashima, T., Miyazaki, Y., Matsuyama, Y., Muraoka, W., Yamaguchi, K. and Oda, T.** (2006). Producing Mechanism of an Algicidal Compound Against Red Tide Phytoplankton in a Marine Bacterium Gamma-Proteobacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 684-690.
- Nakashima, T., Tamura, T., Kurachi, M., Yamaguchi, K. and Oda, T.** (2005). Apoptosis-Mediated Cytotoxicity of Prodigiosin-Like Red Pigment Produced by Gamma-Proteobacterium and its Multiple Bioactivities. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 2289-2295.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M.** (2007). Natural Products as Sources of New Drugs Over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477.
- Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F. and Wang, X.** (2003). Elimination of Mcl-1 is Required for the Initiation of Apoptosis Following Ultraviolet Irradiation. *Genes Dev.* **17**, 1475-1486.
- Nishihira, H., Toyoda, Y., Tanaka, Y., Ijiri, R., Aida, N., Takeuchi, M., Ohnuma, K., Kigasawa, H., Kato, K. and Nishi, T.** (2000). Natural Course of Neuroblastoma Detected by Mass Screening: 5-Year Prospective Study at a Single Institution. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3012-3017.

Noda, T., Fujita, N. and Yoshimori, T. (2009). The Late Stages of Autophagy: How does the End Begin? *Cell Death Differ.* **16**, 984-990.

Noh, E. J., Lim, D. S., Jeong, G. and Lee, J. S. (2009). An HDAC Inhibitor, Trichostatin A, Induces a Delay at G2/M Transition, Slippage of Spindle Checkpoint, and Cell Death in a Transcription-Dependent Manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 326-331.

Nolan, L., Johnson, P. W., Ganesan, A., Packham, G. and Crabb, S. J. (2008). Will Histone Deacetylase Inhibitors Require Combination with Other Agents to Fulfil their Therapeutic Potential? *Br. J. Cancer* **99**, 689-694.

Oberthuer, A., Skowron, M., Spitz, R., Kahlert, Y., Westermann, F., Mehler, K., Berthold, F. and Fischer, M. (2005). Characterization of a Complex Genomic Alteration on Chromosome 2p that Leads to Four Alternatively Spliced Fusion Transcripts in the Neuroblastoma Cell Lines IMR-5, IMR-5/75 and IMR-32. *Gene* **363**, 41-50.

O'Brien, S. M., Claxton, D. F., Crump, M., Faderl, S., Kipps, T., Keating, M. J., Viallet, J. and Cheson, B. D. (2009). Phase I Study of Obatoclox Mesylate (GX15-070), a Small Molecule Pan-Bcl-2 Family Antagonist, in Patients with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* **113**, 299-305.

Ocker, M. and Schneider-Stock, R. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors: Signalling Towards p21cip1/waf1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1367-1374.

Oehme, I., Deubzer, H. E., Lodrini, M., Milde, T. and Witt, O. (2009a). Targeting of HDAC8 and Investigational Inhibitors in Neuroblastoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* **18**, 1605-1617.

Oehme, I., Deubzer, H. E., Wegener, D., Pickert, D., Linke, J. P., Hero, B., Kopp-Schneider, A., Westermann, F., Ulrich, S. M., von Deimling, A. et al. (2009b). Histone Deacetylase 8 in Neuroblastoma Tumorigenesis. *Clin. Cancer Res.* **15**, 91-99.

Oh, M., Choi, I. K. and Kwon, H. J. (2008). Inhibition of Histone deacetylase1 Induces Autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 1179-1183.

Ohkuma, S., Sato, T., Okamoto, M., Matsuya, H., Arai, K., Kataoka, T., Nagai, K. and Wasserman, H. H. (1998). Prodigiosins Uncouple Lysosomal Vacuolar-Type ATPase through Promotion of H⁺/Cl⁻ Symport. *Biochem. J.* **334 (Pt 3)**, 731-741.

Ohtani, K., DeGregori, J. and Nevins, J. R. (1995). Regulation of the Cyclin E Gene by Transcription Factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 12146-12150.

Oue, T., Inoue, M., Yoneda, A., Kubota, A., Okuyama, H., Kawahara, H., Nishikawa, M., Nakayama, M. and Kawa, K. (2005). Profile of Neuroblastoma Detected by Mass Screening, Resected After Observation without Treatment: Results of the Wait and See Pilot Study. *J. Pediatr. Surg.* **40**, 359-363.

