



**Programa de doctorado de Biología Funcional y Molecular**

**Departamento de Biología Funcional**

**Universidad de Oviedo**

# **Estudio de la acción antitumoral de diversos derivados de la Mitramicina A**

**Tesis doctoral**

**Azahara Fernández Guizán**

**Oviedo, 2013**



**Programa de doctorado de Biología Funcional y Molecular**

**Departamento de Biología Funcional**

**Universidad de Oviedo**

# **Estudio de la acción antitumoral de diversos derivados de la Mitramicina A**

**Tesis doctoral**

**Azahara Fernández Guizán**

**Oviedo, 2013**

## RESUMEN

La mitramicina A (MTA) es un producto natural derivado de *Streptomyces argillaceus*, que aunque posee importantes características antitumorales, se encuentra en desuso debido a su toxicidad. La empresa Entrechem ha producido diversos derivados de la MTA con el fin de obtener un compuesto que conserve o mejore las capacidades antitumorales de la MTA y que sea menos tóxico. En esta tesis evaluamos una serie de análogos, obteniendo que uno de ellos, denominado DIG-MSK, presenta muy baja toxicidad en células sanas. Es además, un compuesto que presenta un perfil de captación similar al de la MTA, aunque su unión al ADN se produce de forma más débil y con características diferentes. Dentro de las propiedades de este compuesto, se encuentra la inhibición de la expresión de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 y de la transcripción mediada por ellos, y la inhibición de la expresión de diversos proto-oncogenes. DIG-MSK es capaz de inhibir la supervivencia de células tumorales de ovario, mediante el aumento de la apoptosis y detener el ciclo celular en la fase G1. Esta parada en fase G1 se correlaciona con la represión de la expresión de las moléculas CDK6 y ciclina D2. Mas aún, DIG-MSK es un potente inhibidor de la formación de vasos sanguíneos, e inhibe la expresión de diversos factores angiogénicos, entre los cuales destacan los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGFR1 y VEGFR2. Todas estas características junto con su baja toxicidad, hacen de DIG-MSK un buen candidato para posibles aplicaciones terapéuticas en el tratamiento del cáncer.



*"La felicidad puede ser encontrada, incluso en los momentos más oscuros,  
solo si uno recuerda encender la luz"*

J.K. Rowling

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
Cáncer.....	5
Autosuficiencia de señales de proliferación.....	6
Ciclo celular.....	7
Insensibilidad a señales antiproliferativas.....	12
Evasión de la muerte celular programada.....	12
Ilimitado potencial de replicación.....	15
Angiogénesis.....	16
Factores proangiogénicos.....	19
Factores antiangiogénicos.....	22
Invasión tisular y metástasis.....	24
Microambiente tumoral.....	24
Modificaciones metabólicas.....	25
Cáncer de ovario.....	26
Tratamiento del cáncer.....	28
Mitramicina A.....	32
Sp1.....	34
OBJETIVOS.....	36
MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
<i>Material</i> .....	39
Cultivo de líneas celulares.....	39
Células mononucleares de sangre periférica.....	40
Anticuerpos empleados.....	40
Plásmidos y vectores de expresión.....	41
Mitramicinas y otros materiales.....	41

<i>Técnicas de Biología molecular</i> .....	42
Cultivo de bacterias y transformación de <i>Escherichia coli</i> con plásmidos.....	42
Purificación de DNA plasmídico .....	42
Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) semi-cuantitativa .....	42
Análisis inmunocitofluorescentes .....	43
Western-blot.....	44
<i>Técnicas de Biología Celular</i> .....	45
Ensayos de captación .....	45
Ensayos de supervivencia celular.....	45
Proliferación celular con CFSE.....	45
Determinación del estadio del ciclo celular .....	45
Ensayos de apoptosis.....	46
Ensayos de migración.....	46
Ensayos de la formación de capilares .....	47
Transfección transitoria y ensayo de la actividad luciferasa.....	47
Análisis estadístico.....	48
RESULTADOS .....	51
Las modificaciones estructurales de los derivados de la MTA no conllevan una modificación en su patrón de captación.....	52
Los cambios estructurales que presentan MSK y DIG-MSK alteran su especificidad de unión al ADN con respecto a la MTA .....	54
DIG-MSK es un potente inhibidor de la transcripción mediada por Sp1 y de la expresión de Sp1 .....	55
Regulación de protooncogenes por la MTA y el DIG-MSK.....	58
DIG-MSK es un inhibidor más potente que la MTA de la expresión de <i>Sp3</i> y de la transcripción mediada por Sp3 .....	60
Efecto de la MTA y el DIG-MSK en la supervivencia de líneas tumorales.....	62
La MTA y el DIG-MSK inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis en células de cáncer de ovario .....	65

MTA y DIG-MSK inhiben la progresión del ciclo celular en células tumorales de ovario .....	67
MTA y DIG-MSK inhiben la expresión de <i>CDK6</i> y <i>CCND2</i> .....	71
MTA y DIG-MSK inhiben la supervivencia y aumentan la apoptosis de las líneas endoteliales HUVEC y H-MEC-1 .....	74
MTA y DIG-MSK inhiben la proliferación celular y detienen el ciclo celular en las líneas endoteliales .....	76
Efecto de la MTA y DIG-MSK sobre la migración de células endoteliales y la formación de vasos sanguíneos.....	78
MTA y DIG-MSK regulan la expresión de genes pro- y anti-angiogénicos .....	80
DISCUSIÓN.....	83
Mecanismo de acción.....	85
Eficacia .....	90
Efectos antitumorales.....	90
Efectos anti-angiogénicos .....	93
Futuros ensayos.....	97
CONCLUSIONES.....	100
BIBLIOGRAFÍA .....	102



## **INTRODUCCIÓN**

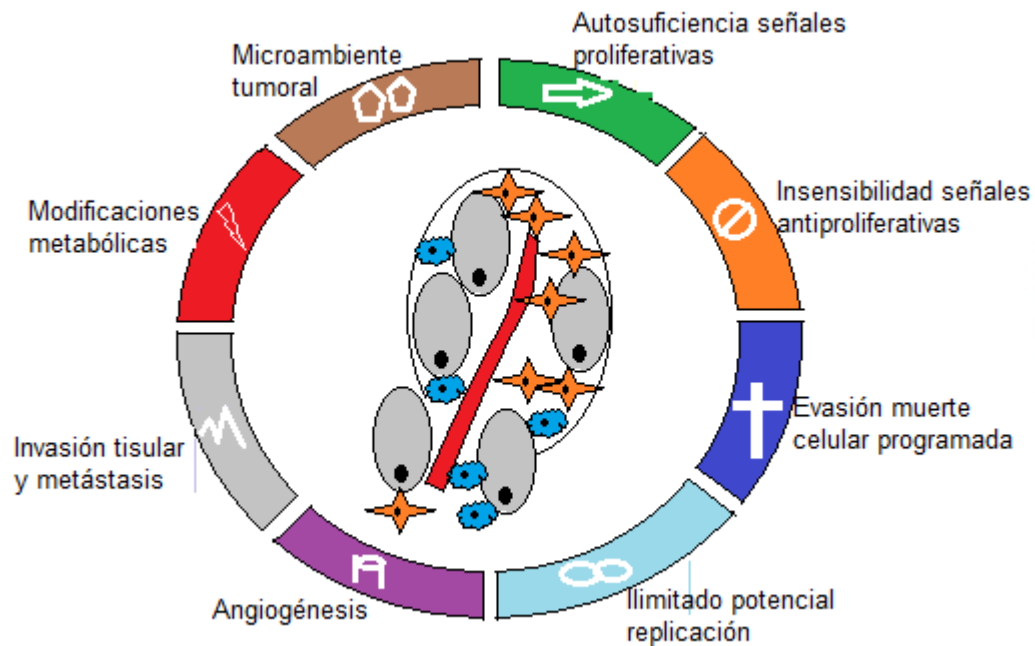
## Cáncer

El cáncer es una enfermedad neoplásica con transformación de células que proliferan de manera anormal e incontrolada. Con el tiempo invaden de forma progresiva órganos próximos o incluso, órganos y tejidos más distantes extendiéndose por vía linfática o hematológica. El término cáncer no engloba a una sola enfermedad, sino a más de 100 tipos de enfermedades distintas que se podrían agrupar en categorías con respecto a su origen: carcinoma (procedente de epitelios y mucosas), sarcoma (deriva de tejido conjuntivo o de sostén), leucemia (cáncer proveniente de la médula ósea), linfoma y mieloma (derivan del sistema inmunitario) y cánceres del sistema nervioso central.

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en el mundo, causando cerca del 13% de todas las muertes. Su importancia va en aumento, ya que la primera causa de mortalidad, que son las enfermedades cardiovasculares, tiende en los últimos años a descender el número de fallecimientos que provocan. Puede afectar a todas las edades, pero el riesgo de sufrir los tipos más comunes se incrementa con la edad. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer (American Cancer Society, 2012), la primera causa de cáncer es el tabaquismo, seguida por la mala alimentación, el exceso de peso y la falta de actividad física. Dentro de los tipos de cáncer, cabe destacar que las tasas de cáncer colorrectal disminuyeron desde 2008, mientras que el de mama se mantuvo y aumentaron los de páncreas, riñón, tiroides, hígado y melanoma. En este mismo informe se recoge que se ha acentuado la disparidad entre grupos raciales y étnicos, en cuanto al padecimiento y mortalidad que provocan los distintos tipos de cánceres.

Las células normales se convierten en células tumorales debido a una acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que les confieren propiedades de crecimiento autosuficiente e ilimitado y resistencia a los mecanismos reguladores homeostáticos. Durante las últimas décadas, se ha demostrado la implicación de ciertos grupos de genes denominados protooncogenes y proteínas supresoras de tumor, en el desarrollo del proceso cancerígeno, tanto *in vitro* como *in vivo* (Hunder T, 1991; Bishop J.M. y Weinberg R.A., 1996). Las modificaciones que sufren estos genes y su transmisión a lo largo de la línea germinal son los principales responsables de la transformación de una célula normal a maligna.

En definitiva, para que se desarrolle un tumor debe producirse una modificación en una serie de procesos esenciales que Hanahan y Weinberg agrupan en seis procesos fundamentales que detallaremos a continuación: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales de anticrecimiento, evasión de la muerte celular programada, ilimitado potencial de replicación, angiogénesis e invasión tisular y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).



**Figura 1. Capacidades adquiridas en cáncer.** La mayoría de los cánceres, según Hanahan y Weinberg, adquieren una serie de capacidades durante su desarrollo que albergan diferentes estrategias. Entre ellas, la producción de señales de crecimiento propias y la evasión de señales antiproliferativas junto con el ilimitado potencial de replicación y la evasión de la muerte celular programada, que les permiten crecer continuamente. Por su parte la angiogénesis y la invasión tisular y metástasis, les permiten diseminarse por nuevos tejidos y las modificaciones metabólicas y del microambiente tumoral les capacitan para conseguir todos los nutrientes y factores necesarios para su desarrollo y mantenimiento. Figura modificada de Hanahan y Weinberg, 2011.

### Autosuficiencia de señales de proliferación

Las células normales requieren señales de proliferación mitóticas que les permitan pasar del estado quiescente en el que se encuentran a un estado proliferativo activo. Estas señales se transducen a la célula mediante la unión a receptores de membrana que reconocen factores de crecimiento solubles, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión a otras células. Se ha demostrado que las células tumorales son

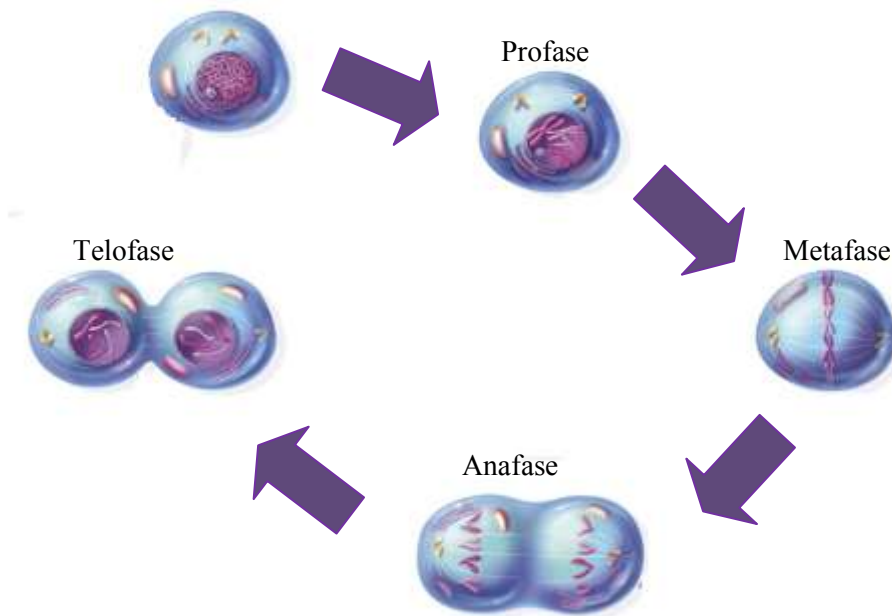
capaces de generar sus propias señales de crecimiento, reduciendo de esta forma su dependencia de la estimulación externa (Fedi y cols., 1997). Además, se ha observado que son capaces de sobreexpresar los receptores de estas señales de crecimiento para favorecer la transmisión de señales de crecimiento (Lukashev y Werb, 1998), de forma autocrina. También son capaces de estimular a las células estromales asociadas al tumor para que produzcan y provean a las células tumorales con señales de crecimiento (Bhowmick y cols, 2004). Otro de los mecanismos involucrados en este proceso de generación de señales de crecimiento propias es la alteración de las cascadas de reacciones que siguen a la activación de los receptores. Debido a que existen diferentes rutas de señalización que se originan a partir de un mismo receptor, en algunas células neoplásicas se producen modificaciones que promueven que sólo se active una determinada ruta metabólica, que será la más beneficiosa para el desarrollo tumoral. Este es el caso del oncogen *RAS*, un transductor de señales que transmite una cascada específica tras la activación de receptores (Hanahan y Weinberg, 2011).

### **Ciclo celular**

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento y división de una célula en dos células hijas. Consta de dos etapas: interfase, periodo comprendido entre divisiones celulares, y la etapa M o fase de división. La interfase está compuesta por las fases  $G_1$ , en la que ocurre el crecimiento de la célula que va a dividirse acompañado de síntesis de proteínas y de ácido ribonucleico (ARN), con una duración de entre 6 y 12 horas; la fase S o fase de síntesis del ADN en la que se duplican los cromosomas y el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ácido desoxiribonucleico (ADN); y la fase  $G_2$  en la cual continúa la síntesis de proteínas y ARN. Esta fase termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis.

La denominada etapa M agrupa la división del material genético nuclear (mitosis o meiosis) y la división del citoplasma (citocinesis). Se divide en cuatro fases denominadas: profase, metafase, anafase y telofase. La profase es la fase en la cual el nucleolo desaparece y la cromatina se condensa formando cromosomas. Los dos pares de centriolos se separan hacia los polos opuestos a partir de los cuales se forman unas fibras denominadas áster que forman el huso mitótico. Durante la metafase, los cromosomas se unen en el plano ecuatorial al huso mitótico por el centrómero formando

la placa metafásica. En la anafase las cromátidas hermanas se separan a polos opuestos. En la última fase, la telofase, la cromatina vuelve a descondensarse y aparecen las nuevas envueltas nucleolares. Las células se elongan y ocurre la citocinesis mediante la creación de un anillo contráctil de actina y miosina.



**Figura 2. Esquema representativo de la mitosis.** El ciclo celular se divide en dos fases: la denominada interfase en la cual la célula duplica su material genético y prepara la maquinaria para la división; y la fase de mitosis en la cual la célula se divide. La mitosis está a su vez constituida por 4 fases: profase, en la que la cromatina se condensa en cromosomas y desaparece la envoltura nuclear; metafase, en la cual los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial; anafase, en la cual las cromátidas hermanas se separan y el centrómero se divide y telofase, en la cual la cromatina se expande y el citoplasma se divide (cariocinesis). Imagen adaptada de una obtenida en la revista “How it works”.

El ciclo celular es un proceso altamente controlado. En el cambio de una fase a otra del ciclo la célula comprueba que se cumplan las condiciones para pasar a la etapa siguiente, de tal forma que si no se cumplen estas condiciones el ciclo se detiene (Lodish y cols., 2005). Existen cuatro puntos de control principales: paso de  $G_0$  a  $G_1$ , que es el inicio de la proliferación, transición de  $G_1$  a S para el inicio de la replicación, paso de  $G_2$  a M, donde se inicia la mitosis y el avance de metafase a anafase.

Los genes que regulan el ciclo celular se dividen en tres grandes grupos: genes que codifican proteínas necesarias para la ejecución del ciclo celular, genes que codifican proteínas que regulan positivamente el avance del ciclo celular y genes que regulan las proteínas que inhiben el ciclo celular (Graña X. y cols, 1995).

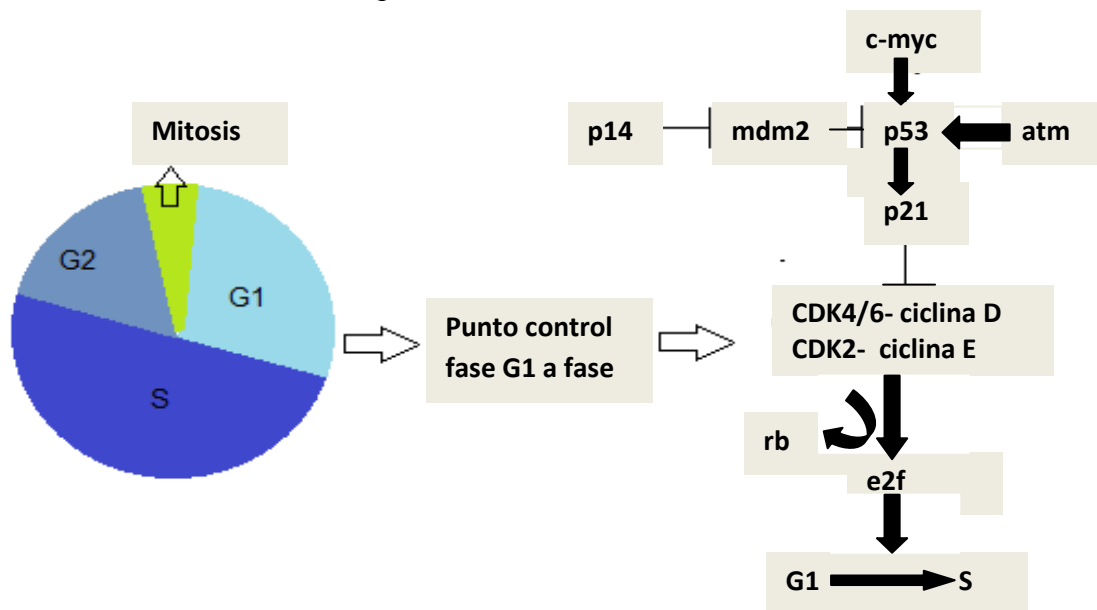
En el primer grupo se engloban los genes que codifican proteínas para el desarrollo del ciclo celular, que son enzimas y precursores de la síntesis de ADN,

síntesis y ensamblaje de tubulina, etc. En el segundo grupo se encuentran los genes que codifican proteínas de control del ciclo celular. Son considerados protooncogenes, de forma que cuando se encuentran mutados regulan positivamente el ciclo, activando a las células quiescentes para que pasen a fase S. Algunos de estos genes codifican una familia de proteínas involucrada en el ciclo celular, que son las Ciclinas y las Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Fueron descubiertas por Hartwell L.H., Hunt R.T. y Nurse P.M y son heterodímeros constituidos por una subunidad cinasa y una subunidad ciclina que regulan el correcto desarrollo del ciclo celular. En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la alteración de la función de estas CDKs puede ser causa de muchas neoplasias, habiéndose descubierto hasta ahora al menos 9 CDKs y 15 Ciclinas (Lertxundi U. y cols., 2005). Cada CDK se une de forma no covalente a su correspondiente ciclina formando complejos, aunque una misma CDK puede interactuar con varias ciclinas y viceversa. La CDK4 y la CDK6, junto con las diferentes Ciclinas D permiten el progreso desde la fase G1 a la fase S, CDK1 junto con las ciclinas A y B permiten el paso de la fase G2 a la fase M y el complejo CDK2-ciclina A regula el proceso de la fase S. La expresión de las diferentes ciclinas varía a lo largo del ciclo celular, mientras que la cantidad de CDKs se mantiene más o menos constante, a pesar de estar altamente regulada por procesos de fosforilación. Existe además un complejo activador del resto de las CDKs, el complejo CDK7-Ciclina H y reguladores negativos pertenecientes a dos familias de inhibidores endógenos: la familia de las INK4a, formada por los factores p16, p15, p18 y p19 que inhiben a CDK4 y CDK6, y la familia de las Cip/Kip, formada por p21, CIP1, p27, KIP1 y p57, que inhiben prácticamente a todas las CDKs (Lertxundi U. y cols., 2005).

Y, por último, en el tercer grupo se encuentran los genes que regulan proteínas que inhiben el ciclo. Son denominados genes supresores de tumores y están inactivos en los tumores. Las mutaciones que activan a los protooncogenes son de carácter dominante, mientras que las que inactivan a los supresores tumorales son recesivas por lo que se necesita la inactivación de ambos alelos. Existen diversos tipos de modificaciones que afectan a los protooncogenes, las más habituales pueden ser debidas a la inserción de un promotor viral, como es el caso de algunos retrovirus; translocaciones, que ocurren muy frecuentemente en los tumores hematológicos como en el linfoma de Burkitt; amplificaciones; mutaciones puntuales como la que ocurre en el oncogen *RAS* que modifica su codón de lectura convirtiendo la glicina en valina; y

deleciones, en este caso la pérdida de una secuencia inhibidora produce la activación del oncogén (Hanahan y Weinberg, 2011). También se ha visto que muchas veces se producen alteraciones en el número de cromosomas y la configuración espacial de estos (Heim S., 2008) y que existen cambios epigenéticos como cambios en la metilación del ADN y la modificación de histonas (Berdasco y Esteller, 2010).

Uno de los puntos de control de mayor importancia es el denominado “punto de restricción” que se encuentra al final de la fase G<sub>1</sub> antes de entrar en fase S y que es el primer punto de control del ciclo celular. Es llamado punto de restricción, ya que la mayor parte de las células se paran en este momento y entran en un estado de reposo denominado G<sub>0</sub> (Fojer F. y Te Riele H., 2008). Este punto de control fue descrito por primera vez en 1974 por Arthur Pardee, observando que las células que han superado este punto, progresan a través de la fase S independientemente de la presencia de mitógenos. Este punto de control es muy importante porque impide que las células entren en fase de síntesis, si se ha producido un daño en el ADN.



**Figura 3. Esquema representativo del ciclo celular y del punto de control entre la fase G1 y la fase S.** El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento y división de la célula en dos células hijas. Consta de dos etapas: interfase compuesta por las fases G1, G2 y S, y el periodo comprendido entre divisiones celulares y la etapa M o fase de división. Existen varios puntos de control, entre los cuales se encuentra el punto de control de cambio de fase G1 a fase S, que impide la entrada en fase de síntesis, si se ha producido un daño en el ADN. Los daños en el ADN activan mediante fosforilación a la proteína ATM, que modifica a la proteína p53, la cual se estabiliza y se transloca al núcleo celular induciendo la transcripción de varios genes entre los que se encuentra el inhibidor de CDKs denominado p21<sup>Waf1</sup> (Malumbres M., 2001). Esta molécula inhibe la formación de los complejos ciclina D-CDK4/6, lo que impide la transición de la fase G1 a la fase S. Asimismo la expresión de los factores p16, p27 y p57 inhiben la expresión de ciclina D. Si estos mecanismos no actúan y la expresión de ciclina D está aumentada, se permite su interacción con CDK4/6, formando unos complejos que junto con la acción de los complejos CDK2-Ciclina E fosforilan a la proteína supresora de tumores, retinoblastoma (RB) y otras proteínas de la misma familia liberándose el factor de transcripción E2F.

Los daños en el ADN activan, mediante fosforilación por la proteína ATM (ataxia-telangiectasia mutated) o la ATR (ataxia telangiectasia-Rad3) a la proteína p53, que también se activa mediante acetilación y sumoilación. De esta forma, p53 se estabiliza y se transloca al núcleo celular induciendo la transcripción de varios genes entre los que se encuentra el inhibidor de CDKs denominado p21<sup>Waf1</sup> (Malumbres M., 2001). Esta proteína inhibe la formación de los complejos Ciclina D-CDK4/6, lo que impide la transición de la fase G1 a la fase S. Asimismo, el estrés celular y el aumento de TGF- $\beta$ , activan la expresión de los factores p16, p27 y p57 los cuales, inhiben la expresión de la proteína Ciclina D.

Si estos mecanismos no actúan y la expresión de Ciclina D está aumentada, se permite su interacción con CDK4/6, formando unos complejos que junto con la acción de los complejos CDK2-Ciclina E fosforilan a la proteína supresora de tumores retinoblastoma (RB) y otras proteínas de la misma familia, liberándose el factor de transcripción E2F. Todo esto permite que se expresen moléculas necesarias para la transición de la fase G1 a la fase S, como son las Ciclinas E y A, la Timidina cinasa, la Timidilato sintetasa, la ADN polimerasa  $\alpha$  o la Dihidrofolato reductasa (DHFR). P53 puede estar inhibido por la acción del oncogén *MDM2*, que a su vez es regulado por la expresión de *TP53*, que aumenta su transcripción. El factor p14 modula el equilibrio entre *MDM2* y *TP53*, inhibiendo a *MDM2* y permitiendo que p53 actúe inhibiendo el ciclo celular (Malumbres M., 2001).

Alternativamente, si el daño genómico es demasiado grande para que pueda ser reparado, ATM induce la activación de una serie de rutas celulares que culminan en la muerte celular (Malumbres M., 2011).

La reversión de la actividad de muchos genes mutados que confieren la capacidad de división ilimitada a las células tumorales, o la inhibición de algún punto del ciclo celular que permita controlar el crecimiento de las células cancerígenas, son alguno de los objetivos prioritarios en el desarrollo de fármacos anticancerígenos.



## **Insensibilidad a señales antiproliferativas**

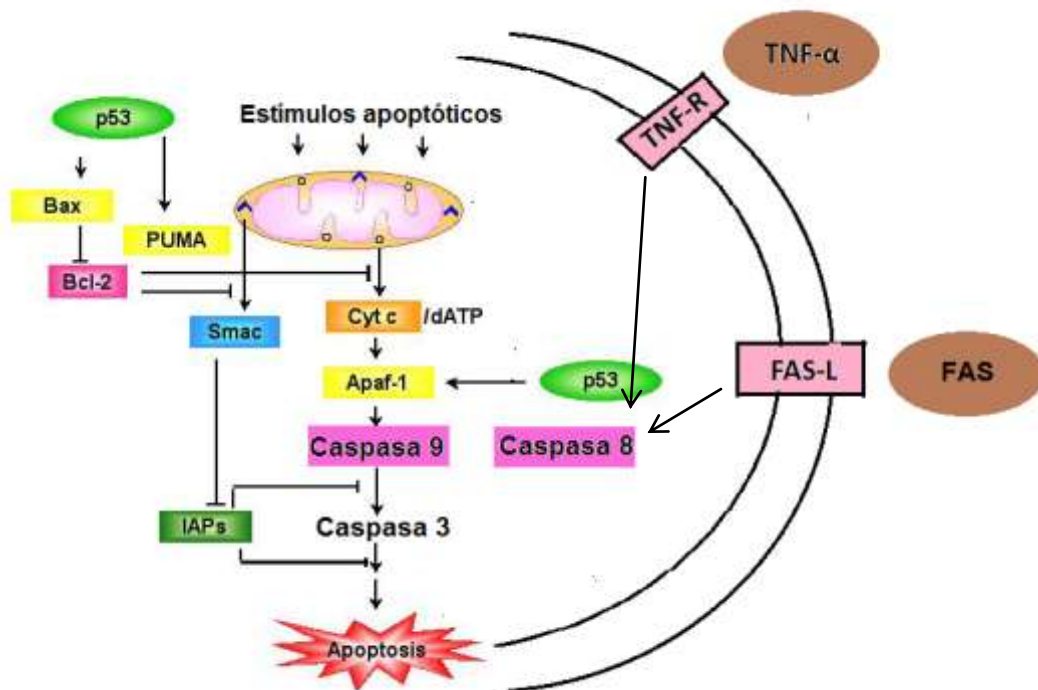
Existen numerosas señales antiproliferativas que mantienen la quiescencia celular y pueden impedir la proliferación por varios mecanismos distintos. El mecanismo básico consiste en aumentar las retroalimentaciones negativas que disminuyen este tipo de señales. Un ejemplo muy claro es el de la oncoproteína ras que se encuentra mutada en las células tumorales de forma que la actividad Ras GTPasa se encuentra comprometida y así atenúa el efecto de señales anticrecimiento (Hanahh y Weinberg, 2011).

Existen además importantes supresores de tumores, que al encontrarse mutados ya no pueden realizar su función inhibitoria del crecimiento. Uno de los procesos más documentados es la disminución de la expresión de los receptores de la molécula soluble TGF- $\beta$ , que previene la fosforilación de la proteína RB, de forma que ésta secuestra y altera la función de la proteína E2F deteniendo el ciclo celular en fase G1 (Weinberg y cols., 1995). Si estos receptores están disminuidos o alterados son insensibles a la unión de esta molécula antiproliferativa. Otro ejemplo puede ser el de la fosfatasa PTEN cuyo promotor se encuentra metilado en las células tumorales de forma que impide su función y de esta forma no interacciona con la PI3 cinasa y no se produce la degradación de Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato. (Yuan and Cantley, 2008). Estas modificaciones que permiten a las células tumorales evadir las señales atenuantes de su proliferación, puede que les permitan además resistir a la acción de ciertas drogas antimetabólicas.