Ouwehand, K., de Ruijter, A. J., van Bree, C., Caron, H. N. and van Kuilenburg, A. B. (2005). Histone Deacetylase Inhibitor BL1521 Induces a G1-Phase Arrest in Neuroblastoma Cells through Altered Expression of Cell Cycle Proteins. *FEBS Lett.* **579**, 1523-1528.

Pandey, R., Chander, R. and Sainis, K. B. (2007). Prodigiosins: A Novel Family of Immunosuppressants with Anti-Cancer Activity. *Indian J. Biochem. Biophys.* **44**, 295-302.

Pandey, R., Chander, R. and Sainis, K. B. (2009). Prodigiosins as Anti Cancer Agents: Living Up to their Name. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 732-741.

Park, G., Tomlinson, J. T., Melvin, M. S., Wright, M. W., Day, C. S. and Manderville, R. A. (2003). Zinc and Copper Complexes of Prodigiosin: Implications for Copper-Mediated Double-Strand DNA Cleavage. *Org. Lett.* **5**, 113-116.

Passonneau, J. V. and Crites, S. K. (1976). Regulation of Glycogen Metabolism in Astrocytoma and Neuroblastoma Cells in Culture. *J. Biol. Chem.* **251**, 2015-2022.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. and Levine, B. (2005). Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* **122**, 927-939.

Pearson, A. D., Pinkerton, C. R., Lewis, I. J., Imeson, J., Ellershaw, C., Machin, D., European Neuroblastoma Study Group and Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG formerly United Kingdom Children's Cancer Study Group). (2008). High-Dose Rapid and Standard Induction Chemotherapy for Patients Aged Over 1 Year with Stage 4 Neuroblastoma: A Randomised Trial. *Lancet Oncol.* **9**, 247-256.

Perez-Tomas, R. and Montaner, B. (2003). Effects of the Proapoptotic Drug Prodigiosin on Cell Cycle-Related Proteins in Jurkat T Cells. *Histol. Histopathol.* **18**, 379-385.

Perez-Tomas, R., Montaner, B., Llagostera, E. and Soto-Cerrato, V. (2003). The Prodigiosins, Proapoptotic Drugs with Anticancer Properties. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1447-1452.

Peuchmaur, M., d'Amore, E. S., Joshi, V. V., Hata, J., Roald, B., Dehner, L. P., Gerbing, R. B., Stram, D. O., Lukens, J. N., Matthay, K. K. et al. (2003). Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: Confirmation of Favorable and Unfavorable Prognostic Subsets in Ganglioneuroblastoma, Nodular. *Cancer* **98**, 2274-2281.

Piechocki, M. P., Yoo, G. H., Dibley, S. K., Amjad, E. H. and Lonardo, F. (2006). Iressa Induces Cytostasis and Augments Fas-Mediated Apoptosis in Acinic Cell Adenocarcinoma Overexpressing HER2/neu. *Int. J. Cancer* **119**, 441-454.

Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S. and Salvesen, G. S. (2006). The Apoptosome Activates Caspase-9 by Dimerization. *Mol. Cell* **22**, 269-275.

-
- Poulaki, V., Mitsiades, N., Romero, M. E. and Tsokos, M.** (2001). Fas-Mediated Apoptosis in Neuroblastoma Requires Mitochondrial Activation and is Inhibited by FLICE Inhibitor Protein and Bcl-2. *Cancer Res.* **61**, 4864-4872.
- Prince, H. M., Bishton, M. J. and Harrison, S. J.** (2009). Clinical Studies of Histone Deacetylase Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3958-3969.
- Puisieux, A., Valsesia-Wittmann, S. and Ansieau, S.** (2006). A Twist for Survival and Cancer Progression. *Br. J. Cancer* **94**, 13-17.
- Punnonen, E. L. and Reunanen, H.** (1990). Effects of Vinblastine, Leucine, and Histidine, and 3-Methyladenine on Autophagy in Ehrlich Ascites Cells. *Exp. Mol. Pathol.* **52**, 87-97.
- PURKAYASTHA, M. and WILLIAMS, R. P.** (1960). Association of Pigment with the Cell Envelope of *Serratia Marcescens* (Chromobacterium Prodigiosum). *Nature* **187**, 349-350.
- Quadri, S. M. and Williams, R. P.** (1974). Incorporation of Amino Acid Carbon into Prodigiosin Synthesized by Nonproliferating Cells of *Serratia Marcescens*. *Can. J. Microbiol.* **20**, 461-468.
- Redlinger, R. E., Jr, Mailliard, R. B. and Barksdale, E. M., Jr.** (2004). Neuroblastoma and Dendritic Cell Function. *Semin. Pediatr. Surg.* **13**, 61-71.
- Reggiori, F. and Klionsky, D. J.** (2002). Autophagy in the Eukaryotic Cell. *Eukaryot. Cell.* **1**, 11-21.
- Ribas, J., Gomez-Arbones, X. and Boix, J.** (2005). Caspase 8/10 are Not Mediating Apoptosis in Neuroblastoma Cells Treated with CDK Inhibitory Drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **524**, 49-52.
- Rice, K. L., Hormaeche, I. and Licht, J. D.** (2007). Epigenetic Regulation of Normal and Malignant Hematopoiesis. *Oncogene* **26**, 6697-6714.

Rizzo, V., Morelli, A., Pincirolì, V., Sciangula, D. and D'Alessio, R. (1999). Equilibrium and Kinetics of Rotamer Interconversion in Immunosuppressant Prodigiosin Derivatives in Solution. *J. Pharm. Sci.* **88**, 73-78.

Rodenburg, R. J., Raats, J. M., Pruijn, G. J. and van Venrooij, W. J. (2000). Cell Death: A Trigger of Autoimmunity? *Bioessays* **22**, 627-636.

Rosato, R. R. and Grant, S. (2005). Histone Deacetylase Inhibitors: Insights into Mechanisms of Lethality. *Expert Opin. Ther. Targets* **9**, 809-824.

Rosenberg, M., Blumberger, Y., Judes, H., Bar-Ness, R., Rubinstein, E. and Mazor, Y. (1986). Cell Surface Hydrophobicity of Pigmented and Nonpigmented Clinical *Serratia Marcescens* Strains. *Infect. Immun.* **51**, 932-935.

Ross, R. A., Biedler, J. L. and Spengler, B. A. (2003). A Role for Distinct Cell Types in Determining Malignancy in Human Neuroblastoma Cell Lines and Tumors. *Cancer Lett.* **197**, 35-39.

Ross, R. A., Hein, A. M., Braca, J. A., 3rd, Spengler, B. A., Biedler, J. L. and Scammell, J. G. (2002). Glucocorticoids Induce Neuroendocrine Cell Differentiation and Increase Expression of N-Myc in N-Type Human Neuroblastoma Cells. *Oncol. Res.* **13**, 87-94.

Ross, R. A. and Spengler, B. A. (2007). Human Neuroblastoma Stem Cells. *Semin. Cancer Biol.* **17**, 241-247.

Roth, M. M. (1967). The Photosensitizing Ability of Prodigiosin. *Photochem. Photobiol.* **6**, 923-926.

Sah, N. K., Khan, Z., Khan, G. J. and Bisen, P. S. (2006). Structural, Functional and Therapeutic Biology of Survivin. *Cancer Lett.* **244**, 164-171.

Sano, H., Bonadio, J., Gerbing, R. B., London, W. B., Matthay, K. K., Lukens, J. N. and Shimada, H. (2006). International Neuroblastoma Pathology Classification Adds Independent Prognostic Information Beyond the Prognostic Contribution of Age. *Eur. J. Cancer* **42**, 1113-1119.

Sato, T., Konno, H., Tanaka, Y., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H. H. and Ohkuma, S. (1998). Prodigiosins as a New Group of H⁺/Cl⁻ Symporters that Uncouple Proton Translocators. *J. Biol. Chem.* **273**, 21455-21462.

Savill, J. and Fadok, V. (2000). Corpse Clearance Defines the Meaning of Cell Death. *Nature* **407**, 784-788.

Schroder, J. K., Seidelmann, M., Kirch, H. C., Seeber, S. and Schutte, J. (1998). Assessment of Resistance Induction to Cytosine Arabinoside Following Transfer and Overexpression of the Deoxycytidylate Deaminase Gene in Vitro. *Leuk. Res.* **22**, 619-624.

Scott, S. V., Baba, M., Ohsumi, Y. and Klionsky, D. J. (1997). Aminopeptidase I is Targeted to the Vacuole by a Nonclassical Vesicular Mechanism. *J. Cell Biol.* **138**, 37-44.

Scotting, P. J., Walker, D. A. and Perilongo, G. (2005). Childhood Solid Tumours: A Developmental Disorder. *Nat. Rev. Cancer.* **5**, 481-488.

Shankar, S. and Srivastava, R. K. (2008). Histone Deacetylase Inhibitors: Mechanisms and Clinical Significance in Cancer: HDAC Inhibitor-Induced Apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **615**, 261-298.