## **Evasión de la muerte celular programada**

Las células tienen mecanismos de control, como la apoptosis y la senescencia, que les permiten evitar la proliferación incontrolada de aquellas células que han sufrido alteraciones. La apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo de vital importancia para que una célula que posea o bien, daños internos en su material genético, o unas condiciones externas desfavorables, sufra un proceso de muerte celular. Este proceso denominado apoptosis, consta de dos componentes principales: los sensores y los efectores. Los sensores se encargan de explorar si las condiciones intracelulares y extracelulares son correctas y adecuadas. Estos sensores reciben informaciones extracelulares mediante el receptor FAS que se une al FAS ligando y, por

el receptor TNF-R1 al cual se une el TNF- $\alpha$  y la linfotoxina  $\alpha$  (Ashkenazi y Dixit, 1999). Las señales internas son mediadas por la familia de proteínas Bcl-2, que bloquean la muerte celular mediante múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (McDonnell y cols., 1989) y entre los que se encuentran tanto factores pro- como anti-apoptóticos. Dentro de los factores proapoptóticos se engloban las proteínas Bax y Bak que constituyen un punto de control en el funcionamiento de la mitocondria (Wei y cols., 2001) y del retículo endoplásmico (Scorrano y cols., 2003).



**Figura 4. Esquema representativo de los procesos involucrados en la apoptosis.** La apoptosis puede ser inducida por señales externas que indiquen unas condiciones desfavorables, o por señales internas que muestren daño en el genoma. Las señales extracelulares se reciben mediante la unión del receptor FAS al FAS ligando y, por la unión del TNF-R1 al TNF- $\alpha$  (Ashkenazi y Dixit, 1999). Las señales internas son mediadas por la familia de proteínas Bcl-2, entre las que se encuentran Bax, PUMA y Bcl-2. La proteína bax, se inserta en la membrana mitocondrial externa, permitiendo que se libere la proteína Citocromo C que se une a Apaf-1, formando el apoptosoma, el cual activa a las caspasas (Danial N.N. y Korsmeyer S.J., 2004). Este proceso puede ser detenido por la proteína Bcl-2, o aumentado por la acción de la proteína smac que inhibe a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) que regulan a las caspasas. Modificado de David Givol, Weizmann Institute of Science.

En las células normales, la proteína bax se encuentra inactiva en el citosol o unida a las membranas por su extremo C-terminal (Suzuki y cols, 2000). Una vez que Bax recibe una señal de muerte, se inserta en la membrana mitocondrial externa y oligomeriza, permitiendo que la proteína Bak que se encuentra en la mitocondria

cambia su conformación alostérica y se active, aumentando la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria permitiendo que se libera la proteína Citocromo C ( Danial N.N. y Korsmeyer S.J., 2004).

El Citocromo C se une a un proteína denominada factor activador de la apoptosis-1 (Apaf-1), formando un complejo llamado apoptosoma que activa a una serie de proteínas denominadas caspasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas, el corte se produce a nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (**cisteinil-aspartato proteasas**). Las caspasas se pueden clasificar en dos tipos según su función en las diversas cascadas de señalización intracelular en las que median caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. Las caspasas iniciadoras, como las Caspasas-8 y -9, procesan las formas inactivas de las caspasas efectoras, como las Caspasas-3 y -7, activándolas. Las caspasas efectoras una vez activadas, procesan a su vez otros sustratos proteicos que mediarán en las distintas vías de apoptosis. La iniciación de estas reacciones en cascada está regulada por inhibidores de caspasas. La Caspasa-8 es la caspasa iniciadora clave en la vía de los receptores de muerte, se activa mediante complejos de señalización de membrana formados por la unión del receptor de muerte Fas con su ligando. El mecanismo de activación de la Caspasa-9 es más complejo, su requerimiento clave es su asociación con un cofactor de proteínas Apaf-1 y la liberación de Citocromo C por la mitocondria (Taylor C.R. y cols., 2008).

Muchas células tumorales adquieren una serie de estrategias para limitar esta muerte celular programada. La mayoría de las células tumorales pierden la función del supresor de tumores p53 (Hanahan y Weinberg, 2011). De manera alternativa existen tumores que incrementan la expresión de reguladores antiapoptóticos como son Bcl-2, Bcl-xl e inhiben la expresión de factores proapoptóticos como Bax, Bim y Puma. Además algunos tumores son capaces de eliminar las rutas de señalización que conllevan la apoptosis por vía exógena (Hanahan y Weinberg, 2011). Pero no sólo la apoptosis se encuentra limitada, también la autofagia, proceso por el cual las células reciclan su citoplasma y sus organelas citoplasmáticas. Estudios recientes, muestran que existe una interconexión entre la regulación de los procesos que provocan autofagia, apoptosis y homeostasia celular, por ejemplo aquellos que involucran las vías de la PI3 cinasa, AKT y mTOR (Levine y Kroemer, 2008).

Incluso se ha descrito que las células cancerígenas toleran cierto grado de otro tipo de muerte celular menos específica, la necrosis, que aunque tiene un componente de programación génica, se caracteriza por provocar inflamación y de esta manera atraer a células inmunitarias. Se ha observado que las células necróticas pueden liberar ciertas citocinas, como IL-1, que estimulan a las células vecinas a proliferar, de forma que facilitan la progresión neoplásica (Grivennikov y cols., 2010).

### **Ilimitado potencial de replicación**

Las células normales poseen un número limitado de divisiones antes de entrar en el proceso de senescencia. Esto es debido a que los extremos de los cromosomas, llamados telómeros, están compuestos de varios miles de repeticiones de una secuencia de 6 pares de bases que se van acortando con las divisiones celulares. Cuando el tamaño de los telómeros es muy pequeño, los cromosomas pierden su integridad y se desencadena la muerte celular (Counter y cols., 1992). Las células cancerígenas son capaces de mantener sus telómeros intactos (Shay y Bacchetti, 1997) mediante el uso de la enzima telomerasa, lo que les confiere una capacidad ilimitada de replicación. Este hecho ha sido comprobado en experimentos en ratones modificados genéticamente que no poseen telomerasa. Los resultados obtenidos indican que el acortamiento de los telómeros conlleva a las células malignas a un estado senescente que atenúa la tumorigénesis (Artandi y DePinho, 2000). Por tanto, se está empezando a estudiar el papel de la senescencia celular como una barrera protectora frente al desarrollo tumoral y las posibles maneras de inducirlo en células tumorales. Se ha observado además, que la telomerasa posee importantes funciones para la proliferación celular independientes al alargamiento de telómeros. Es el caso de las funciones asociadas a una de sus unidades proteicas, la proteína TERT, capaz de amplificar la señal de la vía Wnt, vía que controla procesos muy importantes incluidos en el desarrollo de órganos y tejidos en embriogénesis (Parker y cols., 2009). La proteína TERT actúa como cofactor del factor de transcripción  $\beta$ -Catenina/LEF (Parker y cols., 2009) y está involucrada en la reparación del daño al ADN (Masutomi y cols., 2005), asociándose a la cromatina en muchos lugares de los cromosomas y no solo en los telómeros.

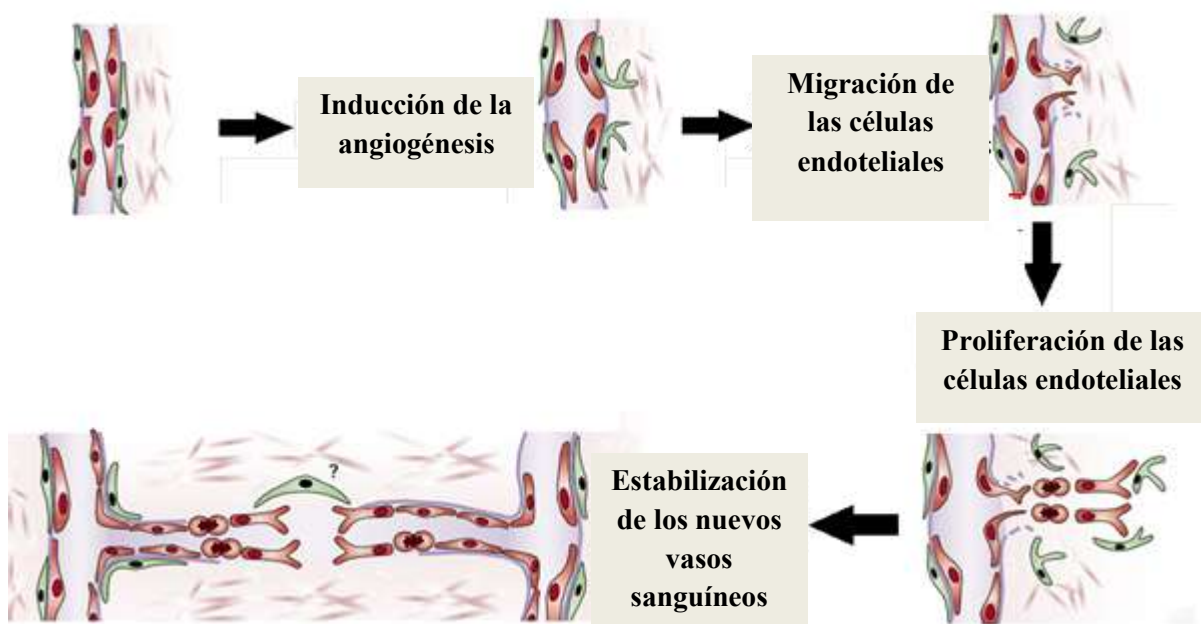
## Angiogénesis

Todas las células eucariotas requieren del suministro constante de oxígeno y nutrientes para sobrevivir. Los invertebrados afrontan esta situación mediante la difusión del oxígeno que llega a todas las células del cuerpo, pero con la evolución los vertebrados han necesitado un sistema cerrado para resolver el problema de entrega de requerimientos ocasionado por el aumento de tamaño. Por esta misma razón los tumores, a partir de los 2 mm de tamaño necesitan la creación de nuevos vasos sanguíneos que les proporcionen nutrientes y oxígeno para seguir creciendo, porque si esto no ocurre, permanecerán como tumores quiescentes (Carmeliet, 2000). Para ello los tumores activan el proceso denominado angiogénesis que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. Este proceso es fundamental no sólo para el crecimiento tumoral, sino que los nuevos vasos sanguíneos formados les permitirán además diseminarse por el organismo.

Los vasos sanguíneos son estructuras huecas y tubulares que conducen la sangre impulsada por la acción del corazón. Están compuestos por tres capas de diferentes tejidos, la capa más interna o túnica íntima está formada por un epitelio plano simple formado por células endoteliales, su lámina basal y tejido conectivo laxo. Las células endoteliales participan en importantes funciones homeostáticas como son la regulación de la permeabilidad, del flujo sanguíneo, de la coagulación y fibrinólisis y de la angiogénesis. La capa intermedia o túnica media es una capa formada por subcapas concéntricas de células musculares lisas, que contiene fibras de elastina, colágeno y proteoglicanos en cantidades variables. Dentro de esta capa, en las arterias se encuentran los pericitos, que son células con prolongaciones contráctiles que se sitúan alrededor de las arterias, regulando el flujo sanguíneo y además forman parte de la barrera hematourinaria. La capa más externa es la túnica adventicia que está formada por fibras de colágeno y fibras elásticas y es por la que discurren los vasos sanguíneos que irrigan a los vasos de gran calibre denominados *vasa vasorum*.

La angiogénesis es un proceso complejo que se lleva a cabo principalmente por la movilización de precursores endoteliales provenientes de la médula ósea gracias fundamentalmente, al factor de crecimiento del epitelio vascular A (VEGFA), la proteína de biosíntesis Fosfatidilinositol glicano clase F (PIGF) y la Angioproteína-1 (Carmeliet P y cols., 2003). Estos factores provocan un aumento de la permeabilidad

vascular acompañado de vasodilatación lo que permite que se extravasen proteínas plasmáticas que forman una matriz sobre la que ocurrirá la migración de células endoteliales. Además, gracias a la activación de la Angioproteína-2, se pierde el recubrimiento de células periciticas y musculares, lo que permite que las células endoteliales migren en columna (Thurston G., 2003). Estas células endoteliales proliferarán y se ensamblarán para formar un nuevo plexo vascular de capilares pequeños, proceso denominado vasculogénesis. A continuación, este plexo se expande y debe remodelarse para formar vasos sanguíneos de mayor tamaño que se ramifican en vasos de menor tamaño.

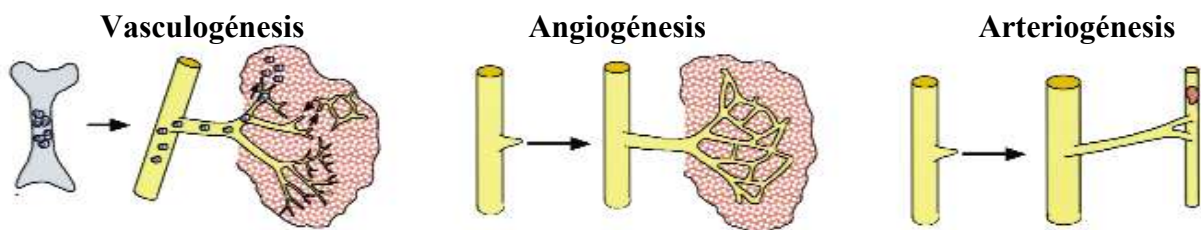


**Figura 5. Esquema representativo de la angiogénesis.** Para la formación de un vaso sanguíneo a partir de otro ya preexistente es necesario en primer lugar, que se induzca la angiogénesis estimulando la migración y proliferación de las células endoteliales, las cuales formaran vasos sanguíneos que necesitan ser estabilizados para poder madurar.

Los vasos formados por estas células endoteliales deben recubrirse de nuevo por pericitos y células de músculo liso, las cuales regulan la contracción y dilatación de los mismos. Este proceso ocurre en estado fisiológico durante la embriogénesis y después del nacimiento en el desarrollo postnatal, siendo esencial para el reparto de oxígeno, nutrientes y sustancias promotoras esenciales para la formación del hueso endocondral. También ocurre en los ovarios de las mujeres menstruantes, debido al crecimiento folicular y al desarrollo del cuerpo lúteo, los cuales dependen de la proliferación de nuevos vasos capilares, y en la placenta durante el embarazo. Puede

además estar presente en algunos de los vasos sanguíneos que permanecieron quiescentes y que pueden reactivarse durante la reparación y cicatrización de heridas. El resto de procesos por los cuales se forman vasos sanguíneos o linfáticos nuevos son procesos patológicos asociados a una serie de enfermedades, entre los que se encuentran los procesos cancerosos, isquemia, inflamación, infecciones o desordenes inmunológicos (Carmeliet P y cols., 2003). Existen diferencias estructurales entre los vasos sanguíneos tumorales con respecto a los normales, como que morfológicamente son irregulares, tortuosos y con extremos ciegos. Además, presentan a menudo hemorragias, probablemente debido a la sobreproducción de VEGF (Bergers y Benjamin, 2003). La principal diferencia funcional que presentan es su baja capacidad de correcta maduración, por lo que suelen formarse continuamente.

Existen otros procesos de creación de vasos sanguíneos. Estos procesos son la linfangiogenesis o formación de nuevos vasos linfáticos; la arteriogenesis o formación de nuevas arterias y, finalmente, la vasculogenesis que generalmente hace referencia a la formación *de novo* de vasos sanguíneos que ocurre en el desarrollo temprano del embrión a partir de células precursoras. La angiogenesis tiene un patrón de crecimiento denominado “en rama”, ya que se forman vasos sanguíneos grandes que derivan en otros más pequeños, en contraste con la arteriogenesis que presenta un crecimiento colateral.



**Figura 6. Procesos de creación de vasos sanguíneos.** Se representan los principales procesos de creación de vasos sanguíneos: vasculogénesis o creación de vasos sanguíneos *de novo*, angiogénesis o crecimiento en rama y arteriogénesis o crecimiento colateral. Modificado de Carmeliet, 2000.

El proceso de angiogenesis está muy controlado por lo que se denomina la balanza angiogénica que es la compensación que ocurre en condiciones normales entre los factores proangiogénicos y los factores antiangiogénicos (Bergers y Benjamin, 2003).

El primer inhibidor angiogénico descubierto fue Trombospondina 1, un modulador de la proliferación y motilidad de las células endoteliales. Dentro de los factores proangiogénicos, se ha estudiado en profundidad las funciones de VEGF (Ferrara N. y cols., 2003) debido a que se encuentra involucrado en todas las fases del proceso de creación de nuevos vasos sanguíneos, desde la multiplicación y proliferación de células endoteliales, su migración hasta el mantenimiento y maduración de los vasos sanguíneos ya formados.



**Figura 7. Balanza angiogénica.** La angiogénesis es un proceso muy controlado, de forma que en condiciones normales los factores proangiogénicos y antiangiogénicos se encuentran compensados. Dentro de los factores activadores se encuentran la familia del VEGF, el HIF-1 $\alpha$ , y los factores de crecimiento PDGF, FGF y TGF. Los principales factores inhibidores son, TSP-1, Endostatina, Angiostatina y Tumstatina. Adaptado de Bergers y Benjamin, 2003.

### Factores proangiogénicos

Los activadores de la proliferación y migración de las células endoteliales, factores proangiogénicos, son en su mayoría ligandos de receptores tirosina-cinasa, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas, PDGF, y el factor de crecimiento endotelial, VEGF.

El término VEGF engloba a varias proteínas pertenecientes a dos familias: VEGFa y VEGFb, que son el resultado del distinto procesamiento postranscripcional



del ARN mensajero de un único gen. El procesamiento alternativo de algunos exones altera sus propiedades como puede ser la unión a la heparina, las interacciones con los co-receptores de heparán sulfato, proteoglicanos y neuropilina en la superficie celular, y también el número de aminoácidos que posea la proteína resultante. Además el sitio de procesamiento terminal determina si las proteínas son pro-angiogénicas, si es proximal, o anti-angiogénicas, si es distal, y también determina la inclusión o exclusión de los exones 6 y 7 (Ferrara y cols., 2002).

Los miembros más importantes de la familia VEGF en humanos son los siguientes:

VEGF-A, implicado en la migración y división de las células endoteliales, en el aumento de la actividad de la metano monooxigenasa y la integrina  $\alpha\gamma:\beta_3$ , en promover la creación de la luz y las fenestraciones de los vasos sanguíneos y es un agente quimiotáctico para macrófagos y granulocitos. Además es un potente vasodilatador activado indirectamente por la liberación de óxido nítrico.

VEGF-B, implicado en los procesos angiogénicos que tienen lugar en el desarrollo embrionario.

VEGF-C, es el que media la formación de vasos linfáticos.

VEGF-D, es necesario para el desarrollo de la vasculatura linfática que rodea los bronquios.

PlGF, que es importante en procesos como la vasculogénesis, isquemia, inflamación y cicatrización.

Estos subtipos de VEGF, realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares. El más importante en angiogénesis es VEGFR-2. La unión ligando-receptor produce la dimerización del receptor y su activación mediante transfosforilación, aunque en sitios, momentos e intensidad diferentes. Los receptores de VEGF tienen una porción extracelular que consta de 7 dominios similares a inmunoglobulinas, una única región transmembrana, y una región intracelular que contiene un dominio tirosina cinasa que actúa por la vía

Ras/Raf/MEK/ERK, aunque también puede fosforilar a la fosfolipasa C, FAK y PI3 cinasa. VEGF-A se une a VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1). VEGFR-2 parece mediar casi todas las respuestas celulares conocidas de VEGF. La función de VEGFR-1 se conoce menos, pero se piensa que modula la función de VEGFR-2. Además VEGFR-1 podría secuestrar a VEGF para evitar su unión con VEGFR-2 (esto parece ser especialmente importante durante la vasculogénesis en el embrión). VEGF-C y VEGF-D, pero no VEGF-A, son ligandos del tercer receptor VEGFR-3, que media la linfangiogénesis (Ferrara y cols., 2002).

Factor proangiogénico	Función
<b>VEGF-A</b>	Activador clave de todos los procesos angiogénicos
<b>VEGF-B</b>	Angiogénesis embrionaria
<b>VEGF-C</b>	Linfangiogénesis
<b>PIGF</b>	Cicatrización, inflamación e isquemia
<b>VEGFR1</b>	Modula a VEGFR1
<b>VEGFR2</b>	Principal receptor mediador de la angiogénesis
<b>VEGFR3</b>	Linfangiogénesis
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Inducción VEGF en hipoxia
<b>EGF</b>	Crecimiento y proliferación células endoteliales
<b>PDGF</b>	Formación vasos sanguíneos a partir de preexistentes

**Tabla 1. Principales factores proangiogénicos.** En la tabla se reúne a los principales factores proangiogénicos con sus funciones.

La producción de VEGF puede inducirse en células que no están recibiendo suficiente oxígeno, debido al crecimiento tumoral, que deja zonas sin vascularizar. Cuando una célula es deficitaria en oxígeno, produce el factor inducible por hipoxia, HIF, un factor de transcripción que estimula la liberación de VEGF entre otras funciones como la modulación de la eritropoyesis. HIF1 $\alpha$  y HIF1 $\beta$  se producen continuamente, pero HIF1 $\alpha$  es altamente lábil en presencia de oxígeno, por lo que se degrada en condiciones aeróbicas. Cuando la célula está en condiciones de hipoxia, HIF1 $\alpha$  persiste y el complejo HIF1 $\alpha$ / $\beta$  estimula la liberación de VEGF y también la de PDGF y FGF $\beta$ . (Forsythe 1996).

El factor de crecimiento epidérmico, EGF, estimula el crecimiento celular, la proliferación y la diferenciación, por unión a su receptor EGFR en la superficie celular. Estimulando la actividad tirosina cinasa de este receptor, se induce una cascada de

reacciones que aumentan los niveles intracelulares de calcio, aumentando la síntesis de proteínas glicosiladas y también la expresión de distintos genes. El EGF humano es una proteína de 6045 Da, descubierta por Stanley Cohen. La familia EGF agrupa a proteínas que tienen estructura y funciones similares, como son el factor de crecimiento epitelial que se une a la heparina, HB-EGF, el factor de crecimiento transformante  $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , la Anfiregulina, Epiregulina, y las Neuroregulinas (Carpenter G., 2000).

El factor de crecimiento fibroblástico, FGF, es un factor de crecimiento que aumenta la actividad mitótica y la síntesis de ADN, facilitando la proliferación de células precursoras. Es una familia que agrupa a más de 20 miembros que transducen señales a través de 4 receptores con actividad tirosina cinasa intrínseca. Contribuyen a distintas respuestas como la cicatrización de heridas, hematopoyesis, angiogenesis y desarrollo embrionario (Kumar y cols., 2009).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF, es uno de los numerosos factores de crecimiento que regulan el crecimiento celular y la división. Juega un papel importante en la formación de los vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes. Es una proteína dimérica compuesta por dos cadenas  $\alpha$  o  $\beta$ . El receptor, PDGFR, es un receptor de superficie celular tipo tirosina cinasa, que cuando se une a el PDGF, dimeriza, se fosforila y activa la vía de PI3 cinasa (Yu J.C. y cols., 1995).

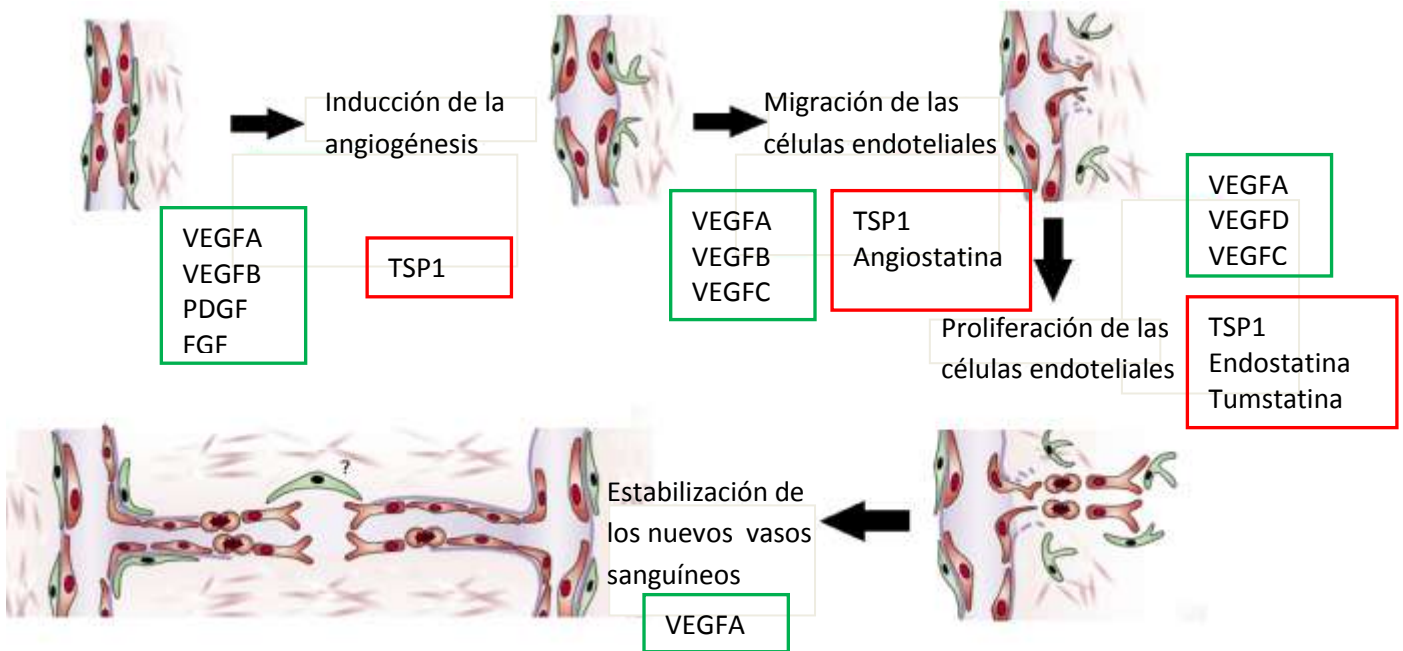
### **Factores antiangiogénicos**

Muchas moléculas inhibidoras de la angiogénesis derivan de otras proteínas más grandes que no tienen efecto en angiogénesis. Dentro de éstas se encuentran la angiostatina, que es un fragmento del plasminógeno, también endostatina, tumstatina y canastatina que son fragmentos de distintos colágenos (Carmeliet y cols., 2003).

La Angiostatina es una proteína inhibidora de la angiogénesis que realiza su efecto mediante el bloqueo del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y es usada en terapia. Es un fragmento de 38 kDa derivado de la Plasmina, producido por escisión debido bien a procesos de reducción de enlaces disulfuro o a la acción de metaloproteasas. Se une a otras proteínas como la Angiomotina y ATP sintasa de las células endoteliales y a las integrinas, anexinas y proteoglicanos (Cao Y y cols., 1996).

La Tumstatina es un fragmento de 28 kDa derivado del colágeno tipo IV. La Tumstatina tiene dos sitios de activación, uno es el N-terminal que se encarga de inhibir la angiogénesis y el otro es el C-terminal que es pro-apoptótico. La Tumstatina inhibe la activación de diversas proteínas como la Cinasa de adhesión focal, la PI3 cinasa, la proteína Cinasa B y la proteína diana de la rapamicina en mamíferos, mTOR (Maeshima Y. y cols., 2002). Se ha demostrado que se une a las células endoteliales e impide el crecimiento de las mismas, por inducir la vía apoptótica y que limita la angiogénesis en células de melanoma (Wang S. y cols., 2007).

La Endostatina es un fragmento de 20 kDa del colágeno tipo XVIII, que interfiere con la actividad de FGF y VEGF, debido a que regula la expresión de estos factores mediante el bloqueo de la cinasa N terminal c-Jun. También bloquea la proliferación y organización de las células endoteliales en nuevos vasos sanguíneos, mediante la inducción de parada de ciclo celular, inhibiendo a la Ciclina D1. Además inhibe la acción de algunas metaloproteasas (Abdollahi A. y cols., 2004). La utilización de endostatina como quimioterápico se encuentra ya ensayo clínico de fase III.



**Figura 8. Regulación de la angiogénesis.** Esquema de los principales pasos que comprenden la formación de un vaso sanguíneo junto con los factores proangiogénicos, en verde, que los favorecen y los factores antiangiogénicos, en rojo, que los inhiben. Adaptado de Bergers y Benjamin, 2003.

Que la angiogénesis es un paso clave para la progresión tumoral ya fue observado en 1890 por patólogos alemanes. En 1927, Warren Levi observó que la arquitectura vascular cambiaba según el tipo tumoral y en 1971, J. Folkman propuso

inhibir la angiogénesis para tratar tumores. A partir de entonces, se han desarrollado multitud de fármacos anticancerígenos en los últimos 30 años. En 1983 Senger y colaboradores descubrieron VEGF. Esta molécula comienza a ser diana de creación de inhibidores desde que Ferrara y colaboradores lo clonan en 1989. En la actualidad se sabe que es necesario que los tumores durmientes desarrollen una vasculatura propia, lo cual es necesario para que el tumor pueda entrar en la denominada fase de crecimiento exponencial, lo que le permite expandirse (Kerbel SR., 2000).