Shao, Y., Gao, Z., Marks, P. A. and Jiang, X. (2004). Apoptotic and Autophagic Cell Death Induced by Histone Deacetylase Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 18030-18035.

Sherr, C. J. and McCormick, F. (2002). The RB and p53 Pathways in Cancer. *Cancer. Cell.* **2**, 103-112.

- Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J., Joshi, V. V. and Roald, B.** (1999a). Terminology and Morphologic Criteria of Neuroblastic Tumors: Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* **86**, 349-363.
- Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J., Joshi, V. V., Roald, B., Stram, D. O., Gerbing, R. B., Lukens, J. N., Matthay, K. K. et al.** (1999b). The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer* **86**, 364-372.
- Shimada, H., Chatten, J., Newton, W. A., Jr, Sachs, N., Hamoudi, A. B., Chiba, T., Marsden, H. B. and Misugi, K.** (1984). Histopathologic Prognostic Factors in Neuroblastic Tumors: Definition of Subtypes of Ganglioneuroblastoma and an Age-Linked Classification of Neuroblastomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **73**, 405-416.
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T. and Ohsumi, Y.** (1999). Apg10p, a Novel Protein-Conjugating Enzyme Essential for Autophagy in Yeast. *EMBO J.* **18**, 5234-5241.
- Shrode, L. D., Tapper, H. and Grinstein, S.** (1997). Role of Intracellular pH in Proliferation, Transformation, and Apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 393-399.
- Simms-Waldrip, T., Rodriguez-Gonzalez, A., Lin, T., Ikeda, A. K., Fu, C. and Sakamoto, K. M.** (2008). The Aggresome Pathway as a Target for Therapy in Hematologic Malignancies. *Mol. Genet. Metab.* **94**, 283-286.
- Simonsson, M., Heldin, C. H., Ericsson, J. and Gronroos, E.** (2005). The Balance between Acetylation and Deacetylation Controls Smad7 Stability. *J. Biol. Chem.* **280**, 21797-21803.
- Simpson, C. D., Anyiwe, K. and Schimmer, A. D.** (2008). Anoikis Resistance and Tumor Metastasis. *Cancer Lett.* **272**, 177-185.

Songia, S., Mortellaro, A., Taverna, S., Fornasiero, C., Scheiber, E. A., Erba, E., Colotta, F., Mantovani, A., Isetta, A. M. and Golay, J. (1997). Characterization of the New Immunosuppressive Drug Undecylprodigiosin in Human Lymphocytes: Retinoblastoma Protein, Cyclin-Dependent Kinase-2, and Cyclin-Dependent Kinase-4 as Molecular Targets. *J. Immunol.* **158**, 3987-3995.

Soto-Cerrato, V., Llagostera, E., Montaner, B., Scheffer, G. L. and Perez-Tomas, R. (2004). Mitochondria-Mediated Apoptosis Operating Irrespective of Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells by the Anticancer Agent Prodigiosin. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1345-1352.

Soto-Cerrato, V., Vinals, F., Lambert, J. R., Kelly, J. A. and Perez-Tomas, R. (2007a). Prodigiosin Induces the Proapoptotic Gene NAG-1 Via Glycogen Synthase Kinase-3beta Activity in Human Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer. Ther.* **6**, 362-369.

Soto-Cerrato, V., Vinals, F., Lambert, J. R. and Perez-Tomas, R. (2007b). The Anticancer Agent Prodigiosin Induces p21WAF1/CIP1 Expression Via Transforming Growth Factor-Beta Receptor Pathway. *Biochem. Pharmacol.* **74**, 1340-1349.

Spengler, B. A., Lazarova, D. L., Ross, R. A. and Biedler, J. L. (1997). Cell Lineage and Differentiation State are Primary Determinants of MYCN Gene Expression and Malignant Potential in Human Neuroblastoma Cells. *Oncol. Res.* **9**, 467-476.

Spitz, R., Hero, B., Ernestus, K. and Berthold, F. (2003). Gain of Distal Chromosome Arm 17q is Not Associated with Poor Prognosis in Neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 4835-4840.

Spurgers, K. B., Chari, N. S., Bohnenstiehl, N. L. and McDonnell, T. J. (2006). Molecular Mediators of Cell Death in Multistep Carcinogenesis: A Path to Targeted Therapy. *Cell Death Differ.* **13**, 1360-1370.

Stepkowski, S. M., Erwin-Cohen, R. A., Behbod, F., Wang, M. E., Qu, X., Tejpal, N., Nagy, Z. S., Kahan, B. D. and Kirken, R. A. (2002). Selective Inhibitor of Janus Tyrosine Kinase 3, PNU156804, Prolongs Allograft Survival and Acts Synergistically with Cyclosporine but Additively with Rapamycin. *Blood* **99**, 680-689.

Stevens, C. and La Thangue, N. B. (2004). The Emerging Role of E2F-1 in the DNA Damage Response and Checkpoint Control. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1071-1079.

Strasser, A. (2005). The Role of BH3-Only Proteins in the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 189-200.

Strieder, V. and Lutz, W. (2003). E2F Proteins Regulate MYCN Expression in Neuroblastomas. *J. Biol. Chem.* **278**, 2983-2989.

Stromhaug, P. E., Berg, T. O., Fengsrud, M. and Seglen, P. O. (1998). Purification and Characterization of Autophagosomes from Rat Hepatocytes. *Biochem. J.* **335 (Pt 2)**, 217-224.

Stromhaug, P. E. and Klionsky, D. J. (2001). Approaching the Molecular Mechanism of Autophagy. *Traffic* **2**, 524-531.

Subramanian, C., Jarzembowski, J. A., Opiari, A. W., Jr, Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2007). CREB-Binding Protein is a Mediator of Neuroblastoma Cell Death Induced by the Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A. *Neoplasia* **9**, 495-503.

Subramanian, C., Opiari, A. W., Jr, Bian, X., Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2005a). Ku70 Acetylation Mediates Neuroblastoma Cell Death Induced by Histone Deacetylase Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4842-4847.

Subramanian, C., Opiari, A. W., Jr, Castle, V. P. and Kwok, R. P. (2005b). Histone Deacetylase Inhibition Induces Apoptosis in Neuroblastoma. *Cell. Cycle* **4**, 1741-1743.

Sugimoto, T., Kato, T., Sawada, T., Horii, Y., Kemshead, J. T., Hino, T., Morioka, H. and Hosoi, H. (1988). Schwannian Cell Differentiation of Human Neuroblastoma Cell Lines in Vitro Induced by Bromodeoxyuridine. *Cancer Res.* **48**, 2531-2537.

Sugimoto, T., Mine, H., Horii, Y., Takahashi, K., Nagai, R., Morishita, R., Komada, M., Asada, Y. and Sawada, T. (2000). Neuroblastoma Cell Lines Showing Smooth Muscle Cell Phenotypes. *Diagn. Mol. Pathol.* **9**, 221-228.

Sulston, J. E. (1976). Post-Embryonic Development in the Ventral Cord of *Caenorhabditis Elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **275**, 287-297.

Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. and Ohsumi, Y. (2001a). The Pre-Autophagosomal Structure Organized by Concerted Functions of APG Genes is Essential for Autophagosome Formation. *EMBO J.* **20**, 5971-5981.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. and Takahashi, R. (2001b). A Serine Protease, HtrA2, is Released from the Mitochondria and Interacts with XIAP, Inducing Cell Death. *Mol. Cell* **8**, 613-621.

Taddei, A., Roche, D., Bickmore, W. A. and Almouzni, G. (2005). The Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Heterochromatin: Implications for Anticancer Therapy? *EMBO Rep.* **6**, 520-524.

Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G. B. and Kondo, S. (2005). Synergistic Augmentation of Rapamycin-Induced Autophagy in Malignant Glioma Cells by Phosphatidylinositol 3-kinase/protein Kinase B Inhibitors. *Cancer Res.* **65**, 3336-3346.

Takita, J., Yang, H. W., Bessho, F., Hanada, R., Yamamoto, K., Kidd, V., Teitz, T., Wei, T. and Hayashi, Y. (2000). Absent Or Reduced Expression of the Caspase 8 Gene Occurs Frequently in

Neuroblastoma, but Not Commonly in Ewing Sarcoma Or Rhabdomyosarcoma. *Med. Pediatr. Oncol.* **35**, 541-543.

Takita, J., Yang, H. W., Chen, Y. Y., Hanada, R., Yamamoto, K., Teitz, T., Kidd, V. and Hayashi, Y. (2001). Allelic Imbalance on Chromosome 2q and Alterations of the Caspase 8 Gene in Neuroblastoma. *Oncogene* **20**, 4424-4432.

Taloczy, Z., Jiang, W., Virgin, H. W., Leib, D. A., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Eskelinen, E. L. and Levine, B. (2002). Regulation of Starvation- and Virus-Induced Autophagy by the eIF2alpha Kinase Signaling Pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 190-195.