### **Invasión tisular y metástasis**

Las células cancerígenas son capaces de expandirse a nuevos órganos, proceso denominado metástasis. La metástasis se produce por una serie compleja de pasos, la denominada cascada metastásica en la cual, las células cancerosas abandonan el lugar original del tumor y migran a otras partes del cuerpo mediante la circulación sanguínea o linfática. Este proceso se ve facilitado, no sólo por la angiogénesis, sino también porque las células tumorales aumentan la producción de proteasas, que les permiten romper uniones con su lámina basal, en el caso de tumores epiteliales, y entre el parénquima de otros tejidos y facilitar su propagación (Coussens and Werb, 1996). Deben existir además procesos inflamatorios y de restricción de elasticidad que permitan a la célula tumoral la intravasación, circulación sanguínea y posterior extravasación. También se ha observado que es necesaria la expresión de moléculas de superficie que les permita migrar e incorporarse a nuevos órganos, como son las moléculas de adhesión celular (CAMs) y las integrinas  $\alpha$  y  $\beta$  (Johnson, 1991). Además existen otros genes que cumplen un papel importante en el proceso de metástasis, como por ejemplo el gen *TWIST*, cuya proteína participa en la embriogénesis dirigiendo a los tejidos en formación. En condiciones normales la proteína Twist se desactiva tras el nacimiento, pero se ha demostrado que la producción de esta proteína se encuentra activada en células tumorales y que juega un papel muy importante en el proceso de invasión de nuevos tejidos (Yang y cols., 2004).

### **Microambiente tumoral**

No obstante, en la actualidad no se puede entender el tumor, únicamente como la agrupación de alteraciones que sufren las células tumorales, ya que los tumores son en realidad tejidos complejos compuestos de múltiples tipos celulares con interacciones

entre ellos, lo que crea un microambiente especial. Tanto el parénquima como el estroma tumoral contienen distintos tipos celulares que permiten el crecimiento tumoral, dentro de ellos se encuentran las células endoteliales que migran y proliferan para formar vasos sanguíneos y los pericitos que permiten la estabilización de los nuevos vasos sanguíneos. Existen en este microambiente, células inmunológicas que se encuentran alteradas y son evadidas por las células tumorales, e incluso pueden llegar a favorecer el progreso tumoral. Se ha observado que su presencia en ambientes de inflamación crónica se asocia con varias patologías tisulares incluyendo la neoplasia (Karin y cols., 2006), ya que producen moléculas de señalización que sirven como activadores tumorales. Sin embargo, la función de las células inmunológicas es eliminar las células tumorales, como propone la teoría de la inmunovigilancia postulada en 1967 por Burnet y Thomas. Esta teoría postula que las células y los tejidos se encuentran constantemente controlados por el sistema inmune, de forma que eliminan la mayoría de las células tumorales, pero algunas de estas células son capaces de escapar al sistema inmune y desarrollarse. Experimentos con animales han demostrado que tanto el sistema inmune innato como el adaptativo son capaces de contribuir a la erradicación del tumor (Teng y cols., 2008). Además se ha demostrado que la infiltración de linfocitos T citotóxicos y células Natural Killer (NK) está asociada a un mejor pronóstico en ciertos tipos de cáncer (Nelson, 2008). En este microambiente también se encuentran los fibroblastos, células muy abundantes en los carcinomas que se encuentran modificados para que liberen diversas citocinas que promuevan la proliferación cancerígena, la angiogénesis y la metástasis.

### **Modificaciones metabólicas**

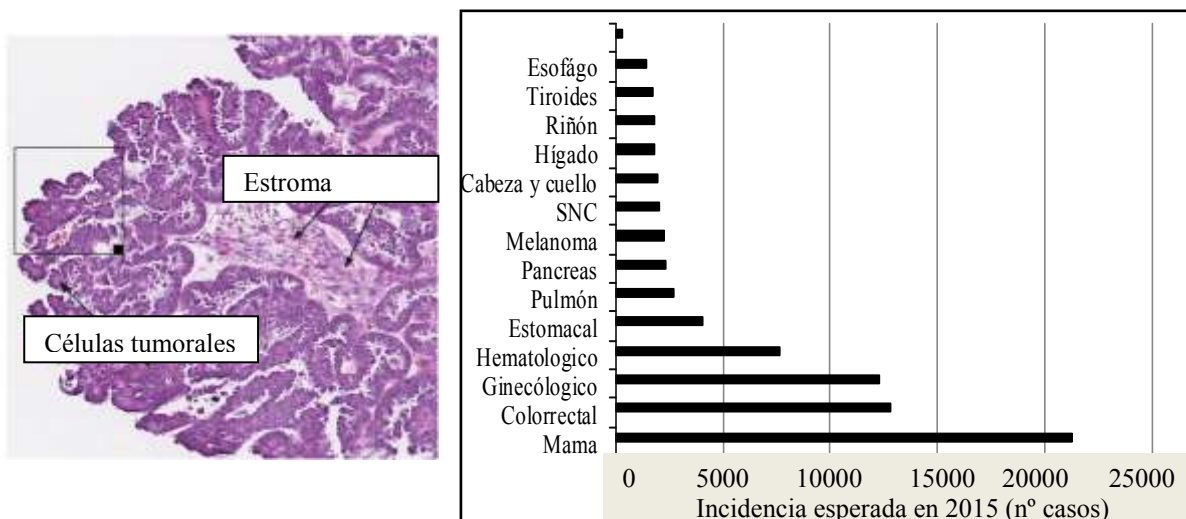
En los últimos años, se ha observado que las células cancerígenas son capaces de modificar el metabolismo celular, para favorecer la proliferación neoplásica. En condiciones normales aeróbicas, la célula procesa glucosa por la vía glucolítica, y continúa en la mitocondria formando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Se ha observado que las células cancerígenas son capaces de producir un tipo especial de glucolisis, denominado glucolisis aeróbica, durante la cual introducen una gran cantidad de glucosa en la célula, para lo que aumentan la expresión de transportadores de glucosa, como GLUT1 (Jones y Thompson, 2009). Este aumento de la glucolisis se ha demostrado que está asociado con la activación de protooncogenes como *RAS* y *MYC*, y con ciertos

supresores de tumores mutados, como *TP53*. Esta dependencia glicolítica puede acentuarse bajo condiciones hipóxicas, que suelen encontrarse en el desarrollo de la mayoría de los tumores y permite la generación de aminoácidos, macromoléculas y orgánulos requeridos para la creación de nuevas células (Hanahan y Weinberg, 2011).

### Cáncer de ovario

El cáncer de ovario no es una única enfermedad, sino que es un término que agrupa a distintas enfermedades con diferentes precursores y expresiones diferenciales de biomarcadores (Chan A y cols., 2012). Entre los cánceres ginecológicos, el cáncer de ovario es el que presenta la mayor tasa de morbilidad y mortalidad, debido principalmente a su difícil detección temprana, y a que no presenta síntomas reconocibles, porque su localización anatómica le permite ser asintomático hasta que se disemina. Otra de las causas de su alta mortalidad, es que los métodos de diagnóstico actuales no son muy sensibles.

Presenta una distinta distribución según zonas geográficas, siendo más frecuente en Europa occidental, Israel, Canadá y Estados Unidos. La edad media de las pacientes se sitúa entre 50 y 59 años, pero el pico más alto se encuentra en los 89 años. En 2012, según la Sociedad Americana del Cáncer se han desarrollado 22.000 nuevos casos y más de 15.000 muertes.



**Figura 9. Incidencia del cáncer de ovario.** A la izquierda se muestra una imagen de cáncer ovárico obtenida de [proteinatlas.org](http://proteinatlas.org). A la derecha se muestra un gráfico representativo realizado con los datos obtenidos en la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) sobre la incidencia esperada en 2015 para cánceres femeninos en España. Se observa que los cánceres ginecológicos, entre los cuales se encuentra el cáncer de ovario, suponen el tercer grupo con mayor incidencia.

La supervivencia que presenta este tipo de cáncer es menor del 30% para pacientes que se diagnostican en un estadio avanzado, sin embargo la cirugía combinada con la quimioterapia permite la cura del 90% de las pacientes que se diagnostican en estadios tempranos. Además, la mayoría de los quistes de ovario son tumores benignos que suelen desaparecer sin ninguna consecuencia. Para un mejor pronóstico sería de gran importancia, el descubrimiento de técnicas diagnósticas más sensibles acompañadas del desarrollo de quimioterápicos eficaces, aún cuando el tumor se encuentre en estadios desarrollados.

El origen del tumor ovárico suele ser un carcinoma epitelial de la superficie ovárica, aunque también se puede producir por un carcinoma en los óvulos o por un carcinoma en los tejidos que rodean a los ovarios. Produce frecuentes metástasis que se localizan en el peritoneo. El más agresivo de los tumores de ovario es el carcinoma sérico de alto grado, el cual presenta una alta recurrencia de tumores resistentes a los tratamientos (Castellarin M y cols., 2012).

Con respecto a su etiología, el riesgo de padecer cáncer de ovario se asocia con anomalías en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Se ha observado que la esterilidad y el tratamiento durante largos períodos con fármacos para la estimulación ovárica aumentan la incidencia de este tipo de cáncer. Por otro lado, la maternidad, los anticonceptivos orales, la ligadura tubárica y la histerectomía reducen la incidencia. Asimismo, se conoce que existe una relación entre el padecimiento previo de cáncer de mama y la posibilidad de padecer años más tarde un cáncer de ovario (Datos obtenidos de la SEOM).

CA125 es el marcador tumoral más usado para diagnosticar el cáncer ovárico. Es una glicoproteína de alto peso molecular, que tiene una sensibilidad entre el 50 y el 60%, cuya expresión está aumentada en un 90% en todas las pacientes que presentan un cáncer ovárico epitelial (Rein B.J.D. y cols, 2011). Se ha estudiado si el uso de este marcador podría aplicarse al diagnóstico del tumor en estadios iniciales, pero presenta algunas características negativas que no lo hacen viable, como que está ausente en un 20% de los cánceres y que se encuentra elevado en algunas condiciones fisiológicas, como la cirrosis, la peritonitis y la endometriosis. Además, presenta fluctuaciones durante el ciclo menstrual y el embarazo (Sarojini S. y cols, 2012). Por tanto, se ha propuesto la combinación de este marcador con otros, de forma que se puedan tener



medicaciones más sensibles. Se ha demostrado que CA125 se une a complejos de E-caderina y  $\beta$ -catenina, que favorecen la movilidad, migración e invasión de células cancerígenas. CA125 aumenta la activación del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), lo que conlleva un aumento de sus efectores AKT, ERK y las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 (Commala M y cols, 2011). Otros marcadores que se encuentran sobreexpresados en los tumores ováricos son la mesotelina, una glicoproteína presente en células mesoteliales de la pleura, el peritoneo y el pericardio, las calicreínas que son serínproteasas de bajo peso molecular, el receptor de folato tipo 1, la aldehído deshidrogenasa 1 y la prostasina humana PRSS8. También se ha descrito su asociación a diversos polimorfismos funcionales de la Glutathion S transferasa (Sarojini S. y cols, 2012).

### **Tratamiento del cáncer**

En general, en el tratamiento del cáncer se usan principalmente tres terapias: cirugía, quimioterapia y radioterapia. Actualmente, las anteriores se pueden combinar con hormonoterapia e inmunoterapia.

La quimioterapia es el tratamiento del cáncer con un medicamento antineoplásico o con una combinación de dichas drogas en un régimen de tratamiento estándar. La función de estos medicamentos es impedir la proliferación de las células cancerosas mediante la alteración de la síntesis de ácidos nucleicos, división celular o síntesis de proteínas, por lo que son o bien citostáticos o citotóxicos. Aunque desde una perspectiva clínica, el principio fundamental es que los fármacos a emplear en el tratamiento del cáncer presenten un índice terapéutico adecuado, un perfil de toxicidad aceptable e idealmente contar con una explicación coherente sobre su mecanismo de acción (Picó C, 2009). Algunas de las categorías más utilizadas de quimioterápicos son: agentes alquilantes, que actúan directamente sobre el ADN incorporando grupos alquilo que dan lugar a puentes inter o intracatenarios, lo que conlleva en último término la muerte celular; derivados de platino, que forman enlaces covalentes con la guanina y la adenina del ADN; antimetabolitos, que inhiben la acción de las enzimas relacionadas con la síntesis de purinas y pirimidinas; agentes que interaccionan con las topoisomerasas, fundamentales para los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN, y los agentes que interaccionan con los microtúbulos de forma que se impide la división celular y se afecta a la viabilidad celular (García Mata y cols., 2009).

Grupos de quimioterápicos en función de su mecanismo de acción	Principales citostáticos
<b>Agentes alquilantes</b>	Mostazas nitrogenadas ( Mecloretamina, Clorambucil, Ciclofosfamida, Ifosfamida, Melfalan) Nitrosureas (Estreptomicina, carmustina, ionustina) Sulfonatos alquilados (Busulfan) Triacinas (Dacarbacina y Temozolomida) Etilenaminas (Tiotepa y Altretamina)
<b>Antimetabolitos</b>	Metotrexano Raltitrexel Fluoracilo Ftorafur Citacarabina Fludarabina
<b>Derivados del platino</b>	Cisplatino Oxaliplatino Carboplatino
<b>Inhibidores topoisomerasas</b>	Etopósido Tenopósido Posorrubicina Irinotecan Topotecan
<b>Inhibidores mitóticos</b>	Taxanos (paclitaxel y docetaxel) Epotilones (ixabepilona) Vinca-alcaloïdes (vinblastina, vincristina y Vinorelbina) Estramustina
<b>Antibióticos antitumorales</b>	Antraciclinas ( Daunorrubicina, Doxorrubicina, Epirubicina, Idarrubicina) Actinomicina D Bleomicina Mitomicina
<b>Otros</b>	Pentostatina Bleomicina L-asparaginasa

**Tabla 2. Principales quimioterápicos de uso en clínica.** Resumen de los principales agentes citostáticos y citotóxicos agrupados según el mecanismo de acción. Información obtenida de la SEOM y la Agencia Americana del Cáncer.

El principal problema de la quimioterapia suele ser su inespecificidad, por lo que afecta a células y tejidos normales del organismo, sobre todo si se encuentran en división activa.

La inmunoterapia es el conjunto de estrategias destinadas a estimular o reponer el sistema inmunitario, aplicada al tratamiento de muchas enfermedades entre las que se encuentra el cáncer. Las moléculas activas implicadas en la inmunoterapia, inmunomoduladores, suelen ser citocinas como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), los interferones, las interleucinas (IL) como la IL-2, la IL-6 y el IL-8 ó el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). También se utilizan anticuerpos monoclonales y vacunas.

El tratamiento del cáncer de ovario depende del tipo y del estadio en el que se encuentre. Si el cáncer no se ha extendido y se localiza fácilmente, se suele optar por eliminarlo quirúrgicamente, pero si el tumor ya está extendido, se trata al paciente con tratamientos radioterápicos, quimioterápicos o la combinación de ambos (Moscow JA y cols., 2007). En el caso del tratamiento del cáncer de ovario, los principales procedimientos consisten en la extirpación de los ovarios, trompas de Falopio y/o el útero. En muchas ocasiones se extirpan además los ganglios linfáticos de la pelvis y del abdomen. La quimioterapia es más usada que la radioterapia y se suele aplicar a través de las venas abdominales o directamente en la cavidad abdominal. En la actualidad, este tipo de tratamiento no presenta una gran eficacia, por lo que sería de gran importancia el diseño de nuevos quimioterápicos capaces de frenar este tipo de cáncer.

Uno de los objetivos primordiales en el tratamiento del cáncer es el desarrollo de terapias específicas contra moléculas implicadas en la carcinogénesis. Una estrategia terapéutica muy prometedora consiste en el bloqueo de los factores de transcripción que se encuentran activados o sobreexpresados en las células cancerígenas (Frank DA y cols., 2009). A pesar de las reticencias iniciales sobre la potencial toxicidad de este tipo de tratamientos, las células normales usualmente toleran bien una pérdida de función de estos factores de transcripción con pocas consecuencias. Actualmente, existen diversos fármacos antitumorales que bloquean la actividad de diferentes factores de transcripción ya sea mediante la unión no-covalente con el ADN (por ejemplo, la mitramicina A, MTA, o las antraciclinas) o mediante la modificación del ADN mediante alquilación (mostazas nitrogenadas, cisplatino, etc.) (Gniazdowski M y cols., 2005).

Algunos medicamentos antitumorales han sido diseñados específicamente para inhibir la angiogénesis. Por ejemplo, el bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado anti VEGF, inhibe la actividad de VEGF bloqueando la unión con sus

receptores. Fue aprobado por la Agencia Estadounidense de Fármacos y Alimentos (FDA) en 2004, pero se ha demostrado que no es una terapia específica, por lo que en la actualidad se combina con 5-fluoracilo y ácido folínico en el tratamiento del cáncer de colon, mama y pulmón no microcítico (Bergers y Hanahn, 2008).

También se han diseñado fármacos anti-angiogénicos como el sorafenib, que inhibe las dianas tirosina-cinasa, y el sunitinib, que inhibe varios receptores con dominios tirosina-cinasa entre los que se encuentran PDGFR y VEGFR. Este último se usa para el tratamiento del carcinoma renal y del tumor estromal gastrointestinal, produciendo efectos secundarios no muy graves, aunque su coste económico es muy elevado. El aflibercept es un medicamento que consiste en receptores solubles de VEGF, cuya función es bloquear a VEGF. Está obteniendo muy buenos resultados en ensayos clínicos de fase III en cáncer colorectal y de próstata, aunque ha fallado en cáncer de pulmón metastásico (Bergers y Hanahn, 2008). Otras moléculas muy prometedoras son los agentes disruptores vasculares (VDA), que cambian la forma de las células endoteliales en la vasculatura tumoral causando debilidad vascular, trombos y aumento de la presión intersticial y de la viscosidad del flujo. En la actualidad se encuentran en ensayos clínicos de fase II y fase III (Eichloz y cols., 2010). Desgraciadamente, todavía no se ha conseguido ninguna molécula que sea totalmente eficaz en la inhibición de la angiogénesis, lo que es debido en la mayoría de los casos a que el tumor desarrolla mecanismos de escape del tratamiento. Se ha observado que después de un periodo de beneficios clínicos del orden de meses, se produce el desarrollo de nuevo del tumor (Carmeliet, 2000). Esta evasión no parece ser debida a mutaciones genéticas, sino al desarrollo de mecanismos compensatorios, que priman la actividad de otros factores proangiogénicos. También es posible que los inhibidores de VEGF al eliminar los vasos sanguíneos nuevos, aumenten el flujo y la oxigenación de los vasos existentes (Jain RK, 2005). Por todo ello, en la actualidad se cree que quizás se necesite desarrollar o bien un fármaco que sea muy eficaz en la inhibición del cáncer o bien que la solución sería utilizar combinaciones de varios anticancerígenos que consigan eliminar totalmente el tumor.

### **Mitramicina A**

La MTA es un producto natural aislado de *Streptomyces argillaceus* que pertenece a la familia de los derivados del ácido aureólico (Lombó y cols., 2006). Los derivados

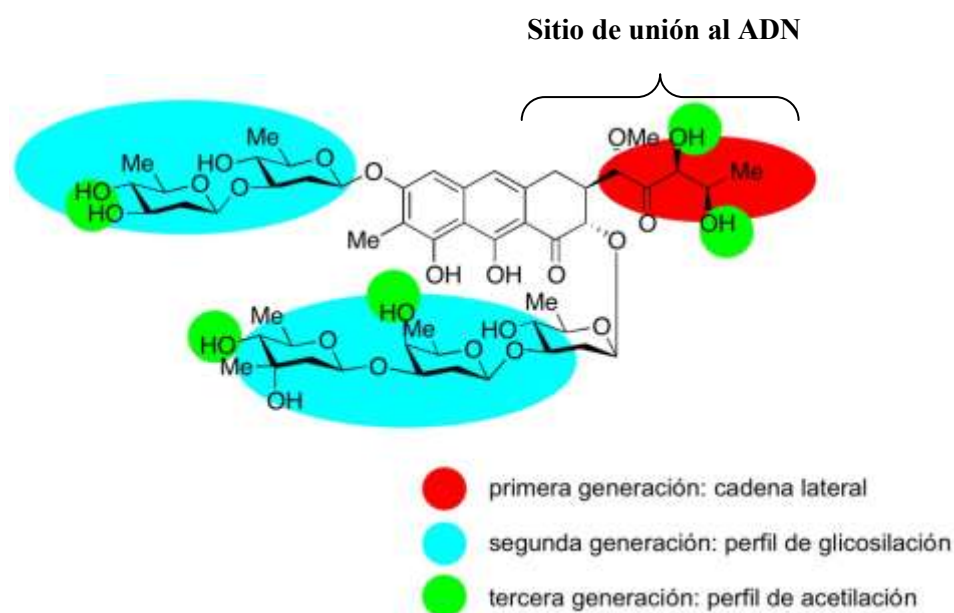
de esta molécula son antibióticos activos contra bacterias GRAM+ y *micobacterias*, aunque su elevada toxicidad ha impedido la generalización de su uso clínico en las enfermedades infecciosas. Sin embargo, algunos derivados como la cromomicina A, olivomicina A y la MTA han sido usados o son usados en clínica por su potente efecto antitumoral. En concreto la MTA ha sido usada en el tratamiento de la hipercalcemia causada por la metástasis ósea, la enfermedad de Paget, y en diferentes tipos de cáncer, como el carcinoma testicular y la leucemia (Hall TJ y cols., 1993) (Remsing LL y cols., 2003). La MTA ejerce su efecto antitumoral mediante la unión reversible al surco de zonas ricas en GC del ADN, inhibiendo por competición la función de diversos factores de transcripción, de los cuales históricamente Sp1 ha recibido más atención (Sastry M y cols., 1993) (Barceló F y cols., 2007). La eficacia de la MTA en la inhibición de la actividad de Sp1 la ha llevado a ser una herramienta muy popular en el estudio de las vías de traducción reguladas por este factor de transcripción, pero dada su elevada toxicidad, fundamentalmente gastro-intestinal, hepática, renal y sobre la médula ósea, no se usa actualmente como agente quimioterápico, excepto como tercera línea para tratar la hipercalcemia refractaria a bisfosfonatos y calcitonina.

Aunque el papel del MTA ha sido focalizado en su efecto sobre el factor de transcripción Sp1, no es el único factor que se une a secuencias ricas en GC, sino que existe una familia de factores de transcripción que también se unen a estas secuencias y que tienen conservado el dominio de unión al ADN formada por Sp1, Sp3 y Sp4, BTEB1, TIEG1, TIEG2 y una subfamilia de factores de transcripción denominados *Kruppel-like factors* (KLF). El papel de la MTA sobre estos factores de transcripción ha sido estudiado por Suske G y cols., 1999; Li L. y cols., 2004; Safe S. y cols., 2005 y Black AR y cols., 2001.

Desde el punto de vista de la diversidad química, los ácidos aureólicos representan una clase estructural infraexplotada. A pesar de que este compuesto fue identificado inicialmente en 1953 y desarrollado como fármaco a finales de los años 60, no se han realizado avances en el desarrollo de análogos mediante química médica hasta hace poco. Esto es debido en parte, a la complejidad de su estructura que llevó a una asignación incorrecta de su estructura hasta el año 1999, en el que el doctor Jose Antonio Salas, cofundador de la empresa EntreChem, la describió correctamente (Lombó F y cols., 2006). La empresa EntreChem es una «spin-off» de la Universidad de Oviedo, centrada en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para el

tratamiento del cáncer, provenientes de bacterias mediante tecnologías de ingeniería genética de rutas metabólicas y biocatálisis.

EntreChem ha tomado la MTA como compuesto líder para el desarrollo de otros derivados y ha evaluado la actividad antiproliferativa de varios análogos estructurales tanto *in vitro* como *in vivo* (dosis tolerada en ratones, farmacocinética y eficacia mediante xenotransplantes de tumores humanos en ratones inmunodeprimidos).



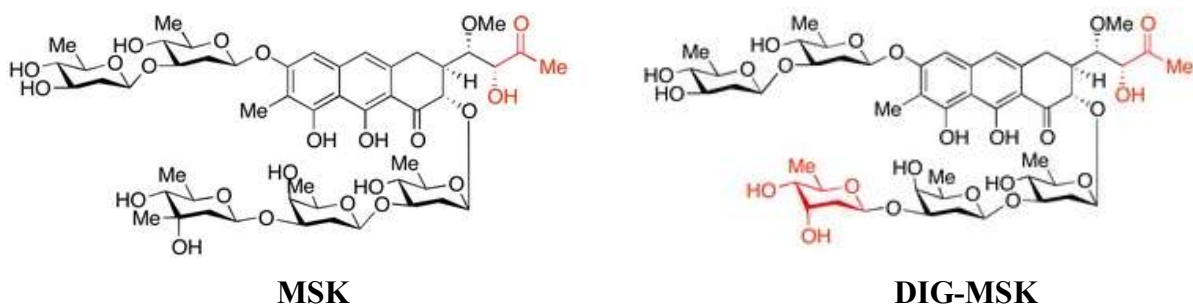
**Figura 10. Esquema de los derivados de la MTA.** Se han creado tres generaciones de derivados que se caracterizan por las modificaciones estructurales que poseen. La primera generación presenta cambios en la cadena lateral que es el lugar de unión al ADN, la segunda generación tiene alterado el perfil de glicosilación y la tercera generación presenta modificaciones en el perfil de acetilación.

Existen varias generaciones de análogos de la MTA, la primera generación muestra modificaciones en la cadena lateral. La segunda generación está compuesta por varios análogos que tienen modificado el dominio hidrocarbonado, pero sin afectar a la cadena lateral. La tercera generación es una combinación de las dos familias anteriores. La cuarta generación de análogos hace uso de biocatalizadores para modificar selectivamente los radicales hidroxilo de la molécula. Muchas de estas modificaciones alteran el sitio de unión al ADN del compuesto por lo que presumiblemente podría alterar la afinidad o la especificidad de unión de estos compuestos.

Algunos de estos análogos, han resultado ser menos tóxicos que MTA, pero igual o más eficaces en inducir regresiones tumorales a dosis no tóxicas en ratones

xenoinjertados con tumores humanos. La capacidad terapéutica de estos compuestos muestra la potencialidad de esta familia de análogos en el tratamiento del cáncer.

En concreto dos nuevos análogos de la mitramicina llamados mitramicina SK (MSK) y DIG-MSK (demícarosil-3D-β-D-digítosil-mitramicina SK; EC-8042) presentan actividades antitumorales similares *in vitro* e *in vivo*, pero DIG-MSK presenta menor toxicidad que MSK y del orden de una unidad de magnitud menos tóxico que MTA. Además la evaluación *in vivo* de la actividad antitumoral de DIG-MSK sugiere que este compuesto puede ser un antibiótico antitumoral muy prometedor. MSK y DIG-MSK difieren de la MTA en la cadena lateral del carbono 3, además DIG-MSK con respecto a MSK tiene cambios en el azúcar E del motivo trisacárido. (Nuñez L.E. y cols., 2012).



**Figura 11. Estructura de los compuestos MSK y DIG-MSK.** MSK y DIG-MSK difieren de la MTA en la cadena lateral del carbono 3, además DIG-MSK con respecto a MSK tiene cambios en el azúcar E del motivo trisacárido.

## Sp1

Sp1 es un factor de transcripción perteneciente a la familia Sp/KLF, de 785 aminoácidos y un peso molecular de 81 kDa. La familia Sp/KLF se caracteriza porque tiene un dominio de unión al ADN altamente conservado consistente en 3 dedos de zinc adyacentes. Existen 12.000 sitios potenciales de unión Sp1/Sp3 en el genoma humano, muchos de los cuales están asociados con casi todos los procesos celulares (Cawley y cols., 2004). Aunque se unan a las mismas regiones se ha probado que Sp1 y Sp3 se encuentran en el mismo promotor, pero en diferentes complejos (He y cols., 2005). Sp1 fue descrito inicialmente como factor ubicuo responsable de reclutar factores de transcripción que se unían a la caja TATA y de fijar el inicio de transcripción en promotores que carecen de caja TATA (Suske G. y cols., 1999). Sin embargo, en la

literatura reciente describe que Sp1 regula genes específicos de tejidos y genes implicados en la diferenciación celular, la progresión o parada del ciclo celular, y la oncogénesis, activando protooncogenes e inhibiendo genes supresores de tumores (Li li y cols., 2004). Además se ha observado que la expresión de Sp1 se encuentra aumentada en muchas células cancerígenas con respecto a células normales, e incluso los niveles muy elevados de Sp1 en algunos tipos de tumores, se asocian a un peor pronóstico (Wang y cols., 2003). En concreto Sp1 está incrementado en algunos tipos de tumores epiteliales y en el cáncer de páncreas, donde desempeña un papel clave en la agresividad y capacidad metastásica del tumor (Kumar Ap y cols., 1999; Yuang P y cols., 2007).

Sp1 y Sp3 son genes autorregulados que sufren diversas modificaciones postransduccionales que pueden afectar a su funcionalidad como son sumolaciones, acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones y glicosilaciones, las cuales están controladas por numerosas vías de transducción de señales implicadas en cáncer como MAPK o Ha-ras (Li y cols., 2004)

Dado su papel en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis o la angiogénesis, Sp1 desempeña un papel clave en el desarrollo de tumores y su inhibición puede tener importantes implicaciones terapéuticas (Albertini V. y cols., 2006). Por lo que es de nuevo es muy interesante el desarrollo de los análogos de la MTA, que posean una alta capacidad de inhibición de Sp1.



## **OBJETIVOS**

Debido al importante papel como un posible tratamiento frente al cáncer que podrían desarrollar alguno de los nuevos análogos de la MTA, nos hemos propuesto en el transcurso de esta tesis los siguientes objetivos:

1. Dilucidar los mecanismos de acción responsables de su diferente actividad antitumoral y toxicidad de los derivados de la MTA, en particular del DIG-MSK.
2. Estudiar el efecto que producen estos compuestos sobre la supervivencia y la muerte celular, y sobre la regulación del ciclo celular en líneas tumorales de ovario.
3. Evaluar la capacidad antiangiogénica de estas mitramicinas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **Material**

### **Cultivo de líneas celulares**

Durante el desarrollo de esta tesis se usaron diferentes líneas celulares para la evaluación de la acción de los derivados de la MTA. Realizando una agrupación de las mismas según el origen de la línea celular, obtenemos la siguiente tabla:

Línea celular	Tipo celular	Procedencia
A2780	Cáncer de ovario	Obtenidas de los Servicios Científicos-Técnicos. Universidad de Oviedo.
OVCAR-3		
IGROV-1		
SK-OV-3		
DLD-1	Cáncer de colon	Cedidas por el grupo del Dr. Mario Fraga, IUOPA.
HT-29		
PANC-1	Cáncer de páncreas	Cedidas por el grupo del Dr. Mario Fraga, IUOPA.
HEP-G2	Cáncer de hígado	Obtenidas de los Servicios Científicos- Técnicos. Universidad de Oviedo
MCF-7	Cáncer de mama	Obtenidas de los Servicios Científicos- Técnicos. Universidad de Oviedo.
HUVEC	Cultivo primario. Células endoteliales venosas umbilicales humanas	Obtenidas de la ATCC
H-MEC-1	Cultivo primario. Células endoteliales microvasculares humanas.	Cedidas por el grupo del Dra. Laura Sanz, Universidad Complutense de Madrid.

**Tabla 3. Líneas celulares utilizadas en esta tesis.** Se detallan las líneas utilizadas junto con su procedencia, agrupándolas según su origen tisular.

Las líneas A2780, SK-OV-3; OVCAR-3 e IGROV-1 se crecieron utilizando medio Roswell Park Memorial Institute, (RPMI 1640). Las líneas DLD-1, HT-29, Hep-G2, MCF-7 y PANC-1 se crecieron con medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Ambos fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen), previamente inactivado a 55°C durante 30 minutos, 2 miliMolar (mM) L-glutamina, 200 microgramos / mililitro ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de gentamicina. Las líneas HUVEC y H-MEC-1 se crecieron utilizando medio Kaighn's (F12K Sigma Aldrich) que es una modificación del medio Ham's F-12, suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen), 0,05 mg/ ml de suplemento de crecimiento de células endoteliales (Sigma Aldrich), 0,1 mg/ml heparina y 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicina. Todas las líneas celulares se crecieron en un incubador con aire humidificado (95%), 5% de  $\text{CO}_2$  y a una temperatura de 37 °C.

### **Células mononucleares de sangre periférica**

Las células sanguíneas mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas a partir de sangre de individuos sanos mediante la separación en un gradiente de ficol (Sigma Aldrich). A continuación se eliminaron los monocitos y se separaron los linfocitos, cultivándolos mediante la incubación en una placa de cultivo durante una hora en medio RPMI 1640 suplementado a 37°C en una atmosfera humidificada con 5%  $\text{CO}_2$ . Los individuos sanos usados como control se obtuvieron del Banco de Sangre Central del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), siendo informados previamente y habiendo firmado un consentimiento informado para la realización de los experimentos.

### **Anticuerpos empleados**

Los anticuerpos que se emplearon en esta tesis fueron los siguientes: anti CDk6 monoclonal (sc-7961), anti ciclina D2 monoclonal (sc-593), anti Sp1 monoclonal (sc-420X), anti VEGFR1 monoclonal (sc-271789), anti VEGFR2 policlonal (sc-504), anti PDGFR $\alpha$  policlonal (sc-338), anti  $\beta$ -actina policlonal (sc-1616), anti IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano (sc-2031), anti IgG de cabra unido a peroxidasa de rábano (sc-2004) de Santa Cruz Biotechnologies, y anti IgG de cabra Alexa 488 (A11029) de Molecular Probes.

## **Plásmidos y vectores de expresión**

Los plásmidos que contenían el promotor de los genes *CDK6* y *CCND2*, clonados en el vector p-Light-Switch-Prom fueron comprados a la empresa Switchgear genomics. El vector de respuesta al factor de transcripción Sp1, contiene la secuencia específica a la que se une Sp1 clonada en el vector TAC-Luc y fue comprado a la empresa Panomics. Los plásmidos “reporter” de los promotores de *ULBP-1*, *p21* y *MICA* se hallan clonados en el plásmido Bluescript KSII (Stratagene) y fueron realizados previamente en nuestro laboratorio (López Soto y cols., 2006), (Rodríguez Rodero y cols., 2007). Para la sobreexpresión de factores de transcripción en las líneas celulares se usaron, plásmidos en los que los genes de interés se hallaban clonados bajo el control del promotor del citomegalovirus humano (CMV). De esta clase se utilizaron los siguientes plásmidos: pN3-Sp1, vector de expresión del factor de transcripción Sp1, pN3-Sp3FL, vector de expresión del factor de transcripción que contiene todos los inicios de transcripción alternativos a partir de los que se generan las diferentes isoformas naturales de este factor y el vector control de ambos, el pN3, todos ellos donados amablemente por el Dr. G. Suske (Philipps-Universität Harburg, GE).

## **Mitramicinas y otros materiales**

La MTA, la MSK, el DIG-MSK y los compuestos EC-7073 y EC-8044 fueron aislados y purificados por la empresa Entrechem S.L. según se describe en Nuñez.L.E y cols, 2012. Se prepararon soluciones stock de los diferentes compuestos a concentraciones de 200 $\mu$ M y 200 mM en dimetil sulfóxido (DMSO) y se conservaron a -20°C, siendo diluidos a las concentraciones necesarias para realizar los experimentos, en el medio de cultivo correspondiente para cada línea celular.

Los diversos reactivos utilizados para la preparación de las distintas disoluciones fueron de calidad analítica y proceden de distintas compañías: Merck, Sigma y Prolabo, fundamentalmente. El agua utilizada fue de grado reactivo MilliQ-plus (Millipore). La tricostatina A (TSA) fue adquirida a Sigma.

## ***Técnicas de Biología molecular***

### **Cultivo de bacterias y transformación de *Escherichia coli* con plásmidos**

Para la propagación de los plásmidos se empleó la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (endA1, hsdR17, (rk-mk+), supe44, thi-1, lambda-, revA1, gyrA96, relA1, (lac-), [F', proAB, lacIqZM15, Tn10(tetr)]). Las bacterias se cultivaron en medio LB, ligeramente modificado (triptona 20 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7,5) y esterilizado en autoclave durante 20 min a 121°C. Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final de 15 g/L. La triptona y el extracto de levadura fueron suministrados por Oxoid, el agar por Difco y la ampicilina por Sigma.

Posteriormente, se prepararon células competentes según se ha descrito anteriormente (Inoue y col., 1990) y se almacenaron a -80 °C. Se añadieron de 0,1 a 0,5 ng de ADN plasmídico a 200 µL de células competentes recién descongeladas. Se mantuvieron en hielo durante 10 minutos, a continuación, se calentaron a 42 °C durante 45 segundos y se enfriaron de nuevo en hielo durante 2 minutos. Finalmente, las bacterias transformadas se extendieron en la superficie de placas de medio sólido LB con ampicilina (200 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante al menos 12 horas.

### **Purificación de DNA plasmídico**

Para llevar a cabo las purificaciones de ADN plasmídico a pequeña escala se partió de 1,5 mL de un cultivo bacteriano en fase estacionaria de la cepa recombinante. La purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo con un *kit* comercial, High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche.

### **Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR) semi-cuantitativa**

El nivel de expresión de los distintos genes regulados por Sp1, así como de los reguladores de la parada en fase G1 del ciclo celular y de las moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas, se determinó en las distintas líneas celulares mediante PCR semi-cuantitativa (qPCR). Para ello, se aisló en primer lugar el ARN total de cultivos de las líneas celulares usando el *kit* comercial High Pure RNA Isolation Kit (Roche) para purificación del ARN total. El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop, Thermofisher) y se sintetizó ADN complementario (ADNc) mediante el *kit*

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen) a partir de 5 µg de ARN. El ADNc obtenido se utilizó como molde para realizar las diferentes reacciones de PCR. El ADNc fue diluido 10 veces en agua destilada y se usaron 4 µL como molde en reacciones de PCR en las que se añadió el reactivo Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), en un volumen final de 20 µL. En este caso, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo usando un termociclador ABI7300 (Applied Biosystems), usando para ello los programas de amplificación aconsejados por el fabricante. Como medida para evitar las posibles diferencias debidas a la cantidad de ARN mensajero (ARNm) de partida, los niveles de expresión de cada gen de interés fueron normalizados con respecto a la expresión de un gen constitutivo que se usó como control interno, la gliceraldehido-3fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), determinado en las mismas muestras. Los resultados obtenidos fueron determinados de acuerdo con el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  descrito previamente (Livak y Schmittgen, 2001). El perfil de temperaturas usado fue 95 °C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 20 segundos, temperatura de anillamiento (específico para cada gen) durante 30 segundos y 70 °C durante 30 segundos. Los oligonucleótidos usados para la amplificación específica y sus temperaturas de anillamiento se muestran en la Tabla 4.

### *Análisis de proteínas*

#### **Análisis inmunocitofluorescentes**

Se determinó la presencia de las proteínas de Cdk6 o Ciclina D2 mediante técnicas de inmunofluorescencia en células tratadas con mitramicinas durante 24 horas. Para ello, las células se sembraron sobre cubreobjetos y, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) durante 10 minutos. A continuación, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0,5% disuelto en tampón PBS durante 5 minutos. Posteriormente, las muestras se bloquearon con FBS al 15% disuelto en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes, disueltos en la disolución bloqueante durante 3 horas. Por último, las células se lavaron con tampón PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados conjugados con fluoróforos durante 1 hora. Para visualizar el ADN nuclear, se añadió a las células 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Roche), a una concentración final de 100 ng/mL. Las muestras se



cubrieron en presencia de medio Vectashield (Dako) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia confocal (Leica).

### **Western-blot**

Se realizó con extractos de proteína total de las distintas líneas celulares. Para obtener dichos extractos, las células se lisaron con un tampón que contenía Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, NaF 50 mM, 1,4-ditiotreitol 1 mM, *cocktail* inhibidor de proteasas (Roche) y, *cocktail* inhibidor de fosfatasa I y II (Sigma). El homogeneizado celular se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Para preparar las muestras se re-suspendieron 30 ng de proteína, previamente medida mediante ensayo Bradford, (Bradford M.M., 1976) de cada extracto en un volumen final de 20 µL de tampón de disociación (SDS 2%, glicerol 9%, 2-mercaptoetanol 0,6%, Tris 60 mM, pH 6,8). A continuación, se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% para separar las proteínas mediante electroforesis. Seguidamente, el gel se incubó en tampón de transferencia (CAPS 10 mM, NaOH 4 mM, metanol 20%) durante 15 minutos. La transferencia a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham Biosciences) se realizó en el mismo tampón de transferencia durante 70 minutos a 50 V en un soporte Miniprotean II (Bio-Rad). Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se tiñeron con Ponceau para verificar que se habían cargado cantidades similares de proteína total en todas las calles. Las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con leche en polvo desnatada al 3% disuelta en tampón TBST [Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0.05% (Roche)] durante 1 h, tras lo cual la membrana se incubó durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario diluido en leche al 3% en TBST. La membrana se lavó durante 45 minutos con TBST y, por último, se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en leche al 1,5% en TBST. Tras lavar de nuevo con TBST, se llevó a cabo la detección de los complejos antígeno-anticuerpo mediante generación de quimioluminiscencia con un sustrato comercial (Millipore). Las bandas se midieron por densitometría usando el programa ImageJ (NCBI).

## ***Técnicas de Biología Celular***

### **Ensayos de captación**

Para realizar los estudios de captación, las células fueron cultivadas hasta la confluencia en placas de 6 pocillos. Se trataron con DMSO o mitramicinas a una concentración de 100  $\mu$ M. Tras 2 o 4 horas, las células fueron lavadas con PBS frío, centrifugadas y analizadas por citometría de flujo (BD FACScanto, Becton Dickinson). Para el aislamiento de los núcleos se siguió el protocolo usado en Albertini y cols, 2006, lisando en primer lugar las células y fijando luego los núcleos. La integridad de los mismos se confirmó mediante una tinción con Trypan blue y su observación al microscopio.

### **Ensayos de supervivencia celular**

Para estudiar la supervivencia de las distintas líneas celulares utilizadas en esta tesis, se usó el test fluorimétrico SRB (Vichai V. y cols 2006). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^3$  células/pocillo, y se incubaron con los compuestos durante 72 horas a una concentración de 200 nM. Tras la incubación, se absorbió el medio de los pocillos y se les añadió ácido tricloroacético al 10% durante 30 minutos, el cual tiñe las células que se encuentran proliferando. Se lavó tres veces con ácido acético 1% y se paró la tinción con Tris Base 10 mM. Por último, se midió la absorbancia a 510 nm y los datos fueron procesados, obteniendo el IC50.

### **Proliferación celular con CFSE**

Para evaluar la proliferación celular se trataron las células con 5  $\mu$ M de 5,6 carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) (Invitrogen) durante 72 horas siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se centrifugaron y se lavaron en 2 mL de tampón PBS que contenía 1% de albumina de suero bovino (BSA). Después de un lavado final, las células se analizaron por citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACScanto (Becton Dickinson).

### **Determinación del estadio del ciclo celular**

Para el análisis del ciclo celular, se incubaron las células en placas de 12 pocillos a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/pocillo y se trataron durante 24 horas con una concentración 200 nM de los distintos derivados de la MTA. A continuación se

lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con ioduro de propidio (Sigma Aldrich), analizando las muestras por citometría de flujo (FACSCanto, Becton Dickinson) como se describe en Carbone G.M. y cols., 2004. A continuación se analizaron obteniendo los porcentajes de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular.

### **Ensayos de apoptosis**

Para el estudio de la inducción de la apoptosis, se incubaron las células en placas de 12 pocillos a una concentración de  $5 \times 10^4$  células/pocillo y se trataron con los compuestos a una concentración de 200 nM y se incubaron durante 48 horas. A continuación se tiñeron las células con anexina V (Immunostep) y con 7-AAD (Immunostep) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La apoptosis fue evaluada mediante citometría de flujo (BD FACScanto, Becton Dickinson) y se separaron las células en histogramas según fuesen apoptóticas, necróticas, apoptóticas avanzadas o vivas. Con los porcentajes obtenidos se calculó la muerte específica de cada línea con cada compuesto, para lo cual se aplicó la fórmula:  $(\text{porcentaje de células muertas} - \text{porcentaje de células muertas en el control negativo}) / (100 - \text{porcentaje de células muertas en control negativo}) * 100$ .

Además para determinar si la apoptosis era mediada por vía endógena o exógena se midió la concentración de caspasa 9 con un kit fluorimétrico (Invitrogen). Para ello las células se incubaron en placas de 96 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^3$  células/pocillo, tras haber sido tratadas con una concentración 200 nM de los derivados de la mitramicina durante 48 horas. Después se siguieron las instrucciones del fabricante y se midió la absorbancia a 420 nm, los datos fueron analizados y procesados en forma de porcentaje de concentración de caspasa 9, tomando como 100% el nivel del DMSO.

### **Ensayos de migración**

Se realizaron ensayos de migración mediante el método de herida en placa. Para estos ensayos se utilizaron células de las líneas HUVEC y H-MEC-1, que fueron incubadas en placas de 6 pocillos hasta que se encontraron en confluencia. A continuación se realizó una herida en la zona central de los pocillos con una punta azul, se trataron con una concentración 200 nM de las mitramicinas y se incubaron en un incubador con aire humidificado al 95%, 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C. Las

células fueron monitorizadas con un microscopio invertido (Motic AE2000) y una cámara compatible (Motican 1000, Motic). Las imágenes se capturaron a 0, 16, 24, 48 y 72 horas y analizadas con el programa ImageJ (NCBI). Los datos se analizaron y fueron expresados como porcentaje de migración con respecto a la longitud inicial de la herida.

### **Ensayos de la formación de capilares**

El ensayo de formación de estructuras de forma capilar (CLS) fue realizado en colaboración con la empresa Leadartis en células H-MEC-1. Las células fueron incubadas en placas de 96 pocillos que contenían Matrigel y tratadas con los compuestos. Tras 16 horas se tomaron imágenes y se procesaron con el software Angiodraw para calcular el índice angiogénico (AI). Los resultados del AI fueron correlacionados con los resultados de la inhibición de la proliferación que producían los mismos compuestos sobre estas células, para ver si el efecto de la reducción de AI podría ser debido a fenómenos de citotoxicidad.

### **Transfección transitoria y ensayo de la actividad luciferasa**

Todas las transfecciones se llevaron a cabo utilizando Lipofectamina LTX (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se sembraron  $5 \times 10^3$  células por pocillo en placas de 12 pocillos, 24 horas antes de llevar a cabo la transfección. Transcurrido este tiempo, se incubaron 300 ng de la construcción correspondiente clonada en pGL2-Basic más 12 ng del vector pRL-null (Promega) en 50  $\mu$ L de medio durante 5 minutos a temperatura ambiente. El plásmido pRL-null contiene el ADNc codificante de luciferasa de *Renilla (Rluc)* y, gracias a que cataliza una reacción de bioluminiscencia diferente de la de *Firefly*, sus actividades son fácilmente distinguibles. Por otro lado, se incubaron 0,75  $\mu$ L de Lipofectamina LTX en 50  $\mu$ L de RPMI 1640 sin suplementar durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron el ADN plasmídico y la Lipofectamina para permitir la formación de los complejos y se dejaron transcurrir 20 min a temperatura ambiente. Por último, se repartieron 100  $\mu$ L de cada mezcla de complejos a cada pocillo correspondiente. A las 4 horas se añadieron los tratamientos que correspondían a cada pocillo con medio completo. Tras 24 horas, se prepararon extractos celulares y se midieron las actividades *firefly* y *renilla* luciferasa usando el *kit* Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) en un luminómetro Turner TD20/20.

En el caso de las cotransfecciones usadas para evaluar el efecto de las mitramicinas en células que sobreexpresan Sp1 o Sp3, se mezclaron 400 ng de los vectores de expresión o del vector vacío usado como control junto con 100 ng del vector de Sp1 en 50  $\mu$ L de medio durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se siguió el protocolo descrito anteriormente.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS v.20 (IBM Corp.). Los resultados representa la media  $\pm$  DSM (Desviación estándar de la media) de un rango comprendido entre tres a seis experimentos. Las diferencias significativas se obtuvieron evaluando los datos con un test t de Student, el test U Mann-Whitney o un análisis unimodal de la varianza Kruskal-Wallis.

Gen	Primer directo	Primer reverso	Temperatura de anillamiento
<i>SP1</i>	CCAGGATGTGGTAAAGTCTA	CTCCATTGTCTCATTTCAG	60°C
<i>SP3</i>	CCAGGATGTGGTAAAGTCTA	CTCCATTGTCTCATTTCAG	60°C
<i>ULBP1</i>	ATCAGCGCCTCCTGTCCAC	AAAGACAGTGTGTGTCGACCCAT	60°C
<i>C-MYC</i>	GGTCTCCCCTACCCTCTCAACGA	GGCAGCAGGATAGTCCTTCCGAGT	55°C
<i>C-SRC</i>	GCTGACTTCGACAACGCCAAG	CCCCTTGAGAAAGTCCAGCAA	55°C
<i>TERT</i>	TGAACTTGC GGAAGACAGTG	GGGTTCTTCCAAACTTGCTG	60°C
<i>BCL-XL</i>	GAAGGGACTGAATCGGAGATGGA	AGAGTGGATGGTCAGTGTCTGGTCAT	55°C
<i>BRCA2</i>	CGTACACTGCTCAAATCATT	GACTAACAGGTGGAGGTAAAG	60°C
<i>MIC-A</i>	CACCTGCTACATGGAACACAGC	TATGGAAAGTCTGTCCGTTGACTCT	60°C
<i>CDKN2A</i>	TCGTGCTGATGCTACTGAGG	TTCTTTCAATCGGGGATGTC	60°C
<i>CDKN2D</i>	CTGAGGTCATGATGTTTGG	CAGCAGTGTGACCCTCTTGA	60°C
<i>TP53</i>	TGCGTGTGGAGTATTTGGATG	TGGTACAGTCAGAGCCAACCAG	60°C
<i>CDKN1A</i>	GGAAGACCATGTGGACCTGT	AAGATGTAGAGCGGGCCTTT	60°C
<i>CDKN1B</i>	AATAAGGAAGCGACCTGCAA	CCTCCCTTCCCCAAAGTTA	50°C
<i>CDKN1C</i>	AGATCAGCGCCTGAGAAGTC	GGGACCAGTGTACCTTCTCTCG	58°C
<i>MDM2</i>	TGAAGGTTTCTCTCCTGAAG	TTATTAAGTCTGTTGGTGCA	58°C
<i>CCND1</i>	GGATGCTGGAGGTCTGCGAGGAAC	GAGAGGAAGCGTGTGAGGCGGTAG	55°C
<i>CCND2</i>	CATGGAGCTGCTGTGCCACG	CCGACCTACCTCCAGCATCC	55°C
<i>CCND3</i>	CTGGCCATGAACTACCTGGA	CCAGGAAATCATGTGCAATC	58°C
<i>CCNE</i>	CTCCAGGAAGAGGAAGGCAA	TCGATTTTGGCCATTTCTTCA	60°C
<i>RB</i>	GGAGTTCGCTTGTATTACCG	AAGTTGCTTCTGCTTTGAT	55°C
<i>E2F</i>	TCTCCCAGAACCGCTGTTT	CGAAGTGGTAGTCGAGGGC	60°C
<i>ATM</i>	GATGTTGTTGTCCCTATATGG	GCTACACTGCGCGTATAAGCC	57°C
<i>CDK2</i>	TTTCTGCCATTCTCATCGG	CTTGGCTTGTAAATCAGGCATAGA	55°C
<i>CDK4</i>	CAGGACCTAAGGACATATCTGGA	CTCGGTACCAGAGTGTAACAACC	60°C
<i>CDK6</i>	CCGAGTAGTGCATCGGATCTAA	CTTTGCTAGTTCATCGATATC	66°C
<i>CDK12</i>	AACAGACTTGAGCAGCTCCC	ATAACTGTGCCCAGGGATG	55°C
<i>FGF</i>	CAG CTG TAC AAG AAC AGA GGC	AAA TGG GTC CAT GCT GTC GGT CTC C	60°C
<i>FGFR</i>	CAT CCG CTG GCT TAA GGA TGG	ATC ACG AGA CTC CAG TGC TGA TG	60°C
<i>PDGFA</i>	CCCCTGCCATTCCGAGGAAGAG	TTGGCCACCTTGACGCTGCGGTG	62°C
<i>PDGFB</i>	GATCCGCTCCTTTGATGATC	GTCTCACACTTGCATGCCAG	60°C

<i>PDGFRA</i>	ATCAATCAGCCCAGATGGAC	TTCACGGGCAGAAAGGTACT	60°C
<i>PDGFRB</i>	AATGTCTCCAGCACCTTCGT	AGCGGATGTGGTAAGGCATA	58°C
<i>EGF</i>	TGCCAACTGGGGGTGCACAG	CTGCCCGTGGCCAGCGTGGC	60°C
<i>VEGFA</i>	AGGAGGAGGGCAGAATCATCA	CAGGGATTTTCTTGTCTTG	62°C
<i>VEGFB</i>	AGCCAGTGTGAATGCAGA	ATAGCCTCTGAGGCAAGT	62°C
<i>VEGFC</i>	AGGCCACGGCTTATGCAA	TAGACATGCATCGGCAGGAA	62°C
<i>VEGFD</i>	CATCTCAGTCCACAT TGG	GGCAAGCACTTACAACCT	62°C
<i>VEGFR1</i>	AAAAACAACCACAAAATACAACA	TCTTAATGCCAAATGCTGATGCTT	50°C
<i>VEGFR2</i>	ACGTCTGGTCTTTTGGTGTTC	ATACTGACTGATTCTGCTGTGTT	50°C
<i>VEGFR3</i>	CCTGAAGAAGATCGCTGTTT	GAGAGCTGGTTCCTGGAGAT	65°C
<i>HINF1A</i>	TGCTTGGTGCTGATTTGTGA	GGTCAGATGATCAGAGTCCA	68°C
<i>ENDOSTATINA</i>	ATGCTGACATTCACCTGCC	ATGAAGTCAGCACCTGCTGG	60°C
<i>ANGIOSTATINA</i>	GAATTCATGTGCAAGACTGGGAA TGGAA	TTGAATTCTTAACAGGACGGTATCTTACA	60 °C
<i>TSP1</i>	CCTCAGGAACAAAGGCTGCTC	GCCAATGTAGTTAGTGCGGATG	60°C
<i>TUMSTATINA</i>	TTAAAGGGAAATCCTGGTGAC	GTTCTGGTTTCTTTGATTTTCG	60°C
<i>RTEF-1</i>	CCACGAAGGTCTGCTCTTTC	CTCACTGGCTGACACCTCAA	60°C
<i>GAPDH</i>	CGGAGTCAACGGATTTGGTC	AATCATATTGGAACATGTAAACCATGTA G	-

**Tabla 4. Cebadores usados en este trabajo.**

## **RESULTADOS**



Durante el desarrollo de esta tesis, la empresa Entrechem realizó una serie de experimentos para testar los diferentes análogos de la MTA de última generación. Dos de ellos, resultaron ser muy eficaces, los compuestos MSK y DIG-MSK. En concreto el compuesto DIG-MSK se perfiló como una sustancia muy prometedora debida a la baja toxicidad que presentaba (Nuñez LE. y cols., 2012).

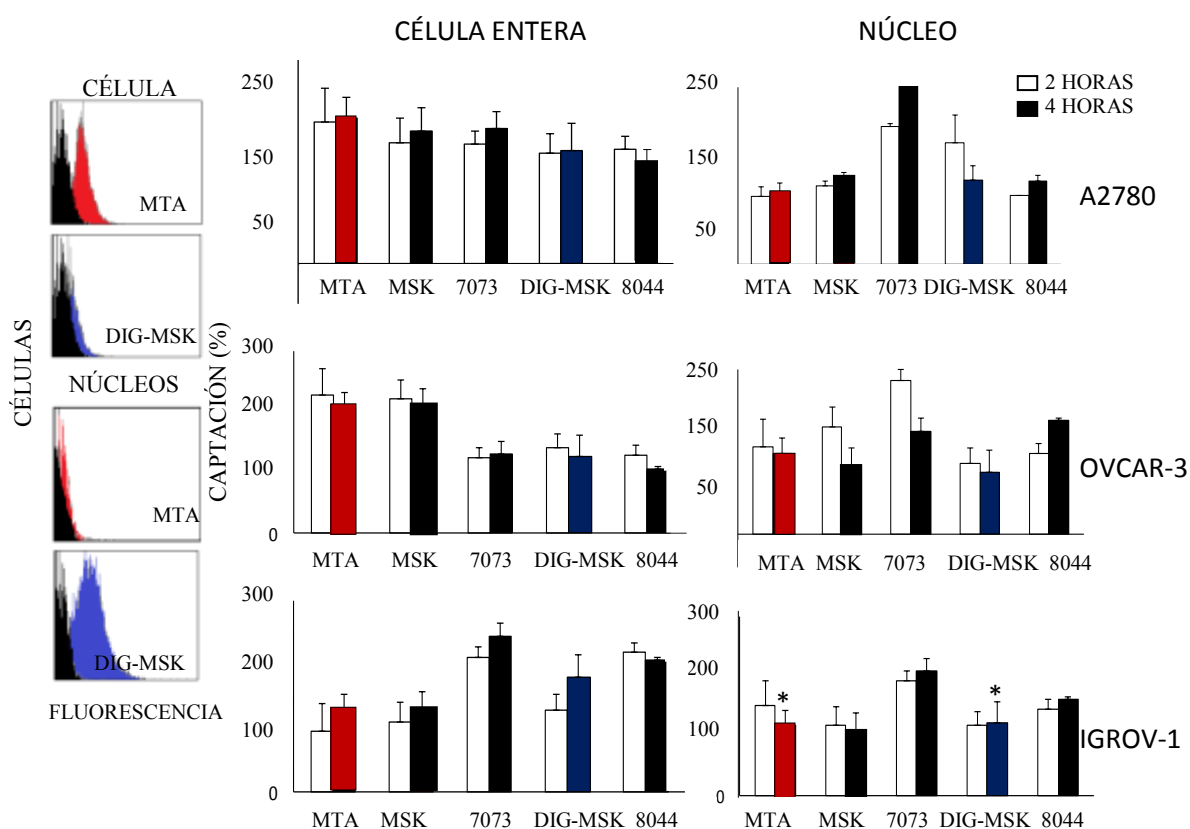
### **Las modificaciones estructurales de los derivados de la MTA no conllevan una modificación en su patrón de captación**

Para evaluar el posible efecto funcional que podrían tener las modificaciones estructurales que poseen los análogos, MSK, EC-7073, DIG-MSK y EC-8044 con respecto a la MTA, se estudió en primer lugar su patrón de captación celular y nuclear. Los experimentos fueron realizados en tres líneas tumorales de ovario A2780, OVCAR-3 e IGROV-1, ya que estudios previos habían mostrado que las mitramicinas son muy eficaces en estos cánceres ginecológicos (Albertini y cols., 2006). Las células se trataron durante 2 y 4 horas con una concentración 200  $\mu$ M de cada uno de estos compuestos, concentración elevada que permite la evaluación de la captación de las mitramicinas aprovechando sus propiedades autofluorescentes. Como control negativo se utilizó DMSO y tras la incubación, las células se lavaron y se analizaron en el citómetro de flujo. Para el aislamiento de los núcleos se siguió el protocolo usado en trabajos anteriores (Albertini y cols., 2006), lisando en primer lugar las células y fijando luego los núcleos. Se realizaron tres experimentos independientes y como se muestra en la figura 12, los resultados indican que, la captación de los diferentes análogos de la MTA ocurrió en todas las líneas celulares de ovario de manera muy rápida. Estos experimentos mostraron que las mitramicinas se captaron tras la incubación durante 2 horas, mientras que una incubación más prolongada durante 4 horas no resultó en un aumento significativo de la concentración de estos compuestos. Además las mitramicinas alcanzaron el núcleo de todas las líneas celulares a las 2 horas y la incubación posterior durante 4 horas tampoco involucró una mayor captación.