Tan, M. L., Ooi, J. P., Ismail, N., Moad, A. I. and Muhammad, T. S. (2009). Programmed Cell Death Pathways and Current Antitumor Targets. *Pharm. Res.* **26**, 1547-1560.

Tanida, I., Ueno, T. and Kominami, E. (2004). LC3 Conjugation System in Mammalian Autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2503-2518.

Teitz, T., Lahti, J. M. and Kidd, V. J. (2001). Aggressive Childhood Neuroblastomas do Not Express Caspase-8: An Important Component of Programmed Cell Death. *J. Mol. Med.* **79**, 428-436.

Teitz, T., Wei, T., Valentine, M. B., Vanin, E. F., Grenet, J., Valentine, V. A., Behm, F. G., Look, A. T., Lahti, J. M. and Kidd, V. J. (2000). Caspase 8 is Deleted Or Silenced Preferentially in Childhood Neuroblastomas with Amplification of MYCN. *Nat. Med.* **6**, 529-535.

Thiagalingam, S., Cheng, K. H., Lee, H. J., Mineva, N., Thiagalingam, A. and Ponte, J. F. (2003). Histone Deacetylases: Unique Players in Shaping the Epigenetic Histone Code. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **983**, 84-100.

Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.

Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A. and Harel-Bellan, A. (2001). Histone Acetylation and Disease. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 728-736.

Trudel, S., Li, Z. H., Rauw, J., Tiedemann, R. E., Wen, X. Y. and Stewart, A. K. (2007). Preclinical Studies of the Pan-Bcl Inhibitor Obatoclax (GX015-070) in Multiple Myeloma. *Blood* **109**, 5430-5438.

Tsuji, R. F., Magae, J., Yamashita, M., Nagai, K. and Yamasaki, M. (1992). Immunomodulating Properties of Prodigiosin 25-C, an Antibiotic which Preferentially Suppresses Induction of Cytotoxic T Cells. *J. Antibiot. (Tokyo)* **45**, 1295-1302.

Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P. C. and Croce, C. M. (1984). Molecular Cloning of the Chromosomal Breakpoint of B-Cell Lymphomas and Leukemias with the t(11;14) Chromosome Translocation. *Science* **224**, 1403-1406.

Tsunamoto, K., Todo, S., Imashuku, S. and Kato, K. (1988). Induction of S 100 Protein by 5-Bromo-2'-Deoxyuridine in Human Neuroblastoma Cell Lines. *Cancer Res.* **48**, 170-174.

Umehara, S., Nakagawa, A., Matthay, K. K., Lukens, J. N., Seeger, R. C., Stram, D. O., Gerbing, R. B. and Shimada, H. (2000). Histopathology Defines Prognostic Subsets of Ganglioneuroblastoma, Nodular. *Cancer* **89**, 1150-1161.

Ungerstedt, J. S., Sowa, Y., Xu, W. S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Ngo, L., Holmgren, A., Jiang, X. and Marks, P. A. (2005). Role of Thioredoxin in the Response of Normal and Transformed Cells to Histone Deacetylase Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 673-678.

Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A. C., Combaret, V., Krause, A., Leissner, P. and Puisieux, A. (2004). Oncogenic Cooperation between H-Twist and N-Myc Overrides Failsafe Programs in Cancer Cells. *Cancer. Cell.* **6**, 625-630.

Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R. and Verma, I. M. (1996). Suppression of TNF-Alpha-Induced Apoptosis by NF-kappaB. *Science* **274**, 787-789.

Van Loo, G., Demol, H., van Gurp, M., Hoorelbeke, B., Schotte, P., Beyaert, R., Zhivotovsky, B., Gevaert, K., Declercq, W., Vandekerckhove, J. et al. (2002). A Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Post-Source Decay (MALDI-PSD) Analysis of Proteins Released from Isolated Liver Mitochondria Treated with Recombinant Truncated Bid. *Cell Death Differ.* **9**, 301-308.

van Noesel, M. M., van Bezouw, S., Voute, P. A., Herman, J. G., Pieters, R. and Versteeg, R. (2003). Clustering of Hypermethylated Genes in Neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **38**, 226-233.

van Noesel, M. M. and Versteeg, R. (2004). Pediatric Neuroblastomas: Genetic and Epigenetic 'Danse Macabre'. *Gene* **325**, 1-15.