Si atendemos a las pequeñas diferencias que se encontraron entre las líneas tumorales, se observa que en la línea A2780 se produjo una mayor captación a nivel de núcleo celular de los compuestos 7073 y DIG-MSK con respecto a la MTA. En OVCAR-3, se produjo una mayor captación a célula entera del compuesto MSK y de la MTA, pero sin embargo, es el compuesto 7073 el que presentó una mayor captación a nivel nuclear. En la línea IGROV-1

aunque existe una mayor captación a célula entera de los compuestos MSK, DIG-MSK y 8044, ésta no conlleva una mayor captación a nivel nuclear.

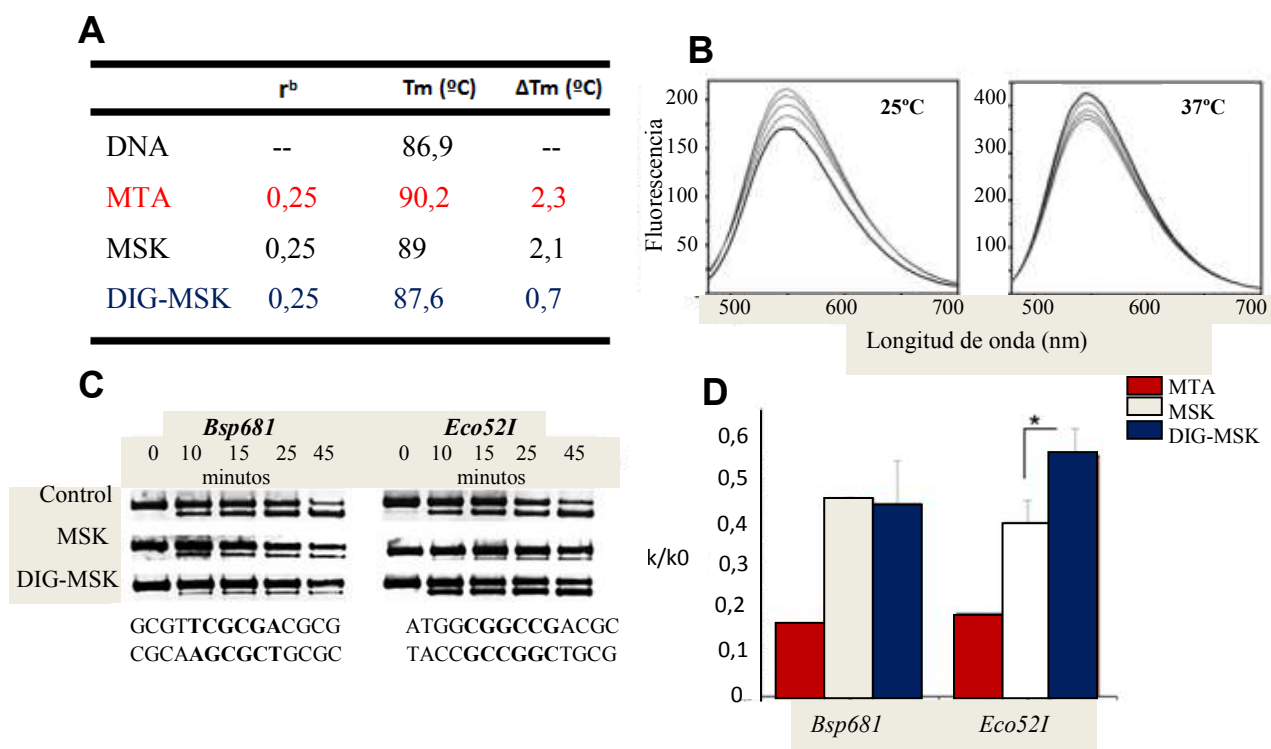
Tomando en conjunto todos estos experimentos parecen indicar que el comportamiento de los compuestos depende del tipo de línea celular, pero que en todos se produjo una captación muy eficaz de todas las mitramicinas. No parece que las diferentes modificaciones introducidas en los análogos afecten de una forma muy significativa a la captación celular y nuclear en las líneas tumorales analizadas.



**Figura 12. Captación de los análogos de la MTA: MSK, EC-7073, DIG-MSK y EC-8044. Las modificaciones estructurales de las diferentes mitramicinas no conllevan una modificación en su patrón de captación.** Células tumorales de ovario de tres líneas diferentes: A2780, OVCAR-3 e IGROV-1, fueron incubadas durante 2 o 4 horas con una concentración 200  $\mu$ M de los compuestos o con DMSO, que se usó como control negativo. En la parte izquierda, se representan imágenes obtenidas con citometría de flujo durante la captación tanto de la MTA como del compuesto DIG-MSK en célula entera (imágenes superiores) o a nivel de núcleo celular (imágenes inferiores) en la línea A2780, tras 4 horas de incubación. A la derecha se muestran los gráficos obtenidos de la media y desviación estándar de tres experimentos independientes, en los cuales se representa el porcentaje de captación de cada una de las mitramicinas, tanto en célula entera, como a nivel de núcleo celular a las 2 y a las 4 horas, en tres líneas tumorales de ovario. Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando SPSS, mediante el test U Mann-Withney.

## Los cambios estructurales que presentan MSK y DIG-MSK alteran su especificidad de unión al ADN con respecto a la MTA

En colaboración con el grupo del Dr. José Portugal de la Universidad de Barcelona, estudiamos la unión al ADN de los compuestos MSK y DIG-MSK. En una primera aproximación, se exploró la unión al ADN de MSK y DIG-MSK monitorizando los cambios en la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del ADN, calculada a una absorbancia de 260 nm frente a la  $T_m$  en presencia de las mitramicinas (Fig. 13A). El aumento de los valores de  $T_m$  obtenidos a un índice de 0,25 compuesto/pares de bases de ADN (bp) que corresponde a una estequiometría de 4 moles de ADN (bp) por mol de compuesto, fue suficiente para saturar los sitios de unión al ADN ricos en bases G/C. Este resultado nos indica que ambos análogos se unen al ADN y que en concreto el compuesto MSK se une más fuertemente que DIG-MSK.



**Figura 13. Los cambios estructurales que presentan MSK y DIG-MSK alteran su especificidad de unión al ADN con respecto a la MTA.** **A.** Tabla que muestra la temperatura de fusión de ADN de timo bovino, las curvas de fusión se midieron  $r = \text{droga/ADN (bp)}$  ratio molar; un  $r = 0,25$  corresponde a la estequiometría de unión de 4 moles de pares de bases por mol de droga. **B.** Curvas de fluorescencia de los complejos formados entre  $Mg^{2+}$ -dímeros de DIG-MSK y ADN a 25°C (izquierda) y 37°C (derecha). **C.** Geles de agarosa representativos que muestran el patrón de protección frente al corte de las enzimas de restricción *Bsp681* y *Eco52I* en el plásmido linealizado pBR322 en presencia de MSK y DIG-MSK o en ausencia de tratamiento (control) a distintos tiempos de exposición. **D.** Representación mediante histogramas de la inhibición del corte de las enzimas de restricción obtenido en presencia de análogo de mitramicina (k) y su ausencia ( $k_0$ ). Los resultados estadísticos fueron obtenidos utilizando un test Kruskal Wallis con el programa SPSS.

También se realizaron experimentos de trititación fluorescente, los cuales nos mostraron que el comportamiento de soluciones tritizadas de DIG-MSK con una concentración de ADN de timo bovino era diferente cuando se realizaba a 25°C y a 37°C (Fig. 13B). Mientras que a 25°C la fluorescencia se incrementaba tras la adición de concentraciones crecientes de ADN, a 37°C se extinguía. Mas aún, tras alcanzar un índice de 5-6 bp/concentración molar de compuesto, no existían diferencias en la fluorescencia a ninguna temperatura. Por ello, nos fue imposible obtener valores experimentales que nos permitieran crear modelos de unión, ya que estos requieren una intensidad de emisión linealmente proporcional a la concentración de la droga.

Como no pudimos obtener una cuantificación de la unión al ADN del compuesto DIG-MSK, utilizamos una nueva aproximación para tratar de analizar las diferencias que existen en la unión al ADN entre los compuestos MSK y DIG-MSK. Para ello analizamos las diferencias que presentan ambos compuestos en la inhibición de la acción de enzimas de restricción sobre un plásmido lineal de ADN. Los resultados obtenidos indican que MTA protegió mejor que MSK o DIG-MSK las secuencias 5'-TCGCGA-3' (*Bsp68I*) y 5'-CGGCCG-3' (*Eco52I*) de la digestión con enzimas de restricción (Fig. 13C). Además MSK mostró un efecto mayor que DIG-MSK en la inhibición ejercida sobre *Eco52I* ( $p < 0.05$ ) (Fig. 13D).

En conjunto, los valores más elevados de  $T_m$  en presencia del compuesto MSK y la mayor protección de la secuencia 5'-CGGCCG-3' que produjo, nos indican que MSK se une más fuertemente al ADN que DIG-MSK y además presentan diferencias significativas en la especificidad de unión. Podemos asimismo proponer que, las diferencias de unión entre ambos compuestos son debidas a las diferencias estructurales que presentan, ya que tanto las modificaciones presentes en MSK como en DIG-MSK se encuentran en el sitio de unión al ADN de la molécula parental.

### **DIG-MSK es un potente inhibidor de la transcripción mediada por Sp1 y de la expresión de Sp1**

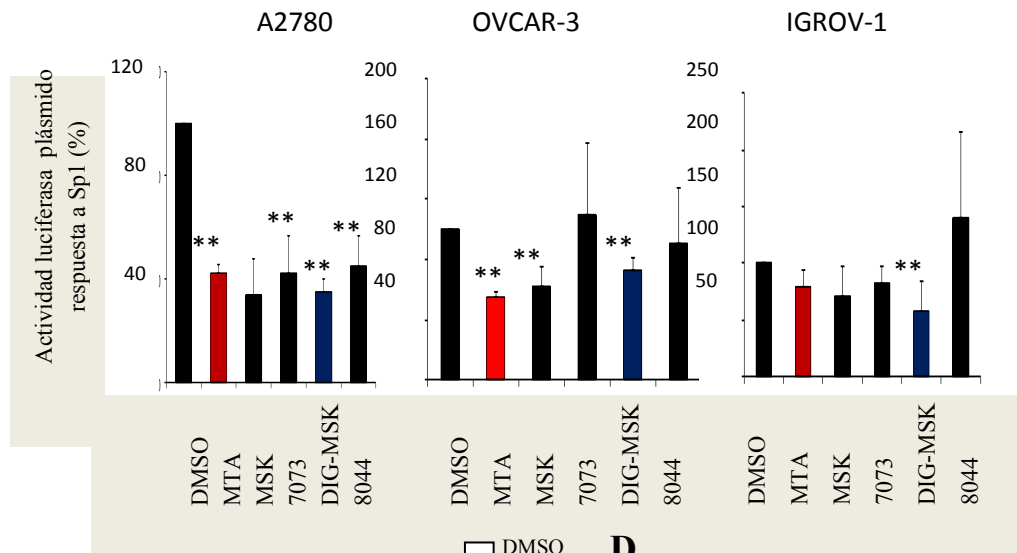
La MTA, como se explica en la introducción, actúa uniéndose a secuencias ricas en bases G/C e inhibiendo a diversos factores de transcripción, entre los cuales el más estudiado ha sido Sp1 (Sastry M. y cols., 1993). Decidimos, por tanto, averiguar si, ya que DIG-MSK poseía un patrón de unión al ADN diferente, conservaba la capacidad de inhibición de Sp1.

Para ello, se examinaron los efectos de DIG-MSK en la expresión de la transfección transitoria de un vector de luciferasa que contenía diversos elementos de respuesta a Sp1 (cajas GC) en las líneas de cáncer de ovario. Las células fueron transfectadas durante 4 horas, tras las cuales se les reemplazó el medio y se les suministraron los tratamientos, incubándolas durante 24 horas con dosis 200 nM de las diferentes mitramicinas. La MTA es usada habitualmente como una herramienta para averiguar si Sp1 está implicado en la regulación de promotores en cultivo celular (Sleiman SF. y cols., 2011). Por ello, la usamos como control positivo para DIG-MSK en los experimentos y usamos al resto de los análogos, que poseen diferentes modificaciones estructurales, para comparar la efectividad de DIG-MSK. Como control negativo se trataron las células con DMSO.

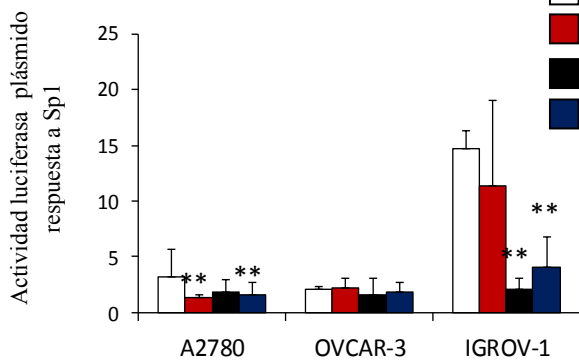
Los resultados de seis experimentos independientes nos muestran que DIG-MSK retiene la capacidad de la MTA de inhibir de manera muy potente la actividad del promotor inducida por Sp1 en las líneas tumorales de ovario ( $p < 0,01$ ) (Fig. 14A). Además si analizamos los resultados en detalle, podemos observar que en concreto en la línea IGROV-1, es la única mitramicina que produjo una inhibición significativa, del orden de un 40% de inhibición, mientras que en el resto de las líneas la respuesta siempre es similar a la MTA.

Además de analizar el efecto de los diferentes análogos sobre la transcripción basal mediada por Sp1, se analizó si eran capaces de inhibir la transcripción cuando la actividad de Sp1 era inducida. Para ello, la actividad promotora inducida por Sp1 fue aumentada mediante la transfección transitoria de un vector de expresión de Sp1 en las líneas de ovario (Fig. 14B). Tras cotransfectar el vector de expresión de Sp1, con el vector respuesta durante 4 horas, las células fueron incubadas durante 48 horas con una concentración 200 nM de MTA, MSK o DIG-MSK. Los resultados de tres experimentos independientes muestran que tras la sobreexpresión de *Sp1*, las mitramicinas redujeron la actividad promotora en un 50% en la línea A2780 y en un 70% en IGROV-1, mientras que en OVCAR-3 no se observaron diferencias significativas. Comparando el efecto con el control negativo, DIG-MSK mostró un efecto anti-transcripcional similar o mayor que el producido por la MTA en la presencia del vector de expresión de Sp1.

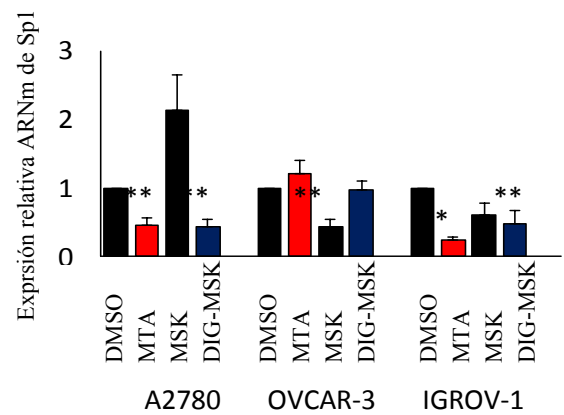
**A**



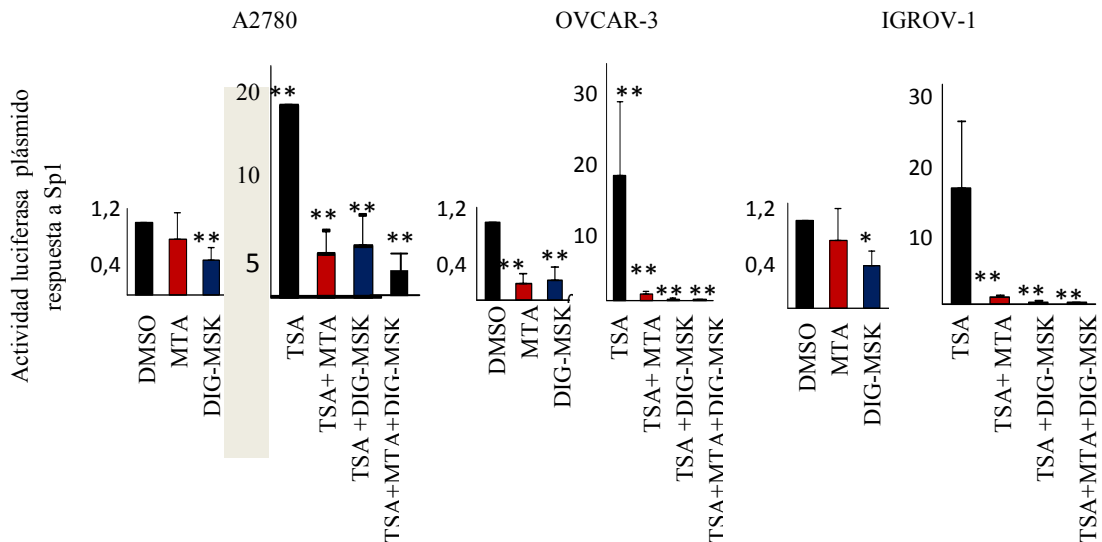
**B**



**D**



**C**



**Figura 14. Efectos sobre la transcripción mediada por Sp1 de MTA y DIG-MSK. A.** Porcentajes de expresión de luciferasa obtenidos con transfección transitoria del plásmido de respuesta a Sp1, tras 24 horas de incubación con una dosis 200 nM de las mitramicinas. **B.** Inhibición de la inducción de la expresión de Sp1, mediante la cotransfección transitoria del vector de expresión de Sp1, con el plásmido respuesta a Sp1 tras 48 horas de incubación con una dosis 200 nM de mitramicinas. **C.** Inhibición de la respuesta inducida a Sp1, mediante la inducción de la transfección transitoria del plásmido respuesta a Sp1 con el tratamiento con TSA. Se trata durante 24 horas con una dosis 200 nM de mitramicinas. **D.** Expresión relativa del nivel de ARNm de Sp1 con respecto al nivel de expresión de GAPDH, obtenidas mediante qPCR, en células tratadas durante 8 horas con una concentración 200 nM de MTA y DIG-MSK. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante un test U Mann Withney utilizando el programa SPSS.

También, se analizó el efecto de estas mitramicinas sobre la actividad del plásmido respuesta a Sp1 en las células de ovario transfectadas con el vector respuesta de Sp1 y tratadas durante 24 horas con tricostatina A (TSA), un inhibidor de las desacetilasas de histonas que aumenta la actividad de Sp1 (Yang PM y cols, 2012). El tratamiento con TSA indujo significativamente la actividad promotora en las tres líneas analizadas, al menos en un 200%. La figura 14C muestra que incluso en la presencia de TSA, MTA y DIG-MSK reducen la actividad luciferasa, cerca de un 80% de expresión en la línea celular A2780, y reducen prácticamente el 100% en las líneas IGROV-1 y OVCAR-3. En todas las líneas la reducción producida por DIG-MSK es 2 veces la producida por MTA.

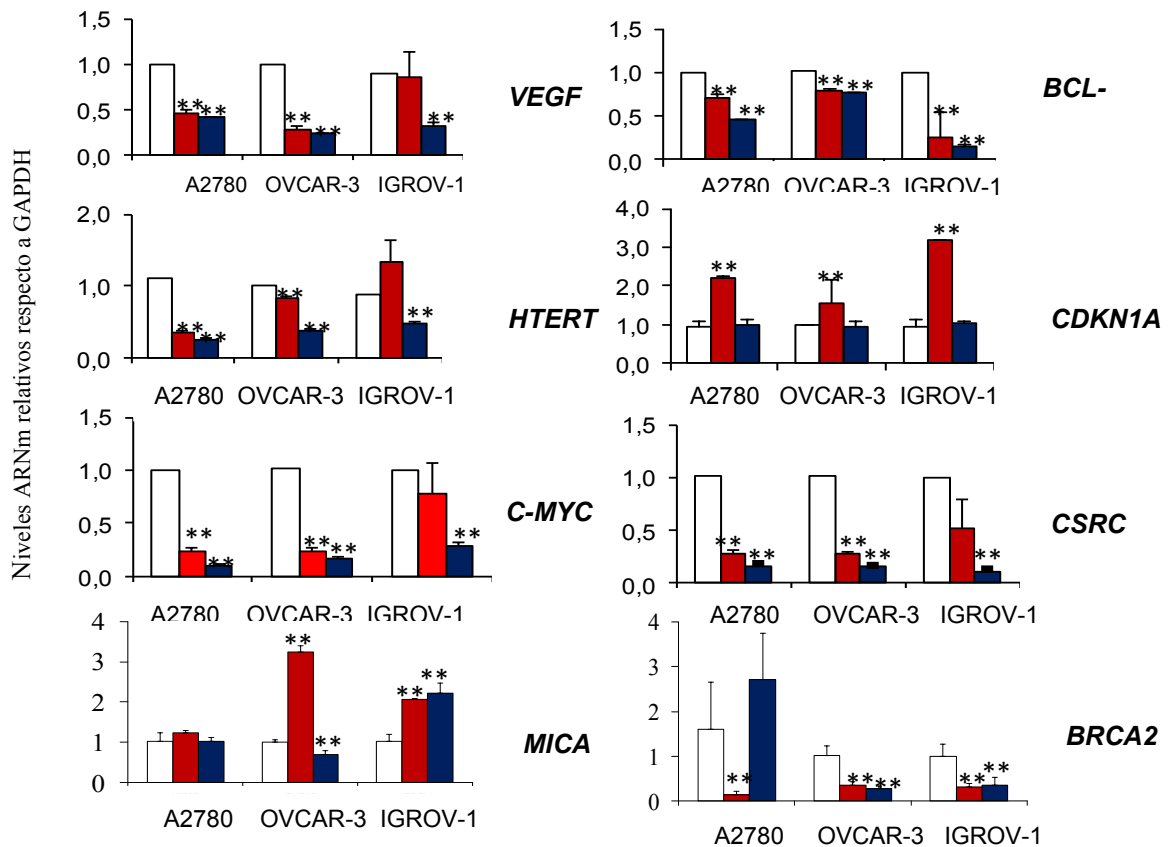
Como el gen *Sp1* se regula a sí mismo mediante una retroalimentación positiva, evaluamos los efectos sobre la transcripción del gen endógeno. Para ello las líneas tumorales de ovario se incubaron durante 8 horas (que fue seleccionada después de realizar una cinética de respuesta), con dosis 200 nM de MTA, MSK y DIG-MSK, y se extrajo ARN. Tras la obtención de ADNc, los niveles de expresión del gen endógeno se midieron por qPCR, y se analizaron los datos comparándolos con la inducción del gen *GAPDH*. Los resultados de tres experimentos independientes (Fig. 14D) indican que DIG-MSK produjo una inhibición significativa de la expresión de *Sp1* de un 50% en las líneas A2780 e IGROV-1 ( $p < 0,01$ ) similar al efecto de la MTA, con respecto al control negativo (células tratadas con DMSO).

Analizando en conjunto todos los resultados, nos indican que DIG-MSK es un potente inhibidor de la transcripción mediada por Sp1 y de la expresión génica de *Sp1* en las líneas celulares de ovario. Pero este efecto es similar a la MTA, por lo que no es probable que sea responsable de la mayoría de las diferencias farmacológicas que poseen ambos compuestos.

### **Regulación de protooncogenes por la MTA y el DIG-MSK**

Una vez observado que las diferencias estructurales del compuesto DIG-MSK producían una unión diferente al ADN que la MTA, y que era un potente inhibidor de Sp1, junto con datos proporcionados por la empresa Entrechem que indicaban que DIG-MSK presentaba baja toxicidad en experimentos con xenotransplantes, decidimos centrarnos en este compuesto a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A continuación evaluamos si las diferencias estructurales que presentaban ambos compuestos se traducían en diferencias en la regulación que ejercían sobre la expresión de ARNm de diferentes protooncogenes, regulados de una forma muy importante por Sp1. Estos genes además, están implicados en importantes procesos para el desarrollo de un cáncer, como son *VEGF*, que es el principal activador de la angiogénesis (Ferrara y cols., 2002), *H-TERT*, implicado en la senescencia (Masutomi y cols., 2005), *C-MYC*, regulador de la proliferación (Hanahan y Weinberg, 2011), *BCL-XL*, implicado en apoptosis (McDonnell y cols., 1989), *BRCA2*, involucrado en la reparación de daño cromosómico (Hanahan y cols., 2011), *C-SRC*, que controla el crecimiento celular (Bishop y Varmus, 1982), *CDKN1A* regulador del ciclo celular (Hanahan y Weinberg, 2011), y *MIC-A* que está implicado en la respuesta inmune antitumoral (González S. y cols., 2008).



**Figura 15. Regulación de protooncogenes regulados por Sp1, por la MTA y el DIG-MSK.** Los histogramas muestran los niveles de expresión relativa de ARNm comparado con la expresión de GAPDH obtenidos mediante qPCR en las tres líneas tumorales de ovario en ausencia (control negativo tratado con DMSO) o presencia de tratamiento con una concentración 200 nM de MTA o DIG-MSK durante 8 horas, para diversos protooncogenes involucrados en diferentes procesos cancerígenos. Se muestran las medias de tres experimentos independientes, las diferencias significativas se obtuvieron mediante el análisis estadístico con un test U Mann Withney utilizando SPSS.



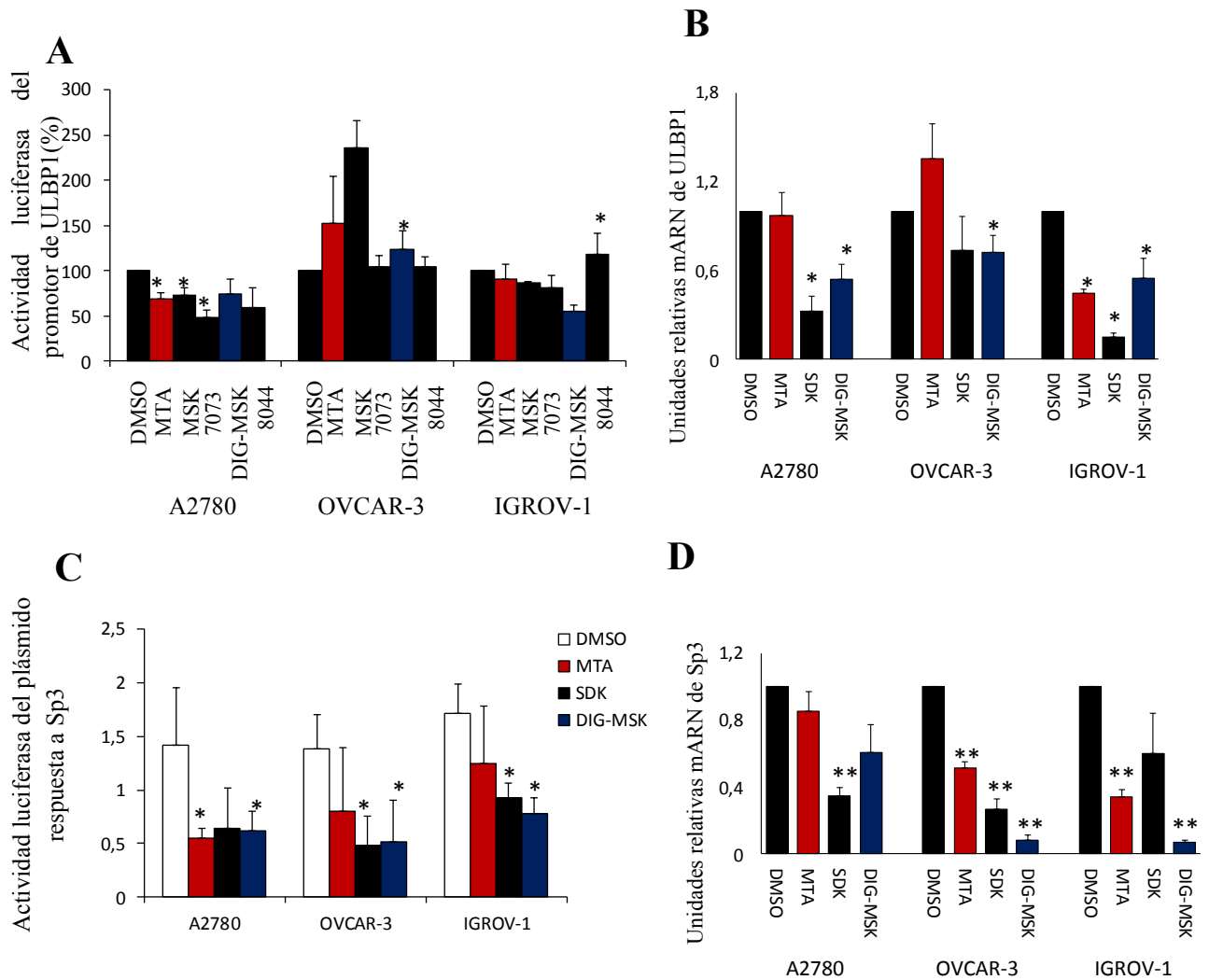
Se cultivaron las líneas celulares de ovario, A2780, OVCAR-3 e IGROV-1 durante 8 horas con una concentración 200 nM de MTA y DIG-MSK, y DMSO como control negativo. Tras la extracción de ARN y la obtención de ADNc, se analizaron los efectos de estas mitramicinas sobre la expresión de los genes mediante qPCR, comparando la expresión con la del gen *GAPDH* (Fig. 15). Los resultados obtenidos de tres experimentos independientes nos indican que ambos compuestos provocaron una inhibición de la expresión de estos genes, aunque existen diferencias entre líneas. En concreto DIG-MSK produjo un aumento del 50% de la expresión de *BRCA2* en la línea A2780 y un aumento de la expresión del 200% de *MIC-A* en la línea IGROV-1. Sin embargo, en el resto de casos produjo una inhibición superior en al menos un 20% de la producida por MTA. Cabe destacar que DIG-MSK no posee efecto sobre la expresión de *CDKN1A*, expresión que es aumentada por la MTA.

Podemos concluir que el efecto del DIG-MSK sobre la inhibición de la expresión de estos protooncogenes fue igual o superior al de la MTA, y que la diferente unión al ADN no parece impedirlo.

### **DIG-MSK es un inhibidor más potente que la MTA de la expresión de *Sp3* y de la transcripción mediada por *Sp3***

*Sp3* es un factor de transcripción, miembro de la familia Sp/KLF y que mantiene el dominio de unión al ADN en forma de dedo de zinc, uniéndose al igual que *Sp1* a cajas ricas en GC (Suske G., 1999). Debido a que el DIG-MSK se comportaba de forma similar a la MTA en la regulación de *Sp1*, se estudió su efecto sobre *Sp3*. Para ello, se transfectaron durante 4 horas, las células de ovario con un plásmido luciferasa que contenía el promotor de *ULBP1*, gen cuyo promotor está regulado específicamente por *Sp3*, siendo capaz de inducir la transcripción de su promotor hasta 500 veces (Lopez-Soto A y cols., 2006). A continuación las células transfectadas fueron incubadas durante 24 horas con una concentración 200 nM de las mitramicinas y DMSO como control negativo. La Fig. 16A muestra los resultados de tres experimentos independientes, observándose que MTA y DIG-MSK fueron capaces de inhibir la actividad del promotor de *ULBP1* en las líneas celulares de ovario A2780 e IGROV-1, siendo la capacidad inhibitoria del DIG-MSK un 200 % mayor que de la MTA en las células IGROV-1. *Sp3* es además un factor de transcripción bifuncional, pudiendo estimular o inhibir la actividad promotora de los genes, posiblemente

por ello la MTA y el DIG-MSK indujeron la expresión del promotor de ULBP1 en OVCAR-3.



**Figura 16. Efectos sobre la transcripción mediada por Sp3 de MTA y DIG-MSK.** **A.** Se muestran los porcentajes medios de actividad luciferasa, obtenidos con transfección transitoria del promotor del gen ULBP1 clonado en un vector de respuesta de luciferasa en las células de ovario. Tras 4 horas de transfección, las células fueron tratadas con una dosis 200 nM de mitramicinas, o con DMSO como control negativo, durante 48 horas. **B.** Inhibición de la expresión de ARNm del gen ULBP1 comparado con respecto a GAPDH, obtenido mediante qPCR en las tres líneas de ovario tratadas con una dosis 200nM de mitramicinas durante 8 horas. **C.** Los gráficos muestran las inhibiciones de la respuesta inducida de Sp3 que promovieron las mitramicinas, mediante la cotransfección transitoria del vector de expresión de Sp3 con el vector respuesta a Sp3 durante 4 horas y el posterior tratamiento de las células con una concentración 200 nM de mitramicinas durante 48 horas. Se usó DMSO como control negativo. **D.** Expresión relativa del nivel de ARNm de Sp3 con respecto al nivel de GAPDH obtenido mediante qPCR, en las tres líneas de ovario tratadas con una dosis 200nM de mitramicinas durante 8 horas. Se puede observar el potente efecto inhibitorio de dicha expresión ejercido por DIG-MSK. Todos los datos mostrados en esta figura corresponden a la media de tres experimentos, y los resultados fueron analizados estadísticamente usando un test U Mann Withney, con el programa SPSS.

El siguiente experimento que realizamos fue el análisis del efecto de la MTA y del DIG-MSK sobre la expresión del gen *UBLP1* (Fig. 16B). Para ello, las líneas tumorales de

ovario fueron tratadas durante 8 horas con una dosis 200 nM de los compuestos, tras la extracción de ARN y obtención de ADNc, se realizaron tres experimentos independientes. Los datos fueron analizados comparando la inducción del ARN con respecto a la del GAPDH, y tomando la expresión de los genes en las células tratadas con DMSO como control negativo. DIG-MSK inhibió la expresión de *UBLP1* un 40% en A2780 e IGROV-1 y un 20% en OVCAR-3, mientras que la MTA sólo inhibió la expresión de *UBLP1* un 50% en IGROV-1 y produjo un aumento del 30% de expresión en la línea OVCAR-3.

Para analizar más profundamente el efecto del DIG-MSK sobre la actividad promotora dependiente de Sp3, se cotransfectaron el vector de expresión de Sp3 con un plásmido que contenía diversos elementos respuesta a Sp3, en las líneas tumorales de ovario durante 4 horas. Posteriormente las células transfectadas se cultivaron durante 48 horas con una dosis 200 nM de mitramicinas y con DMSO como control negativo. Los resultados de tres experimentos independientes nos mostraron que DIG-MSK produjo un efecto más potente que la MTA, ya que fue capaz de inhibir la actividad del promotor inducida por la sobreexpresión de Sp3 en un 80%, en las tres líneas celulares analizadas, mientras que la MTA solo pudo inhibirla en la línea A2780 (Fig. 16C). Para comprobar el efecto de estas mitramicinas sobre la expresión de *SP3*; se analizó dicha expresión mediante q-PCR (Fig. 16D). Los resultados indican que, tanto la MTA como el DIG-MSK produjeron una inhibición significativa en las líneas IGROV-1 y OVCAR-3, aunque la inhibición realizada por DIG-MSK en estas líneas es del 80% mientras que la producida por la MTA es del 40% en OVCAR-3 y del 50% en IGROV-1.

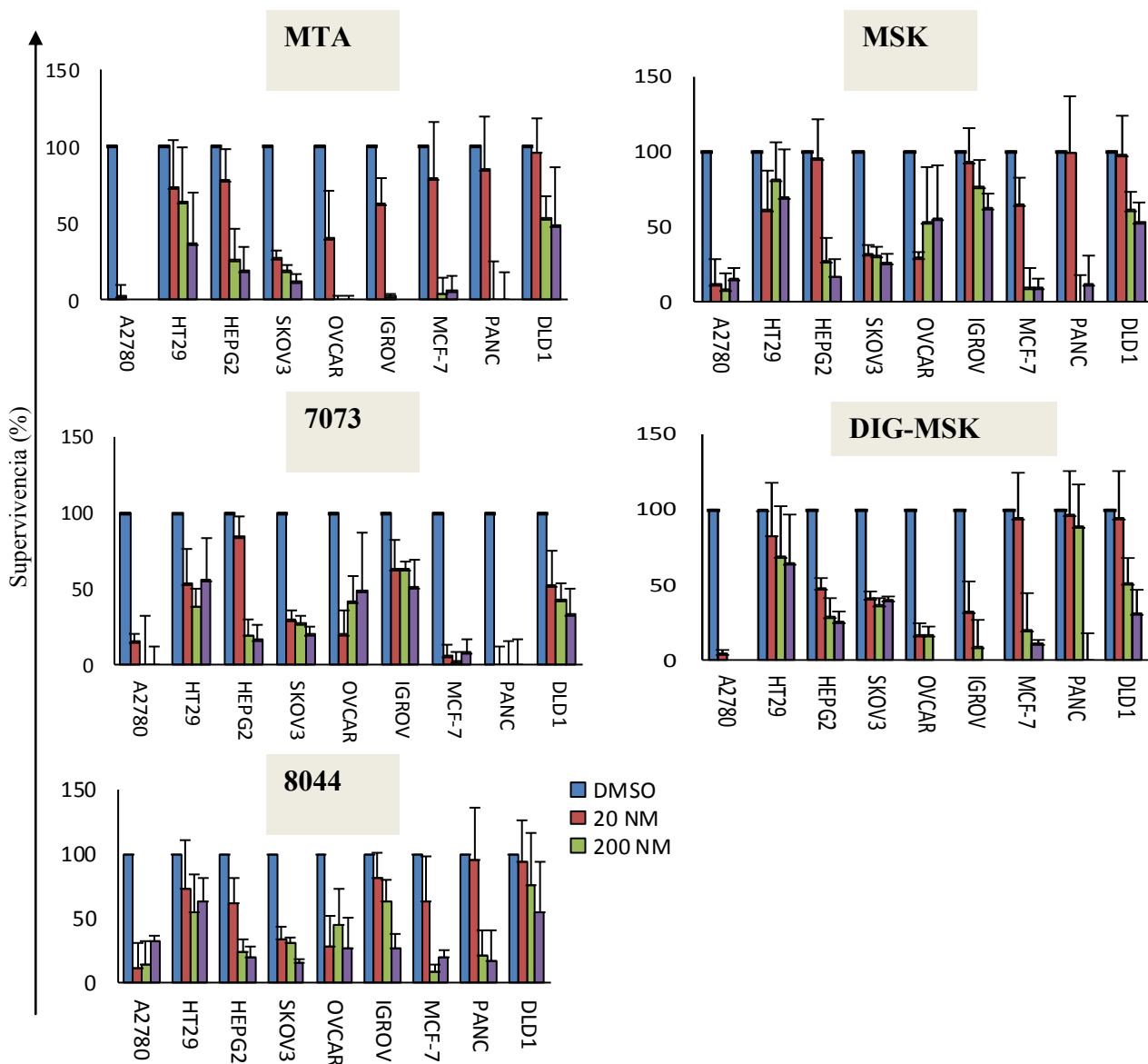
Tomando en conjunto todos los resultados obtenidos, sugieren que DIG-MSK es un potente inhibidor de la expresión de *Sp3* y de la transcripción mediada por Sp3. Su efecto fue mucho mayor que la MTA en las tres líneas de ovario analizadas, y estas diferencias podrían suponer un impacto significativo en la actividad farmacológica de ambos compuestos.

## *CICLO CELULAR*

### **Efecto de la MTA y el DIG-MSK en la supervivencia de líneas tumorales**

Nuestros resultados mostraron que DIG-MSK se comportaba de forma diferente a la MTA, en cuanto a su unión al ADN y su inhibición del factor de transcripción Sp3. Además en experimentos llevados a cabo por la empresa Entrechem, se obtuvo que DIG-

MSK era el mejor candidato de los análogos de la MTA, debido a su baja toxicidad (Nuñez LE. y cols., 2012). Estos datos concordaban con los que habíamos encontrado en un primer estudio del efecto de los diferentes análogos de la MTA sobre la supervivencia celular. Para el cual, se trataron con concentraciones crecientes de mitramicinas (0, 20 nM, 200 nM y 2 μM) las líneas celulares de ovario A2780, OVCAR-3, IGROV-1 y SK-OV-3, de mama, MCF-7, de páncreas, PANC-1, y de colón, HT-29 y DLD-1, durante 72 horas. La supervivencia se analizó mediante el test SRB y los datos obtenidos señalaron que DIG-MSK es el análogo más eficaz, sobre todo en líneas tumorales de ovario, en las que a dosis 20 nM redujo ya la supervivencia cerca del 50% (Fig. 17).



**Figura 17. Inhibición de la supervivencia de las diferentes líneas tumorales por parte de los análogos de la MTA.** Se trataron con concentraciones crecientes de mitramicinas (0, 20 nM, 200 nM y 2 μM) las diferentes líneas celulares durante 72 horas. La supervivencia se analizó mediante el test SRB. Se muestra la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar.

Decidimos por tanto, evaluar el efecto que poseía este compuesto en comparación con la MTA sobre la supervivencia de las diferentes líneas tumorales, en un estudio más exhaustivo y obteniendo como medida comparativa el IC50 de los compuestos en las distintas líneas (Tabla 5). Para ello se trataron con concentraciones crecientes de mitramicinas (0, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 nM) las líneas celulares de ovario A2780, OVCAR-3, IGROV-1 y SK-OV-3, de mama, MCF-7, de páncreas, PANC-1, de colón, HT-29 y DLD-1, y endoteliales, H-MEC-1 y HUVEC durante 72 horas. La supervivencia se analizó mediante el test SRB.

<b>LÍNEA CELULAR</b>	<b>IC50 MTA</b>	<b>IC50 DIG- MSK</b>
<b>H-MEC-1</b>	7 nM	8 nM
<b>HUVEC</b>	39,87 nM	47,15 nM
<b>A2780</b>	<b>13,57 nM</b>	<b>2,84 nM</b>
<b>OVCAR-3</b>	<b>3 nM</b>	<b>6,75 nM</b>
<b>IGROV-1</b>	136 nM	<b>7,5 nM</b>
<b>SK-OV-3</b>	<b>10,5 nM</b>	<b>16,23 nM</b>
<b>MCF-7</b>	99,36 nM	17,26 nM
<b>PANC-1</b>	33,83 nM	434,7 nM
<b>DLD-1</b>	209,9 nM	180 nM
<b>HT-29</b>	1,2 µM	2,56 nM

**Tabla 5. Análisis de la inhibición de la supervivencia ocasionada por MTA y DIG-MSK en distintas líneas celulares.** En la tabla se muestran los IC50 obtenidos de la media de tres experimentos independientes en los cuales se evaluó la supervivencia celular con el test SRB, tras el tratamiento durante 72 horas de las distintas líneas celulares con dosis crecientes de MTA o DIG-MSK. Se usó DMSO como control negativo. Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Los resultados de tres experimentos independientes nos muestran, que ambos compuestos fueron muy eficaces inhibiendo la supervivencia de las distintas líneas, ya que

el IC50 tiene unidades de concentración nanomolar, excepto en la línea HT-29 (Tabla 5). El efecto fue además mucho mayor en las líneas de ovario, como ya está descrito en la bibliografía (Albertini y cols., 2006), en concreto el IC50 de DIG-MSK fue 2,84 nM para A2780, 6,75 nM para OVCAR-3 y 7,5 nM para IGROV-1. Cabe destacar que además el efecto inhibitorio de DIG-MSK fue similar o mayor que el de MTA, excepto en la línea PANC-1.

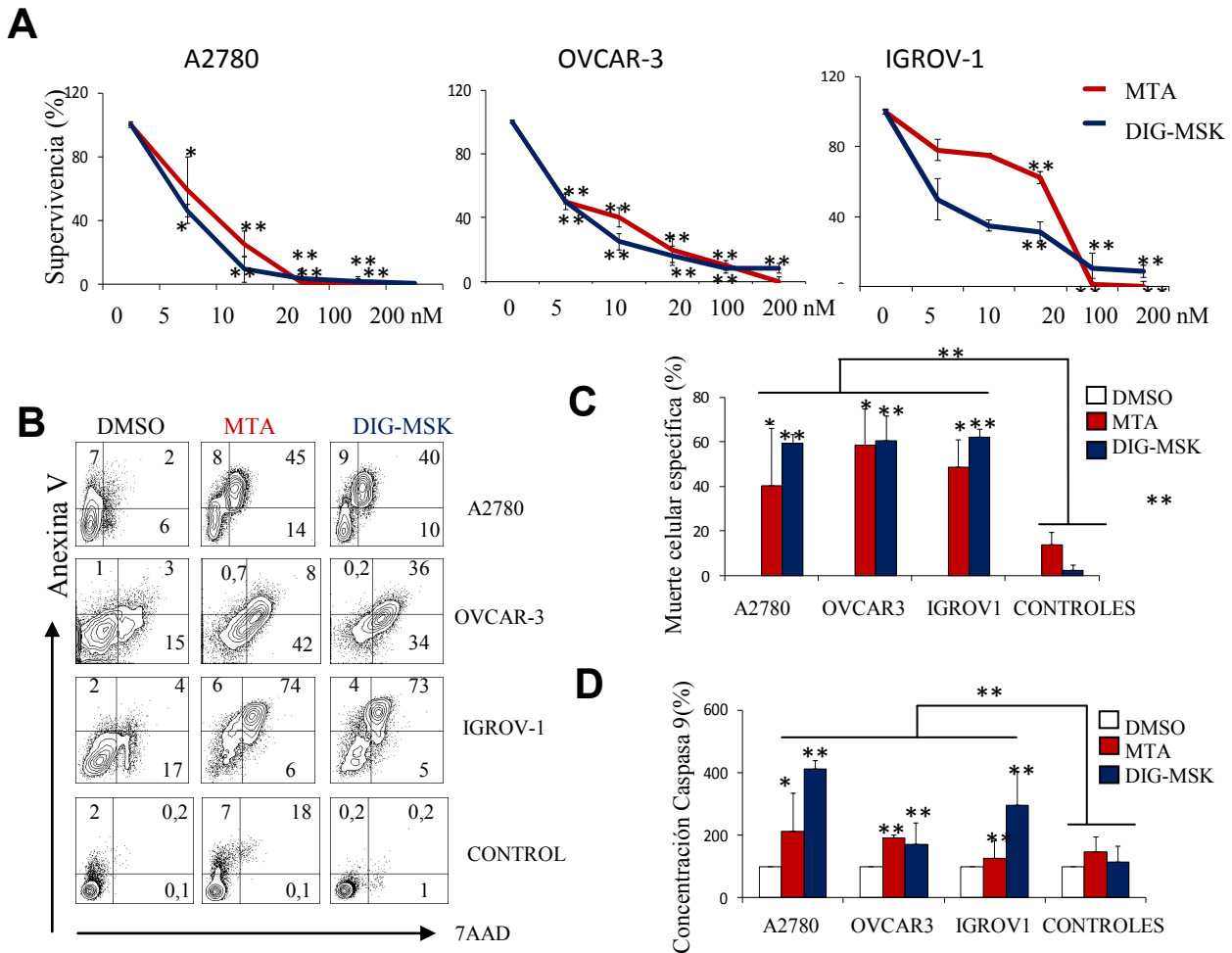
### **La MTA y el DIG-MSK inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis en células de cáncer de ovario**

En trabajos previos se estudió el efecto inhibitorio de la MTA y de sus análogos SK y SDK sobre genes involucrados en el crecimiento celular y la supervivencia (Albertini et al, 2006). Tras haber analizado la inhibición de la supervivencia que produjeron ambas mitramicinas sobre las líneas celulares de ovario y obtenido su IC50, se observó que además la MTA inhibió totalmente la proliferación de las líneas de ovario y DIG-MSK la redujo en aproximadamente un 90% a una dosis 200 nM (Fig. 18A).

Una característica muy interesante de un quimioterápico es su capacidad de inducir la muerte celular mediante apoptosis de células tumorales, pero no de las células sanas. Por ello, se evaluó el efecto que ejercían MTA y DIG-MSK sobre la apoptosis de las líneas de ovario. Las células tumorales de ovario fueron incubadas con una concentración 200 nM de los compuestos durante 48 horas, posteriormente se tiñeron con anexina V para marcar apoptosis y 7AAD para marcar necrosis, y se analizaron utilizando un citómetro de flujo. Las células se separaron en histogramas según fuesen apoptóticas, necróticas, apoptóticas avanzadas o vivas. Estos efectos fueron comparados con los producidos por los compuestos sobre PBMCs de 4 individuos sanos, usados como control que se obtuvieron del Banco de Sangre Central del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), siendo informados previamente y habiendo firmado un consentimiento informado para la realización de los experimentos (Fig. 18B). Para la obtención de PBMCs, estos se separaron en un gradiente de ficoll, eliminando a continuación los monocitos y separando los linfocitos.

Los resultados obtenidos muestran que ambas mitramicinas produjeron un incremento de la apoptosis en las tres líneas celulares de ovario, pero no en los PBMCs de los individuos sanos. Con los porcentajes obtenidos se calculó la muerte específica de cada línea con cada compuesto. Si analizamos la muerte celular específica producida en las células de ovario, se observa que alrededor del 50% de las células tratadas con MTA y del 60% de las tratadas con DIG-MSK han sufrido apoptosis, mientras que en los PBMCs, solo

el 15% sufre apoptosis con MTA y el 2.5% con DIG-MSK (Fig. 18C). Además es muy relevante destacar que la baja toxicidad que produjo DIG-MSK en los PBMCs de donantes sanos, fue 6 veces menor que la MTA.



**Figura 18. MTA y DIG-MSK inducen la muerte celular de las líneas tumorales de ovario. A.** Representación gráfica de la media de tres experimentos independientes en los que se muestra la reducción de la supervivencia que provocan en las líneas de ovarios tras 72 horas de incubación con concentraciones crecientes de mitramicinas y su análisis utilizando el test SRB. **B.** Imágenes obtenidas del citómetro de flujo representando los porcentajes de células que se encuentran en apoptosis (marcadas con Anexina V) y necrosis (marcadas con 7AAD) en cada línea celular y un control sano, en ausencia de tratamiento (DMSO) o tratamiento con 200 nM de MTA y DIG-MSK durante 48 horas. Se presenta un ejemplo representativo de cada línea. **C.** Gráfico que muestra la muerte celular específica que produce cada compuesto en cada línea celular. Se calculó la muerte específica de cada línea con cada compuesto, para lo cual se aplicó la fórmula: (porcentaje de células muertas – porcentaje de células muertas en el control negativo) / (100- porcentaje de células muertas en control negativo) \*100. Los resultados muestran la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. **D.** Representación gráfica de los de la concentración de caspasa 9, medida con un kit fluorimétrico (Sigma Aldrich). Se representa en porcentajes ya que se compara la concentración inducida por el tratamiento con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK con respecto a la concentración obtenida en el control negativo (células tratadas con DMSO), para células de ovario y PBMCs de individuos sanos. Los datos muestran la media y desviación estándar de tres experimentos independientes, los resultados fueron analizados mediante un test U Mann Withney utilizando el programa SPSS.

La caspasa 9, como se describe en la introducción, es la caspasa iniciadora de la apoptosis por vía endógena (Taylor C.R. y cols., 2008), por lo que se utilizó como indicador de la actividad interna de la vía apoptótica. Se analizó el aumento en la concentración de caspasa 9 producido por el tratamiento con una concentración 200nM de MTA y DIG-MSK en las células de ovario durante 48 horas y en los PBMCs de cuatro donantes sanos (Fig. 18D), con un kit fluorimétrico y se midió la absorbancia a 420 nm. Los resultados de tres experimentos independientes, nos mostraron que se produjo un aumento importante de la concentración de caspasa 9 en las células de ovario, tras el tratamiento con estos compuestos. En concreto, se produjo un aumento de la concentración de 2 veces con el tratamiento con MTA y de 4 veces con DIG-MSK con respecto a los valores de células sin tratamiento, en la línea A2780. En los individuos sanos, el incremento de la concentración de caspasa 9 es sólo del 0.5% en MTA y los valores producidos por DIG-MSK son similares a los de las células sin tratamiento.

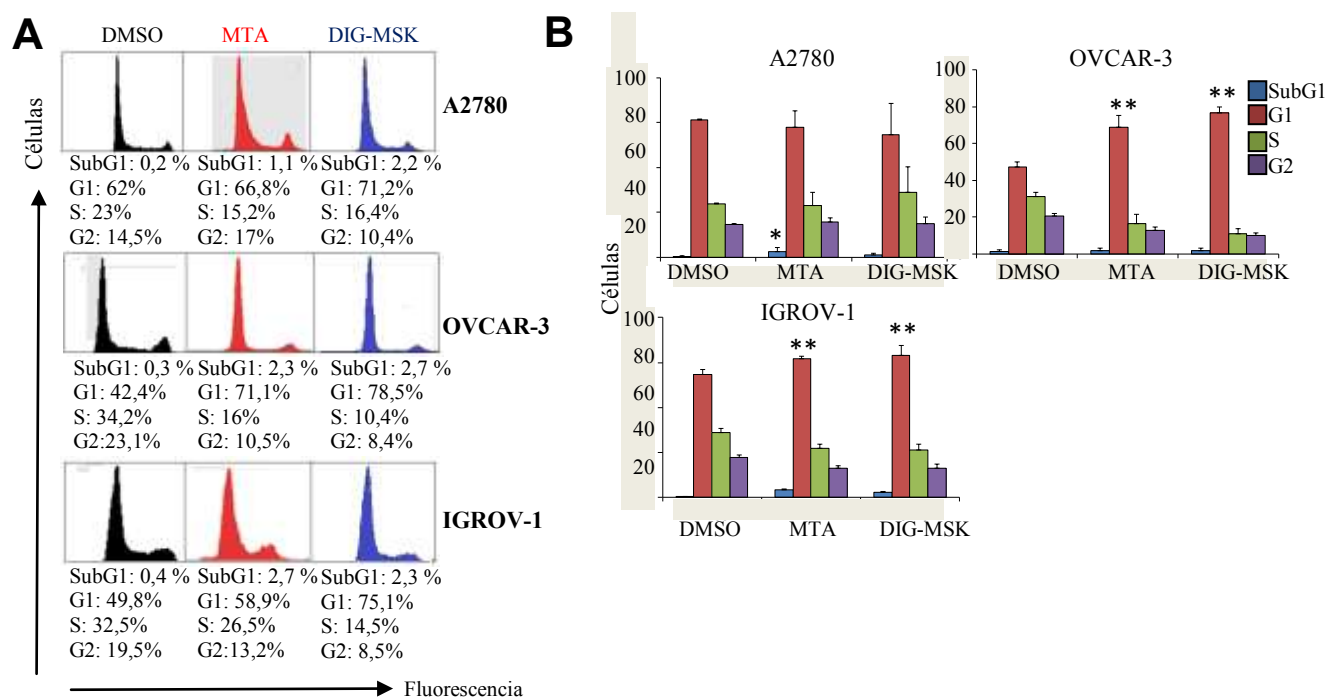
Tomando todos estos datos en conjunto, se puede concluir que DIG-MSK es muy eficaz en la inhibición de la supervivencia de células tumorales de ovario y que es capaz de inducir la muerte celular mediante apoptosis en estas células. Además este compuesto presenta muy baja toxicidad sobre PBMCs, sobre todo comparado con MTA, lo que lo convierte en un buen candidato para seguir los estudios clínicos.

### **MTA y DIG-MSK inhiben la progresión del ciclo celular en células tumorales de ovario**

Con los datos obtenidos sobre la inhibición de la supervivencia y aumento de apoptosis que ejercían las mitramicinas en las células tumorales de ovario, nos planteamos si ejercerían también un efecto sobre la progresión del ciclo celular. Trabajos previos habían demostrado que otros análogos de la MTA (Albertini V. y cols., 2006) y el tratamiento de DIG-MSK en líneas tumorales de colon (Vizcaíno C. y cols., 2012) inducen una parada del ciclo celular. El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento y división de la célula en dos células hijas. Consta de dos etapas, mitosis (fase de división) e interfase que se encuentra dividida en tres subfases, fase G1 en la cual ocurre la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, fase S en la cual se duplica el material genético y fase G2 en la cual ocurre la síntesis de ARN y proteínas. Para evaluarlo, se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo en células de ovario incubadas durante 48 horas una concentración 200 nM de MTA o de DIG-MSK, las cuales fueron lisadas para



obtener los núcleos celulares que se tiñeron con yoduro de propidio tal como se había descrito en trabajos anteriores (Albertini V. y cols., 2006).



**Figura 19. La MTA y el DIG-MSK inducen una parada en fase G1 del ciclo celular.** A. Imágenes representativas del porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular en las líneas celulares de ovario, obtenidas tras el tratamiento de 24 horas con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo. Las células fueron lisadas para obtener los núcleos celulares que se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron en el citómetro de flujo. B. Representación gráfica de la media y desviación estándar de tres experimentos independientes, en la cual se muestra los porcentajes de células de cada línea celular que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular con ausencia de tratamiento (DMSO) y con el tratamiento con MTA y DIG-MSK. Las diferencias estadísticas fueron analizadas mediante un test U-Mann Withney utilizando el programa SPSS.

Los resultados de tres experimentos independientes, muestran que tanto MTA como DIG-MSK provocaron una parada significativa del ciclo celular en fase G1 en las líneas OVCAR-3 e IGROV-1, aunque el porcentaje de células detenidas en fase G1 provocado por el tratamiento con DIG-MSK fue del 80% en OVCAR-3 y del 70% en IGROV-1, mientras que la MTA produjo una parada en G1 del 70% de las células en la línea OVCAR-3 y del 60% en la línea IGROV-1 (Fig. 19). Es importante destacar, que se produjeron incrementos del porcentaje de células en estadio SubG1, que aunque sólo fue significativo para MTA en A2780, evidencia que estos compuestos son citotóxicos para las células tumorales de ovario.