Van Roy, N., De Preter, K., Hoebeeck, J., Van Maerken, T., Pattyn, F., Mestdagh, P., Vermeulen, J., Vandesompele, J. and Speleman, F. (2009). The Emerging Molecular Pathogenesis of Neuroblastoma: Implications for Improved Risk Assessment and Targeted Therapy. *Genome Med.* **1**, 74.

Van Waes, C. (2007). Nuclear Factor-kappaB in Development, Prevention, and Therapy of Cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1076-1082.

Vaux, D. L., Cory, S. and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 Gene Promotes Haemopoietic Cell Survival and Cooperates with c-Myc to Immortalize Pre-B Cells. *Nature* **335**, 440-442.

Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* **102**, 43-53.

- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. R.** (1991). Tetrazolium-Based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Res.* **51**, 2515-2520.
- Walensky, L. D.** (2006). BCL-2 in the Crosshairs: Tipping the Balance of Life and Death. *Cell Death Differ.* **13**, 1339-1350.
- Walton, J. D., Kattan, D. R., Thomas, S. K., Spengler, B. A., Guo, H. F., Biedler, J. L., Cheung, N. K. and Ross, R. A.** (2004). Characteristics of Stem Cells from Human Neuroblastoma Cell Lines and in Tumors. *Neoplasia* **6**, 838-845.
- Wang, H. and Dymock, B. W.** (2009). New Patented Histone Deacetylase Inhibitors. *Expert Opin. Ther. Pat.* **19**, 1727-1757.
- Wang, Z. M., Hu, J., Zhou, D., Xu, Z. Y., Panasci, L. C. and Chen, Z. P.** (2002). Trichostatin A Inhibits Proliferation and Induces Expression of p21WAF and p27 in Human Brain Tumor Cell Lines. *Ai Zheng* **21**, 1100-1105.
- Watanabe, M., Adachi, S., Matsubara, H., Imai, T., Yui, Y., Mizushima, Y., Hiraumi, Y., Watanabe, K., Kamitsuji, Y., Toyokuni, S. Y. et al.** (2009). Induction of Autophagy in Malignant Rhabdoid Tumor Cells by the Histone Deacetylase Inhibitor FK228 through AIF Translocation. *Int. J. Cancer* **124**, 55-67.
- Wei, Y., Sinha, S. and Levine, B.** (2008). Dual Role of JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 in Autophagy and Apoptosis Regulation. *Autophagy* **4**, 949-951.
- Weinberg, R. A.** (1995). The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* **81**, 323-330.
- Weinberg, R. A.** (2007). *The Biology of Cancer*: Book Garland Science.

- Wenzel, A. and Schwab, M.** (1995). The mycN/max Protein Complex in Neuroblastoma. Short Review. *Eur. J. Cancer* **31A**, 516-519.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Leeper, F. J. and Salmond, G. P.** (2006). The Biosynthesis and Regulation of Bacterial Prodiginines. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 887-899.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Lodrini, M., Milde, T. and Oehme, I.** (2009a). Targeting Histone Deacetylases in Neuroblastoma. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 436-447.
- Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T. and Oehme, I.** (2009b). HDAC Family: What are the Cancer Relevant Targets? *Cancer Lett.* **277**, 8-21.
- Wullschlegel, S., Loewith, R. and Hall, M. N.** (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **124**, 471-484.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. and Currie, A. R.** (1980). Cell Death: The Significance of Apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
- Xie, Z. and Klionsky, D. J.** (2007). Autophagosome Formation: Core Machinery and Adaptations. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1102-1109.
- Xu, W. S., Parmigiani, R. B. and Marks, P. A.** (2007). Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular Mechanisms of Action. *Oncogene* **26**, 5541-5552.
- Yamaguchi, K., Liggett, J. L., Kim, N. C. and Baek, S. J.** (2006). Anti-Proliferative Effect of Horehound Leaf and Wild Cherry Bark Extracts on Human Colorectal Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **15**, 275-281.
- Yamamoto, C., Takemoto, H., Kuno, K., Yamamoto, D., Nakai, K., Baden, T., Kamata, K., Hirata, H., Watanabe, T. and Inoue, K.** (2001). Cycloprodiginosin Hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ Symporter, Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cell Lines in Vitro. *Oncol. Rep.* **8**, 821-824.

- Yamamoto, C., Takemoto, H., Kuno, K., Yamamoto, D., Tsubura, A., Kamata, K., Hirata, H., Yamamoto, A., Kano, H., Seki, T. et al.** (1999). Cycloprodigosin Hydrochloride, a New H(+)/Cl(-) Symporter, Induces Apoptosis in Human and Rat Hepatocellular Cancer Cell Lines in Vitro and Inhibits the Growth of Hepatocellular Carcinoma Xenografts in Nude Mice. *Hepatology* **30**, 894-902.
- Yamamoto, D., Tanaka, K., Nakai, K., Baden, T., Inoue, K., Yamamoto, C., Takemoto, H., Kamato, K., Hirata, H., Morikawa, S. et al.** (2002). Synergistic Effects Induced by Cycloprodigosin Hydrochloride and Epirubicin on Human Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **72**, 1-10.
- Yamamoto, D., Uemura, Y., Tanaka, K., Nakai, K., Yamamoto, C., Takemoto, H., Kamata, K., Hirata, H. and Hioki, K.** (2000). Cycloprodigosin Hydrochloride, H(+)/CL(-) Symporter, Induces Apoptosis and Differentiation in HL-60 Cells. *Int. J. Cancer* **88**, 121-128.
- Yamamoto, S., Tanaka, K., Sakimura, R., Okada, T., Nakamura, T., Li, Y., Takasaki, M., Nakabeppu, Y. and Iwamoto, Y.** (2008). Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Induces Apoptosis Or Autophagy-Associated Cell Death in Chondrosarcoma Cell Lines. *Anticancer Res.* **28**, 1585-1591.
- Yang, B., Britton, J. and Kirchmaier, A. L.** (2008). Insights into the Impact of Histone Acetylation and Methylation on Sir Protein Recruitment, Spreading, and Silencing in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **381**, 826-844.
- Yorimitsu, T. and Klionsky, D. J.** (2005). Autophagy: Molecular Machinery for Self-Eating. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 2**, 1542-1552.
- Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M. and Mak, T. W.** (1998). Apaf1 is Required for Mitochondrial Pathways of Apoptosis and Brain Development. *Cell* **94**, 739-750.

- Yoshida, M.** (2004). Assay for Inhibitory Activity of Histone Deacetylase. *Gan To Kagaku Ryoho* **31**, 507-511.
- Youle, R. J. and Strasser, A.** (2008). The BCL-2 Protein Family: Opposing Activities that Mediate Cell Death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 47-59.
- Yuste, V. J., Bayascas, J. R., Llecha, N., Sanchez-Lopez, I., Boix, J. and Comella, J. X.** (2001). The Absence of Oligonucleosomal DNA Fragmentation during Apoptosis of IMR-5 Neuroblastoma Cells: Disappearance of the Caspase-Activated DNase. *J. Biol. Chem.* **276**, 22323-22331.
- Zage, P. E., Kletzel, M., Murray, K., Marcus, R., Castleberry, R., Zhang, Y., London, W. B., Kretschmar, C. and Children's Oncology Group.** (2008). Outcomes of the POG 9340/9341/9342 Trials for Children with High-Risk Neuroblastoma: A Report from the Children's Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer.* **51**, 747-753.
- Zeng, M. and Zhou, J. N.** (2008). Roles of Autophagy and mTOR Signaling in Neuronal Differentiation of Mouse Neuroblastoma Cells. *Cell. Signal.* **20**, 659-665.
- Zhang, C., Richon, V., Ni, X., Talpur, R. and Duvic, M.** (2005a). Selective Induction of Apoptosis by Histone Deacetylase Inhibitor SAHA in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells: Relevance to Mechanism of Therapeutic Action. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 1045-1052.
- Zhang, J., Shen, Y., Liu, J. and Wei, D.** (2005b). Antimetastatic Effect of Prodigiosin through Inhibition of Tumor Invasion. *Biochem. Pharmacol.* **69**, 407-414.
- Zhang, Y. and Reinberg, D.** (2001). Transcription Regulation by Histone Methylation: Interplay between Different Covalent Modifications of the Core Histone Tails. *Genes Dev.* **15**, 2343-2360.

Zhao, Y., Tan, J., Zhuang, L., Jiang, X., Liu, E. T. and Yu, Q. (2005). Inhibitors of Histone Deacetylases Target the Rb-E2F1 Pathway for Apoptosis Induction through Activation of Proapoptotic Protein Bim. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16090-16095.

Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2005). Caspase-2 Function in Response to DNA Damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 859-867.

Zitvogel, L., Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. and Kroemer, G. (2008). Immunological Aspects of Anticancer Chemotherapy. *Bull. Acad. Natl. Med.* **192**, 1469-87; discussion 1487-9.

Publicacions