Estos resultados resultan interesantes, ya que estas mitramicinas no sólo afectan la supervivencia de las células tumorales produciendo su apoptosis, sino que además son capaces de producir la inhibición de su ciclo celular en las líneas de ovario. Todo ello puede

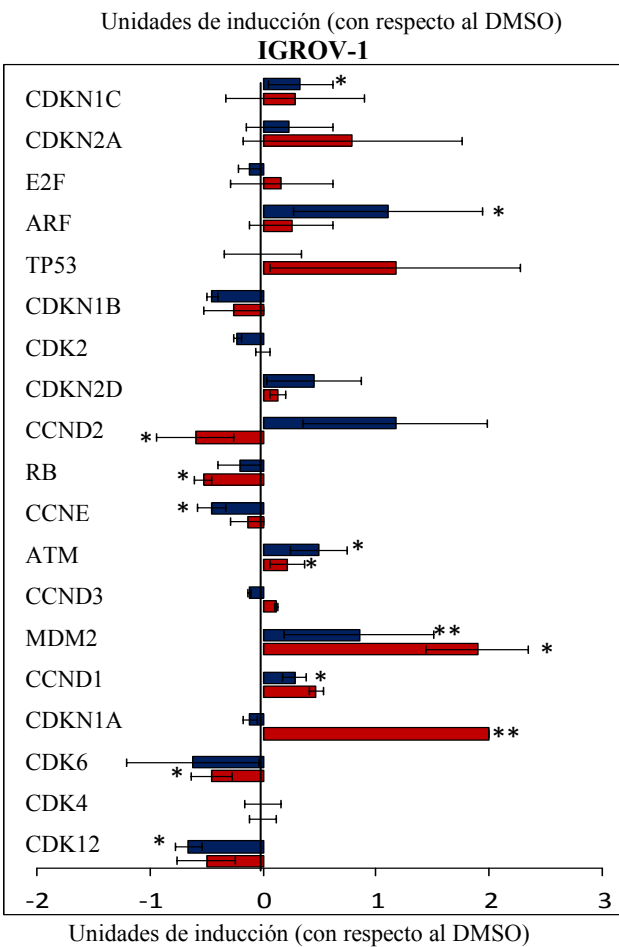
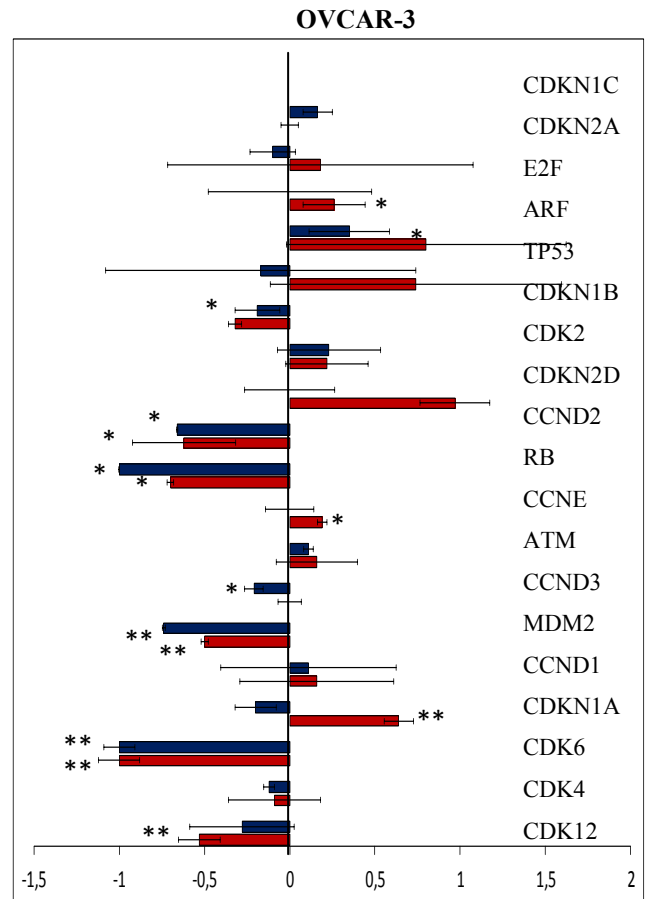
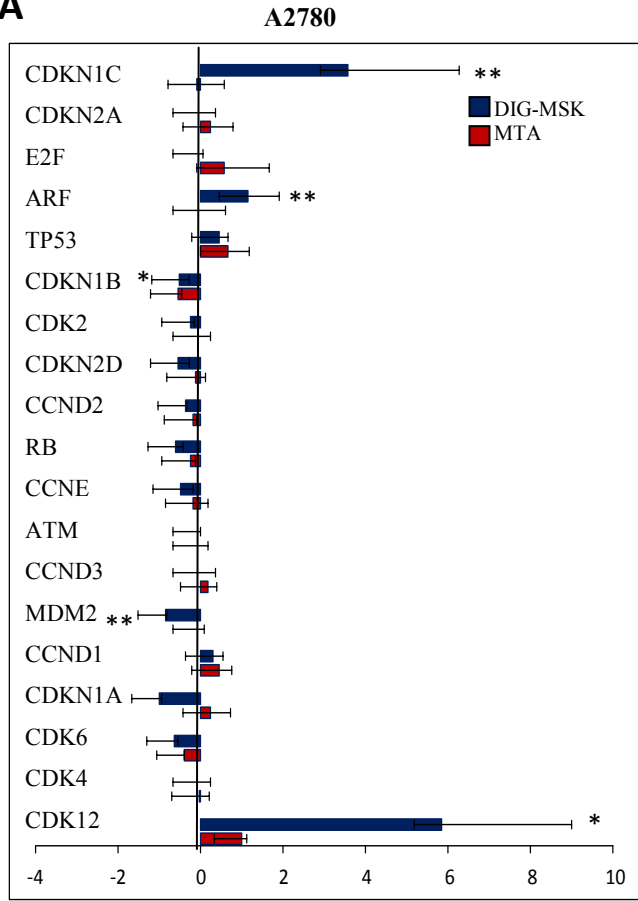
sugerir que su acción como antitumorales pueda ser muy eficaz, ya que afectan a varios procesos a la vez.

Tal como describimos en la introducción, el ciclo celular es un proceso altamente controlado, durante el cual existen diversos puntos de control en el paso de una fase a otra, en los cuales la célula comprueba que se cumplan las condiciones necesarias para el cambio de fase. De tal forma que si no se cumplen estas condiciones, el ciclo se detiene (Lodish y cols., 2005). Existen cuatro puntos de control principales: paso de estado quiescente a fase G1, transición de G1 a S para el inicio de la replicación, paso de fase G2 a M, donde se inicia la mitosis y el avance de metafase a anafase. Como se había comprobado que las mitramicinas son capaces de bloquear la transición de fase G1 a S, se decidió estudiar que moléculas eran las implicadas en esta detención del ciclo celular. Para ello se analizó mediante qPCR la expresión de las cinasas *CDK2*, *CDK4*, *CDK6* y *CDK12*, las ciclinas dependientes de cinasas, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3* y *CCNE*, los factores inhibidores *CDKN1A*, *CDKN1B*, *CDKN1C*, *CDKN2A*, *CDKN2D*, *ARF* y *TP53*, y los genes *MDM2* y *E2F* implicados en el punto de control de la fase G1, en células tumorales de ovario tratadas durante 8 horas con una dosis de 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo. Las regulaciones de los 17 genes estudiados se muestran en los gráficos de la figura 20A.

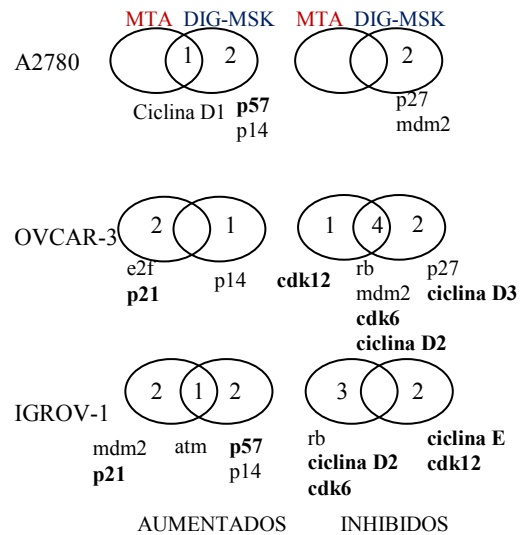
Con todos los datos obtenidos de tres experimentos independientes, se analizaron aquellos efectos que presentaron diferencias significativas con respecto a la expresión basal del control (células tratadas con DMSO) y se obtuvo que MTA y DIG-MSK modularon la expresión de genes diferentes según la línea celular (Fig. 20B).

En cuanto a los genes que se encontraron sobreexpresados, cabe destacar que DIG-MSK aumentó la expresión del inhibidor *CDKN1C* en las líneas A2780 e IGROV-1, y que MTA aumentó la expresión del inhibidor *CDKN1A*. En cuanto a las inhibiciones se obtuvo que DIG-MSK inhibió la expresión de *CCND3* en OVCAR-3 y de *CCNE* y de la cinasa *CDK12* en la línea IGROV-1. Por su parte, la MTA inhibió la expresión de *CDK12* en la línea OVCAR-3 y de *CDK6* y *CCND2* en IGROV-1. Ambos compuestos inhiben a la cinasa *CDK6* y a la *CCND2* en la línea OVCAR-3.

**A**



**B**



**Figura 20. Efecto regulatorio de las MTMs sobre los genes implicados en el punto de control G1 del ciclo celular en líneas tumorales de ovario. A.** Gráficos que muestran las unidades de inducción o de

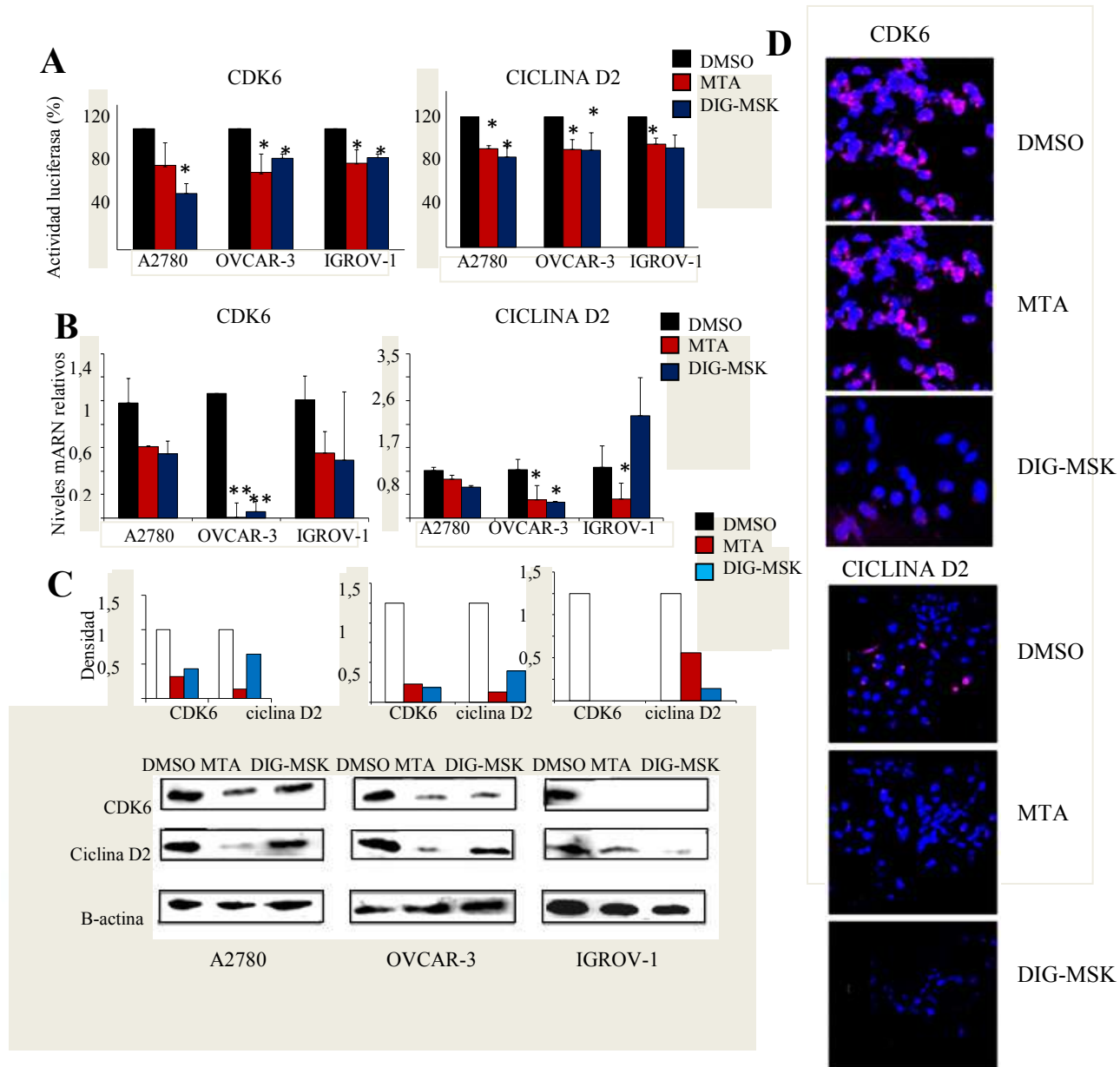
inhibición de la expresión de ARNm de los distintos genes que regulan la parada en fase G1, con respecto a los niveles normales de expresión sin tratamiento (DMSO), para las tres líneas de ovario estudiadas. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes y la desviación estándar obtenidos mediante qPCR del ADNc obtenido a partir del ARNm extraído de las células tratadas durante 8 horas con una dosis 200 nM de MTA y DIG-MSK. La expresión de los genes estudiados producida en las células sin tratamiento se consideró como 0, y los valores obtenidos de los tratamientos se representaron en relación a ese dato. **B.** Esquema de los resultados obtenidos expresados en A, pero tomando en cuenta sólo aquellas moléculas cuya expresión génica presenta diferencias significativas en la inducción o inhibición de la expresión, calculados con un test U Mann Withney.

La línea A2780 no experimentó una parada en fase G1 cuando se trató con MTA y DIG-MSK, esto se correlaciona en que fue la línea en la cual no se observaron muchas inhibiciones de la expresión de los genes estudiados. Por su parte, OVCAR-3 fue la línea en la cual se produjo una mayor parada del ciclo celular en fase G1, lo que se correlaciona con una significativa reducción de la expresión de la cinasa *CDK6* y de *CCND2*, con valores de inhibición superiores al 70% en ambas mitramicinas, mientras que en las otras líneas la inhibición ronda el 50%. En la línea IGROV-1, aunque la expresión de estos dos genes se encontró disminuida tanto en MTA como en DIG-MSK, sólo se obtuvieron diferencias significativas con la MTA. DIG-MSK por su parte en esta línea celular fue capaz de inhibir un 50% la expresión de *CCNE* y de *CDK12*.

Decidimos estudiar con más profundidad los efectos provocados sobre la expresión de *CDK6* y *CCND2*, ya que están reguladas tanto en OVCAR-3 como en IGROV-1 y además están implicadas directamente en la progresión del ciclo celular.

### **MTA y DIG-MSK inhiben la expresión de *CDK6* y *CCND2***

No sólo por encontrarse implicadas en el punto de control G1 del ciclo celular son de gran interés *CDK6* y *CICLINA D2*, sino también debido a que actúan como marcadores pronóstico en diferentes cánceres, como el cáncer esofágico (Ismail A. y cols., 2011). En concreto parece que *CDK6* y *Ciclina D2* son dos proteínas importantes en cáncer de ovario, participando en la vía AKT de este tipo tumoral (Chaudhuri D. y cols., 2007). Además no sólo se encuentran involucradas en este tipo tumoral sino que la expresión de *Ciclina D2* está desregulada en cáncer de pulmón (Ko E. y cols., 2012) y la de *CDK4/6* en displasia epitelial (Cabrera MC. y cols., 2012).



**Figura 21. MTA y DIG-MSK inhiben la expresión del mRNA y la proteína de CDK6 y Ciclina D2 en cáncer de ovario.** **A.** Los gráficos muestran la actividad luciferasa de transfecciones transitorias con los promotores de los genes CDK6 y Ciclina D2 unidos a un vector luciferasa. Se representa la media de tres experimentos independientes de transfección transitoria durante 4 horas en las células de ovario, tratadas posteriormente con una concentración 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo durante 24 horas. **B.** Representación gráfica de la inhibición que presentan la MTA y el DIG-MSK sobre la expresión de ARNm analizado por qPCR, en células de ovario tratadas durante 8 horas con una concentración 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo. Los datos muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. **C.** Análisis de la inhibición de la expresión a nivel de proteína de CDK6 y Ciclina D2 ocasionada por el tratamiento durante 24 horas con dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y usando DMSO como control negativo. Se muestra un ejemplo representativo de western-blot de cada línea con cada proteína y el análisis de densitometría realizado utilizando el programa Image J (NCBI). **D.** Imágenes de confocal, en las cuales se puede observar la disminución de la expresión a nivel de proteína ocasionada por el tratamiento con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo durante 24 horas. Se muestran fotografías obtenidas con la línea OVCAR-3. El color azul se corresponde con un marcaje de DAPI y el color rosa, es el marcaje con anticuerpos específicos para CDK6 o ciclina D2. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante un test U-Mann Withney usando el programa SPSS.

Los datos obtenidos mediante qPCR nos indicaban que en las líneas de ovario, tanto MTA como DIG-MSK provocan una regulación de la expresión tanto de *CDK6* como

de *CCND2*. Para confirmar estos datos, estudiamos como afectaban las mitramicinas a la actividad promotora de estos genes. Para ello, se realizó una transfección transitoria con un plásmido luciferasa que contenía el promotor de estos genes durante 4 horas en las líneas celulares de ovario. Posteriormente, las células transfectadas fueron tratadas con dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo durante 24 horas. Los resultados de tres experimentos independientes, mostraron que se produjo una inhibición significativa del 30% de la actividad luciferasa en ambos plásmidos y con ambas mitramicinas. (Fig. 21A).

Si analizamos con detenimiento los resultados totales obtenidos mediante qPCR y no solo los que conllevaron diferencias significativas, podemos observar cómo ambos compuestos produjeron la inhibición de estas moléculas en las tres líneas celulares (Fig. 21B). Aunque cómo se describió anteriormente, es en la línea OVCAR-3 donde se produjo una mayor inhibición de la expresión de estos genes, con una inhibición del 95% de la expresión de *CDK6* y del 70% en *CCND2*. Estos datos se correlacionan con los obtenidos por citometría de flujo, en los cuales OVCAR-3 es la línea que presenta mayor porcentaje de células paradas en fase G1.

Igualmente se analizó el efecto sobre la expresión de proteína de estas moléculas en las líneas de ovario tratadas con una dosis 200 nM de MTA y DIG-MSK durante 24 horas. *CDK6* y Ciclina D2 fueron marcadas con anticuerpos específicos y se revelaron con un sustrato comercial (Millipore). Las bandas obtenidas mediante tres western-blot independientes fueron analizadas usando el programa Image J. Se puede observar en un ejemplo representativo de cada línea celular (Fig. 21C), que las proteínas *CDK6* y CICLINA D2 se encontraron disminuidas en todas las líneas celulares y tanto con MTA como con DIG-MSK. Esta disminución también fue observada en la línea celular OVCAR-3 mediante microscopía confocal, para lo cual se marcaron *CDK6* y Ciclina D2 con anticuerpos específicos tras la incubación durante 24 horas con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo (Fig. 21D). Se obtuvo una clara inhibición de la expresión de *CDK6* y Ciclina D2 con ambas mitramicinas, en tres experimentos independientes. Aunque en este caso, parece ser que la inhibición de la expresión de *CDK6* observada con DIG-MSK fue mayor que la ejercida por la MTA.

Todos estos datos en conjunto indican que ambas mitramicinas producen una inhibición de la proliferación de las líneas tumorales de ovario, mediante la inducción de la

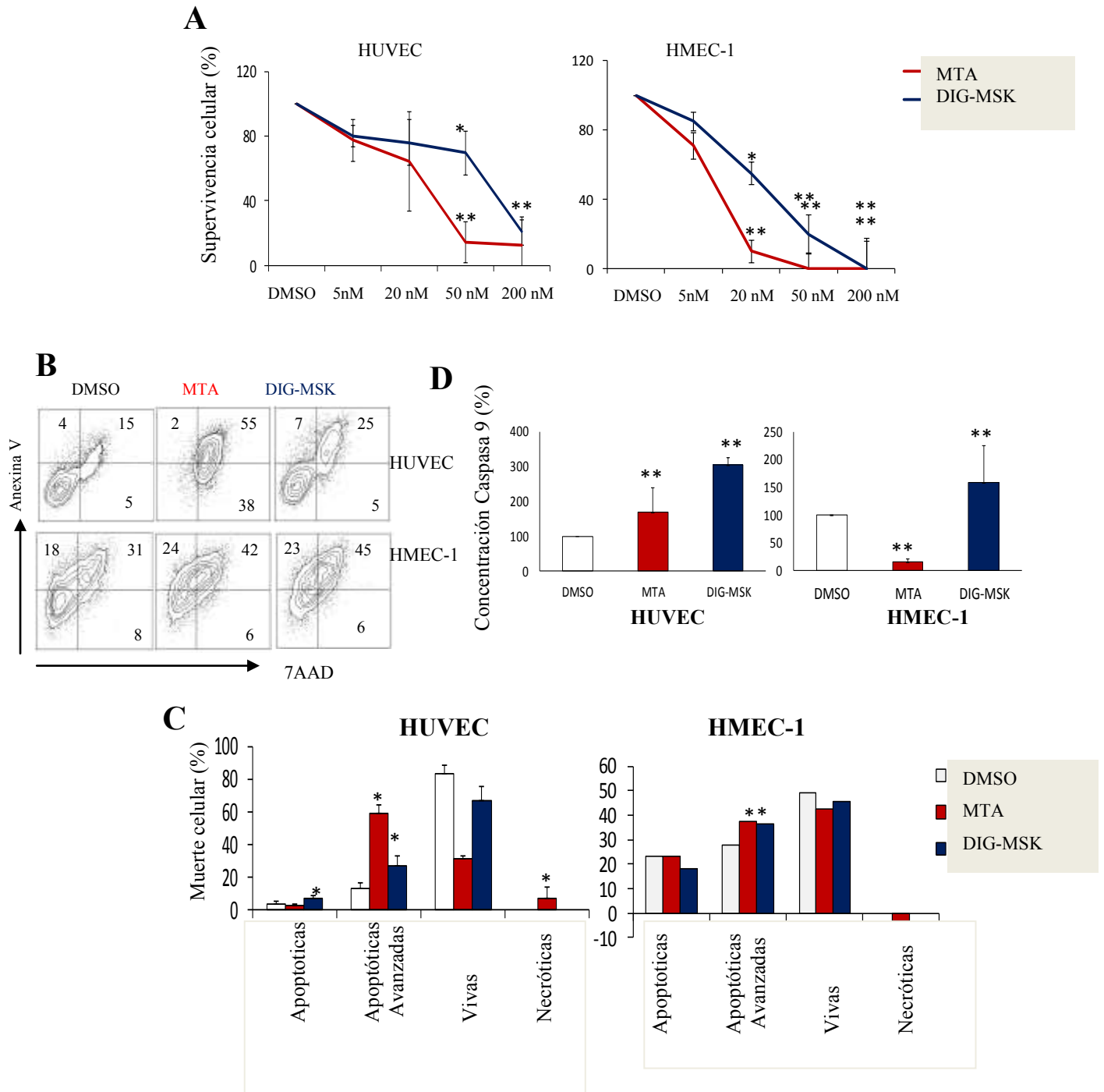
parada en fase G1. Aunque existen diversas proteínas involucradas en este proceso, pudimos comprobar que dos de ellas, CDK6 y Ciclina D2 se encuentran inhibidas a nivel de ARNm y de proteína por el tratamiento con dosis 200 nM de MTA y DIG-MSK.

### *ANGIOGÉNESIS*

#### **MTA y DIG-MSK inhiben la supervivencia y aumentan la apoptosis de las líneas endoteliales HUVEC y H-MEC-1**

En los resultados obtenidos mediante qPCR de la capacidad inhibitoria producida por DIG-MSK en la expresión diversos proto-oncogenes, se observa que no solo DIG-MSK regulaba genes involucrados en la evasión de la apoptosis y la proliferación, sino que también se encontraba disminuida la expresión de *VEGF-A*. Esta inhibición junto con la de *TP53* indican un posible papel anti-angiogénico. Ya que se ha propuesto que la inhibición de este oncogén desencadena la inhibición de dos factores pro-angiogénicos muy importantes: VEGF-A y TSP-1 (Kwack C. y cols., 2002). Este posible efecto anti-angiogénico sería de gran importancia debido a que, la angiogénesis es una capacidad esencial necesaria para la manifestación de un cáncer letal (Gatenby RA. y Gillies RJ., 2008). Decidimos, por tanto, evaluar la capacidad que poseía DIG-MSK comparado con MTA como inhibidor de la angiogénesis.

Para este estudio, se utilizaron dos líneas de células endoteliales, H-MEC-1 y HUVEC, ya que son el tipo celular sobre el que actúa la terapia antiangiogénica y son ampliamente utilizadas como modelo para estudiar la angiogénesis *in vitro*. Los efectos sobre la supervivencia obtenidos con el test SRB de tres experimentos independientes, tras la incubación durante 72 horas con dosis crecientes (0, 5, 10, 20, 50, 100, 200 nM) de MTA y DIG-MSK, indican que tanto la MTA como el DIG-MSK fueron más eficaces sobre la línea H-MEC-1, produciendo una inhibición del 100% de su supervivencia con dosis del orden 200 nM. En cuanto a la línea HUVEC la inhibición producida a una dosis 200 nM es del 80% para la MTA y del 75% para el DIG-MSK (Fig. 22A).



**Figura 22. MTA y DIG-MSK inhiben la supervivencia de las líneas endoteliales HUVEC y HMEC-1 y aumentan su apoptosis.** **A.** Gráficos que muestran el efecto que provocan MTA y DIG-MSK sobre la supervivencia de las líneas endoteliales que han sido tratadas durante 72 horas con concentraciones crecientes de mitramicinas, y analizadas mediante el test SRB. Se muestra la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. **B.** Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo en los que se muestra un ejemplo representativo de la mortalidad inducida por las MTA y DIG-MSK en las líneas endoteliales cuando son tratadas con una dosis 200 nM de compuesto durante 48 horas, utilizando DMSO como control negativo. Se utiliza Anexina V para medir la apoptosis y 7AAD para medir la necrosis. **C.** Gráficos representativos de la media de mortalidad específica de tres experimentos independientes, calculada utilizando la fórmula:  $(\text{porcentaje de células muertas} - \text{porcentaje de células muertas en el control negativo}) / (100 - \text{porcentaje de células muertas en control negativo}) * 100$ . **D.** Gráficos representativos de la concentración de caspasa 9 medida con un kit fluorimétrico tras la incubación de las células con dosis 200 nM de MTA, DIG-MSK o DMSO como control negativo durante 72 horas. Se muestra la media y desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante un test estadística U Mann Withney con el programa SPSS.



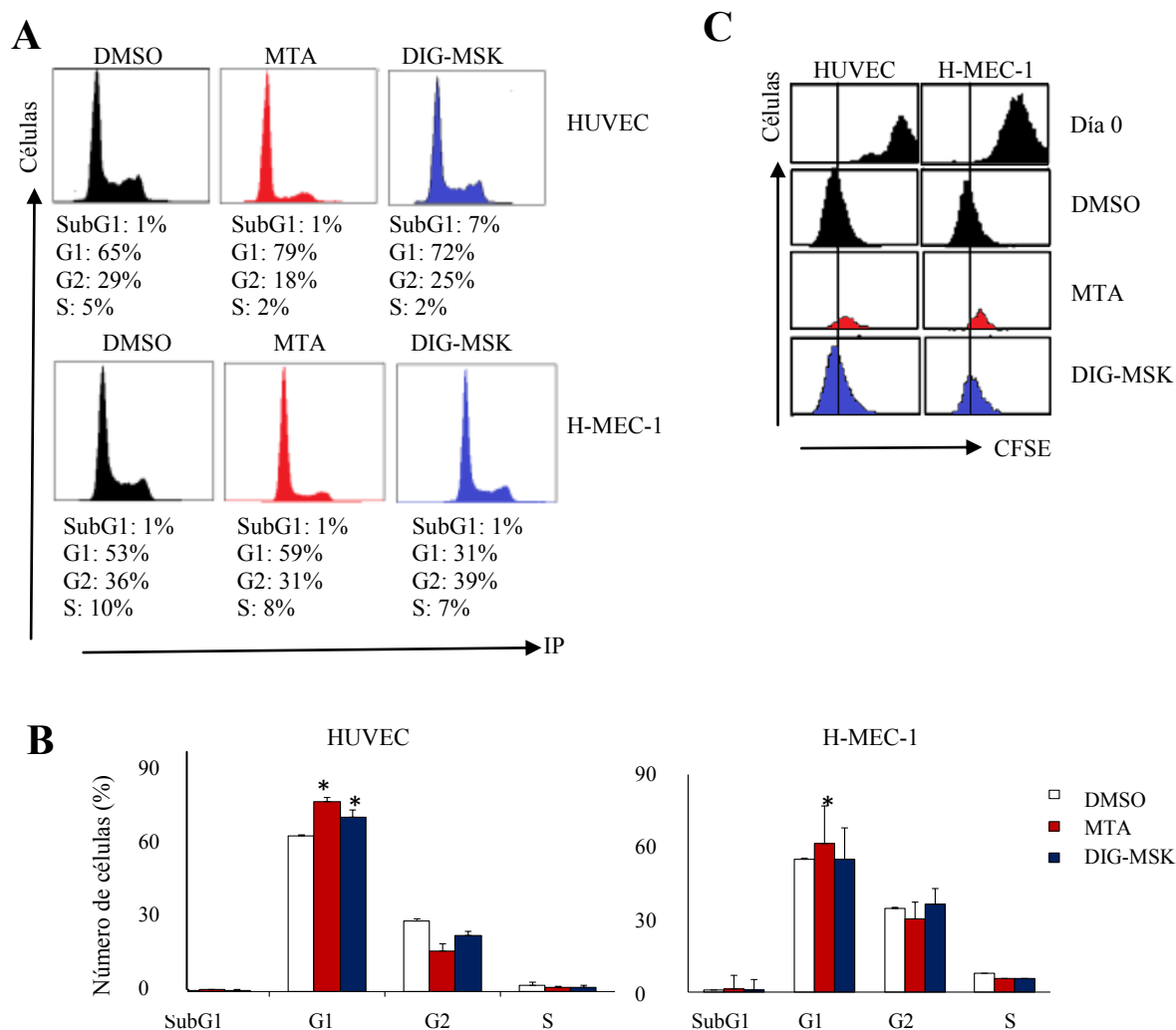
De nuevo se analizó si la disminución de la supervivencia era debida a citotoxicidad e inducción de la apoptosis (Fig. 22B) en tres experimentos independientes. Los análisis de las líneas endoteliales cultivadas durante 48 horas con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo, y posteriormente marcados con Anexina V y 7AAD mostraron que en la línea HUVEC, la MTA produjo un aumento significativo de la muerte celular mediante apoptosis y necrosis, mientras que DIG-MSK produjo un aumento significativo de la apoptosis. El índice de muerte celular específica con respecto a las células sin tratamiento fue de un 70% para la MTA y del 20% para DIG-MSK. En la línea H-MEC-1 ambas produjeron aumentos significativos de la muerte celular, aunque cabe destacar que existían mayor porcentaje de células en estado de necrosis que de apoptosis (Fig. 22C). En esta línea celular el índice de muerte celular específica inducida por ambos compuestos fue de alrededor del 20%.

Con respecto a la inducción de la producción de la caspasa 9 medida en células de ovario tratadas con dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo y analizadas con un kit fluorimétrico, DIG-MSK provocó un aumento de la concentración de 3 veces y la MTA de 2 veces con respecto a células sin tratar, en la línea HUVEC. De nuevo el efecto difirió entre líneas, en la línea H-MEC-1 se indujo la concentración de caspasa 9 un 50% con DIG-MSK, pero no con MTA (Fig. 22D).

En conjunto todos estos datos indican que MTA y DIG-MSK inhiben la supervivencia de las líneas endoteliales y provocan la muerte celular de las mismas, no solo mediante apoptosis, sino también mediante necrosis.

### **MTA y DIG-MSK inhiben la proliferación celular y detienen el ciclo celular en las líneas endoteliales**

Se analizó el efecto sobre la progresión del ciclo celular en células tratadas durante 24 horas con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo (Fig. 23A), que fueron lisadas para la obtención de sus núcleos, los cuales fueron teñidos con yoduro de propidio y se analizaron con un citómetro de flujo, en tres experimentos independientes.



**Figura 23. MTA y DIG-MSK inducen parada en fase G1 en las células endoteliales e inhiben su proliferación.** A. Gráficos obtenidos mediante citometría de flujo en los que se puede observar en un ejemplo representativo de ciclo celular de cada línea, como MTA indujo la parada en fase G1 en las líneas endoteliales, mientras que DIG-MSK sólo en HUVEC. Para ello las células fueron cultivadas durante 24 horas con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK, usando DMSO como control negativo, y posteriormente se lisaron para obtener los núcleos que fueron teñidos con yoduro de propidio y analizados por citometría de flujo. B. Gráfico que representa la media y desviación estándar de tres experimentos independientes del porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular inducido con las mitramicinas. C. Imágenes obtenidas mediante citometría de flujo utilizando una tinción con el colorante fluorimétrico CFSE en células tratadas con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK, usando DMSO como control negativo y cultivadas durante 72 horas. Las imágenes muestran un ejemplo representativo de cada línea. Las diferencias estadísticas fueron analizadas utilizando el programa SPSS mediante un test U Mann Withney.

De nuevo se observó que estas mitramicinas inducían la parada en fase G1, aunque con diferencias entre las líneas. En la línea endotelial H-MEC-1 sólo se produjo una parada de un 59% de las células con el tratamiento con la MTA, mientras que en la línea HUVEC tanto la MTA como DIG-MSK indujeron una parada en fase G1 del 79 % y del 72 % de células respectivamente (Fig. 23B).

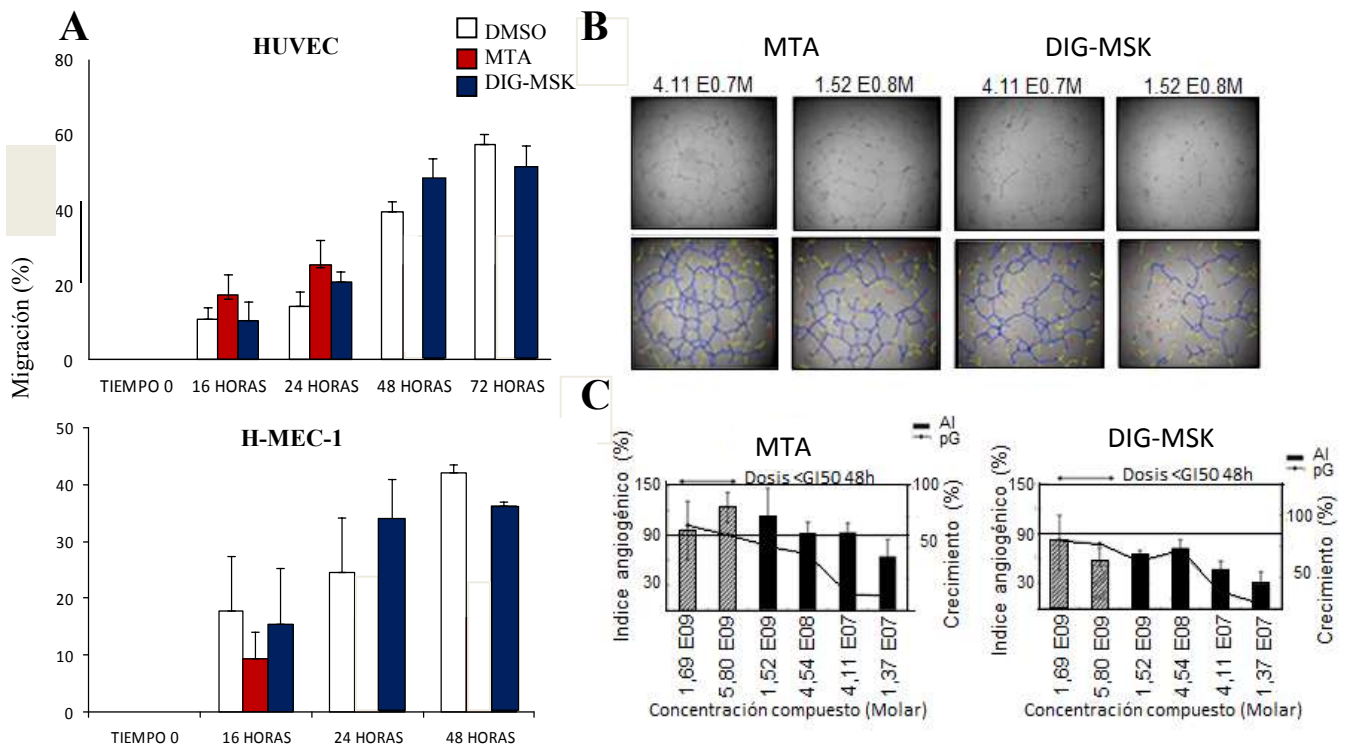
Además evaluamos mediante la tinción con el colorante fluorescente CFSE y medición de la fluorescencia mediante citometría de flujo, en células de ovario tratadas

durante 72 horas con una dosis 200 nM de MTA o DIG-MSK y DMSO como control negativo, el efecto directo sobre la proliferación de las líneas endoteliales que poseen la MTA y el DIG-MSK (Fig. 23C), en tres experimentos independientes. Tras la incubación durante 72 horas con estos compuestos, DIG-MSK produjo una ligera inhibición de la proliferación en la línea HUVEC. Sin embargo, la MTA ejerce su efecto inhibitorio de la proliferación en ambas líneas, aunque gran parte de este efecto inhibitorio se debe también a efectos citotóxicos.

Analizando en conjunto todos estos datos, indican que estas mitramicinas son capaces de inhibir la supervivencia de las líneas endoteliales, mediante la inducción de la muerte celular y, de producir una inhibición de la proliferación y del ciclo celular. El efecto de DIG-MSK parece ser menos eficaz que el de la MTA, lo que está en consonancia con una menor toxicidad de este compuesto.

### **Efecto de la MTA y DIG-MSK sobre la migración de células endoteliales y la formación de vasos sanguíneos**

Como se ha explicado en introducción, durante la formación de un vaso sanguíneo existen diferentes etapas, entre las que se encuentran la migración y la proliferación de las células endoteliales y la formación y estabilización de vasos sanguíneos. Hasta ahora, hemos visto que las mitramicinas afectan la proliferación de las células endoteliales. También se decidió estudiar si poseían algún efecto en la migración de las mismas. Para ello se realizaron seis experimentos independientes de test de migración mediante el método de herida en placa, cultivando posteriormente las células con una concentración 200 nM de las mitramicinas y usando DMSO como control negativo. Tras 72 horas de incubación en las células HUVEC sin ningún tratamiento se produjo una migración completa que ocasionó el cierre de la herida provocada. Las células tratadas con DIG-MSK produjeron una migración de un 90 % en comparación con las células control, mientras que las células tratadas con MTA no se pudieron evaluar, ya que el compuesto provocó una alta citotoxicidad y las células murieron a las 48 horas. El efecto en la línea H-MEC-1 fue de una migración del 100% en las células sin tratamiento a las 48 horas, mientras que las tratadas con DIG-MSK produjeron una migración de en torno al 90%. De nuevo fue imposible valorar los efectos producidos por MTA debido a su toxicidad (Fig. 24A).



**Figura 24. El DIG-MSK inhibe la formación de estructuras similares a vasos sanguíneos, pero no la migración de las células endoteliales.** **A.** Gráficos representado el porcentaje de migración que se observa con el ensayo de herida en placa, en ausencia de tratamiento (DMSO) y con un tratamiento con una dosis 200 nM de MTA y DIG-MSK en células endoteliales durante 72 horas. Los resultados representan la media de cuatro experimentos independientes. **B** Imágenes obtenidas del ensayo de formación de estructuras similares a vasos sanguíneos sobre matrigel con la línea celular H-MEC-1, utilizando dosis crecientes de MTA y DIG-MSK. **C** Representación gráfica del porcentaje de índice angiogénico obtenido con el software Angiodraw, que existe en las diferentes concentraciones de MTA y DIG-MSK en relación con la inhibición del crecimiento que producen las mismas dosis. Las diferencias estadísticas fueron calculadas utilizando un test estadístico U Mann Withney con el programa SPSS.

Podemos concluir por tanto, que DIG-MSK no provoca efecto sobre la migración de las células endoteliales y que el efecto provocado por la MTA se debe a la toxicidad.

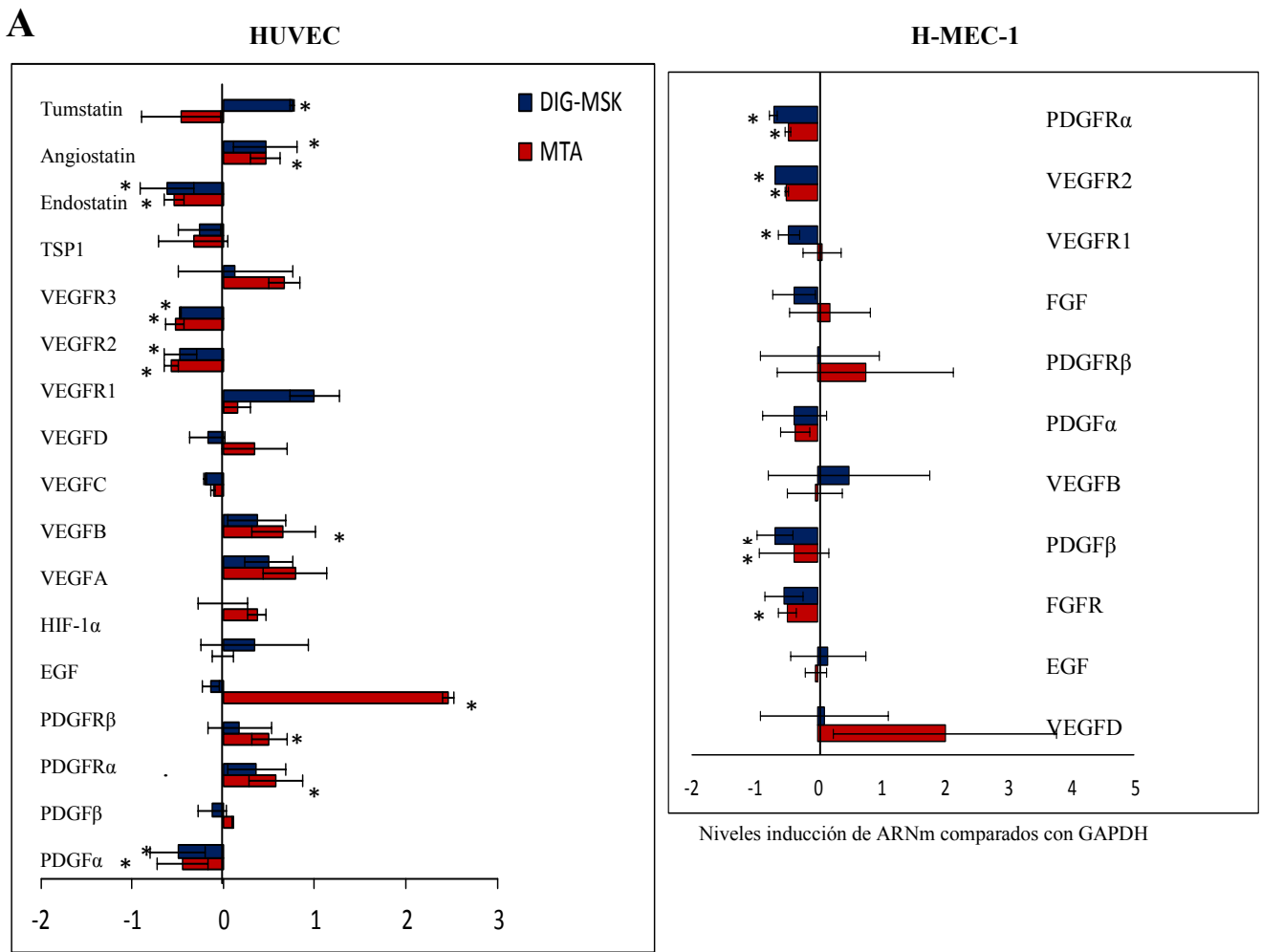
También se analizó el efecto de estas mitramicinas sobre la formación de vasos sanguíneos. Para ello, se utilizó el ensayo de formación de estructuras similares a vasos sanguíneos sobre matrigel, obteniendo la reducción que provocan estas mitramicinas sobre el índice angiogénico obtenido con el software Angiodraw a diferentes concentraciones de MTA y DIG-MSK en la línea H-MEC-1 (Fig. 24B). Los resultados muestran que la MTA fue capaz de producir una pequeña reducción de este índice a las dosis más concentradas, dosis que provocan toxicidad en esta línea celular. Por lo que este efecto pudo ser debido más bien a la citotoxicidad que a una inhibición de la formación de vasos sanguíneos. Sin embargo, DIG-MSK provocó una reducción significativa importante del índice angiogénico a dosis que no resultaron citotóxicas (Fig. 24C).

Podemos concluir por tanto, que aunque el efecto de DIG-MSK no fue muy diferente del provocado por MTA en la inhibición de la proliferación de las células endoteliales, este compuesto provoca una disminución de la formación de estructuras similares a capilares sanguíneos, inhibiendo la angiogénesis de forma muy eficaz en este punto.

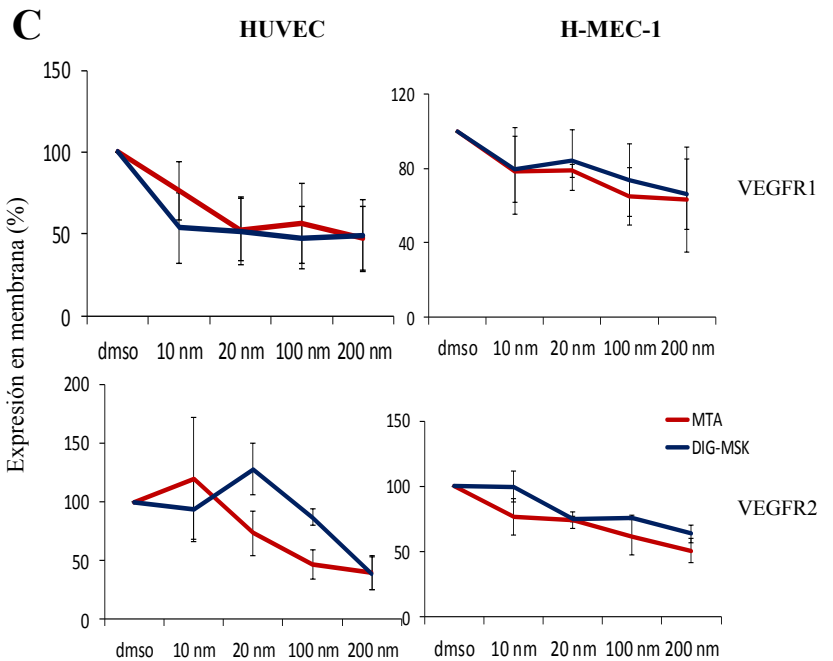
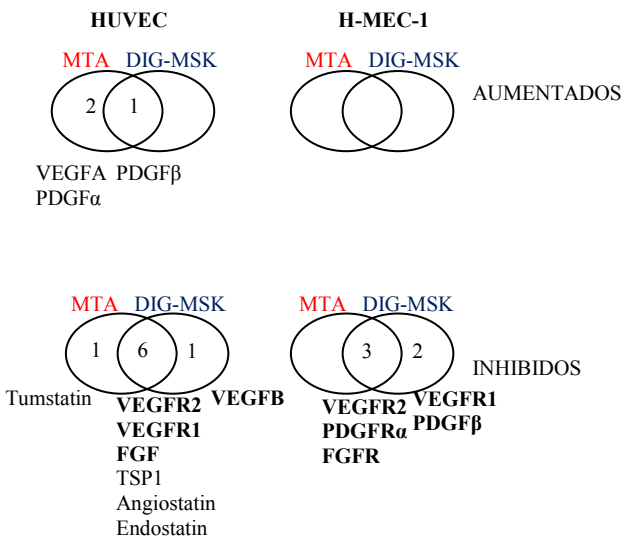
### **MTA y DIG-MSK regulan la expresión de genes pro- y anti-angiogénicos**

El proceso de angiogénesis está muy controlado, por lo que se denomina la balanza angiogénica que es la compensación que ocurre en condiciones normales entre los factores proangiogénicos y los factores antiangiogénicos (Bergers y Benjamin, 2003). Por tanto, si DIG-MSK es capaz de inhibir la angiogénesis, mediante la inhibición de la formación de vasos sanguíneos, debe de ser capaz o bien de activar a algún inhibidor o de inhibir algún factor pro-angiogénico.

Para tratar de determinarlo, se estudió el efecto de MTA y DIG-MSK sobre células endoteliales tratadas con una dosis 200 nM de compuesto durante 8 horas. Posteriormente se extrajo ARNm y se obtuvo ADNc. Se analizó la expresión de los genes pro-angiogénicos: *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*, *FLT1*, *KDR*, *FLT4*, *HINF-1 $\alpha$* , *EGF*, *PDGFR $\alpha$* , *PDGFR $\beta$* , *PDGF $\alpha$* , *PDGF $\beta$* , *FGFR*, *FGF* y los factores antiangiogénicos: *TUMSTATINA*, *ENDOSTATINA* y *ANGIOSTATINA* mediante qPCR. Tras la realización de tres experimentos independientes, se puede concluir que tanto MTA como DIG-MSK produjeron una regulación en la expresión de diversos de estos genes (Fig. 25A). Si nos centramos de nuevo, en aquellos que presentaron diferencias significativas de expresión con el tratamiento con las mitramicinas respecto a las células sin tratamiento, obtenemos que existen diferencias en cuanto a la línea celular (Fig. 25B). En la línea endotelial H-MEC-1, se produjo una inhibición de la expresión de los receptores *FGFR* y *VEGFR2* provocada por ambas mitramicinas, y DIG-MSK además, inhibió la expresión de *PDGF $\beta$*  y *VEGFR1*. En la línea HUVEC, ambas mitramicinas inhibieron la expresión de *FGF*, *FLT1* y *KDR*, mientras que DIG-MSK también inhibió a *VEGFB*. Las proteínas producidas por estos genes intervienen en los diversos procesos de angiogénesis, siendo VEGFR1 y VEGFR2 dos receptores muy importantes, que entre otras funciones median la formación y estabilización de vasos sanguíneos. Este es el punto principal regulado por ambas mitramicinas, aunque DIG-MSK fue capaz de realizarlo a dosis no tóxicas.



**B** Niveles inducción de ARNm comparados con GAPDH



**Figura 25. MTM y DIG-MSK modulan la expresión de diversos factores pro- y anti-angiogénicos en las células endoteliales HUVEC y H-MEC-1.** **A.** Representación gráfica de las unidades de inducción que presenta la expresión del mRNA mediante qPCR de diversos genes involucrados en angiogénesis con respecto a sus niveles de expresión basales (células tratadas con DMSO), en células tratadas con una dosis 200 nM de MTA y DIG-MSK durante 8 horas. Se representa la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. **B.** Esquema de los genes en los que se obtuvo o bien una inhibición o bien un aumento de su expresión significativos con un test estadístico U-Mann Withney con los tratamientos con las MTMs. **C.** Los

gráficos muestran la disminución de la expresión en membrana de las proteínas de VEGFR1 y VEGFR2 en las líneas de células endoteliales con concentraciones crecientes de MTA y DIG-MSK, tras un período de incubación de 24 horas. Se representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

A continuación se estudiaron los efectos que ejercían MTA y DIG-MSK sobre la expresión a nivel de membrana de estos dos receptores, que son claves en la angiogénesis (Fig. 25C). Para ello se incubaron las líneas endoteliales con concentraciones crecientes de las mitramicinas (0, 10, 20, 100 y 200 nM) durante 24 horas y se analizó el efecto sobre la expresión en membrana de estos receptores, marcando las células con anticuerpos específicos y analizándolas mediante citometría de flujo. Los resultados de tres experimentos independientes, mostraron que la expresión en membrana de VEGFR1 y VEGFR2 se ve reducida por el tratamiento con las mitramicinas de forma similar. En la línea HUVEC se observa que a concentraciones del orden 200 nM, se produjo con ambos compuestos una inhibición del 60% de la expresión de VEGFR1 y del 50% en VEGFR2. En la línea H-MEC-1 las inhibiciones fueron del 40% para VEGFR1 y del 20% para VEGFR2. Además en la línea HUVEC se pudo observar como DIG-MSK provocaba mayor inhibición del receptor VEGFR1 que MTA a dosis más bajas.

Podemos concluir que tanto MTA como DIG-MSK regulan diversos factores pro-angiogénicos, encontrándose entre ellos los receptores VEGFR1 y VEGFR2 que son muy importantes para la formación y estabilización de capilares sanguíneos. Hemos visto que este proceso es inhibido de forma eficaz por DIG-MSK, a dosis no tóxicas a diferencia de la MTA.

## **DISCUSIÓN**



El cáncer de ovario se agrupa dentro de los cánceres ginecológicos y es producido en un 85-90% de los casos por un carcinoma epitelial, siendo este tipo de cáncer la segunda neoplasia del aparato genital femenino en frecuencia, tras el cáncer de endometrio según datos presentados por la SEOM. Se ha estimado que en Europa, el cáncer de ovario es el que presenta la peor supervivencia de entre todos los cánceres ginecológicos y que provoca unos 65000 casos nuevos y unas 42000 muertes al año (Ferlay J 2010). El tratamiento actual del cáncer de ovario se basa en su extirpación y la combinación de quimioterapia y radioterapia. Pero las probabilidades de éxito de este tratamiento están asociadas a la detección temprana del tumor, ya que en estadios avanzados la terapia antitumoral no ha resultado de gran eficacia. Todo ello conlleva, que sea de vital importancia tanto el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, como la creación de nuevos fármacos antitumorales más eficaces para este tipo de cáncer.

Este último punto es quizás el más importante, ya que debido a las características fisiológicas de este tipo tumoral, en torno al 70-80% de los pacientes se diagnostican en una etapa avanzada de la enfermedad (información obtenida de la SEOM). En la actualidad se están realizando ensayos que evalúan posibles combinaciones de quimioterápicos con cisplatino, el cual se ha demostrado que es muy eficaz en el tratamiento del cáncer de ovario, pero tras un periodo de control del tumor, suele generar resistencia y vuelve a crecer (Meng F. y cols., 2013). Dentro de estas combinaciones se ha visto que el tratamiento con antiangiogénicos como bevacizumab produce un gran beneficio en ensayos clínicos en fase III, siendo el efecto mayor en pacientes que se encuentran en un estadio avanzado (González Martín A. y cols., 2013). Sin embargo, otra serie de estudios en cáncer de ovario han visto que esta terapia al cabo de un tiempo falla debido principalmente a la generación de resistencia al bevacizumab (Van der bilt AR. y cols., 2012). Parece ser que, por tanto, la combinación de un tratamiento citostático, que impida el crecimiento del tumor junto con un tratamiento antiangiogénico que evite la diseminación del mismo, podría ser una buena medida para el tratamiento de este tipo de cáncer. No obstante, debido a los problemas de resistencias generadas con las combinaciones actuales, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos o bien, encontrar la combinación adecuada que consiga una respuesta adecuada, evitando la generación de resistencia al tratamiento.

Dentro de los antitumorales citostáticos, uno de los grupos más eficaces son los policétidos, una familia de diversos productos naturales que incluyen compuestos

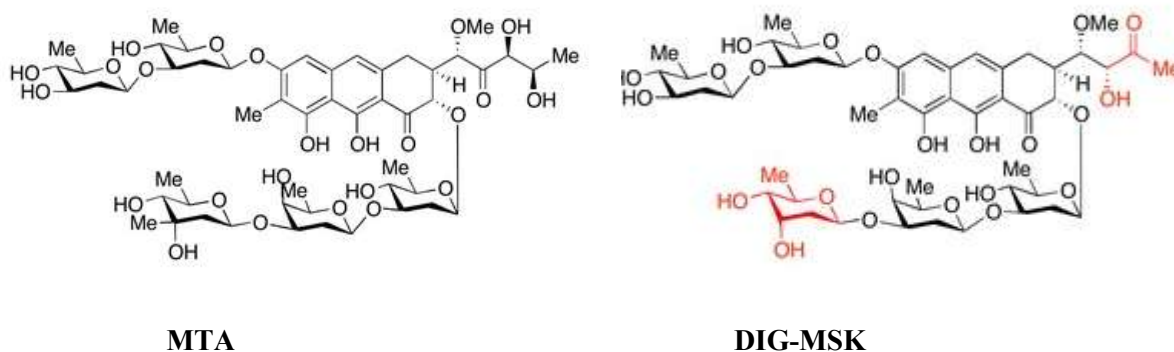
farmacéuticos con una potente actividad anticancerígena, antibacteriana y antifúngica (Kosla C. y Kecsling JD., 2003). Dentro de estos policéticos, se engloba la MTA que posee importantes propiedades farmacológicas, la cual ha sido usada en el tratamiento de diversos tipos de cánceres entre los que se encuentra el tratamiento de la hipercalcemia causada por la metástasis ósea, la enfermedad de Paget, el carcinoma testicular y la leucemia (Hall TJ y cols., 1993) (Remsing LL y cols., 2003). A pesar de sus potentes propiedades antitumorales en la actualidad su uso se encuentra limitado, debido a la toxicidad que presenta en tejidos sanos. Con el fin de conseguir una molécula que mantenga los importantes efectos antitumorales de la MTA pero que tenga una menor toxicidad, y gracias a la caracterización de su ruta de síntesis, ha sido posible aplicar métodos de ingeniería metabólica para producir nuevos análogos de este compuesto (Blanco G. y cols., 2000). En concreto, la empresa Entrechem ha producido diversos derivados de la MTA, con la esperanza de que las modificaciones estructurales aplicadas a la molécula permitan mejorar su mecanismo de acción y reducir su citotoxicidad.

Dos de estos análogos han resultado especialmente relevantes, el compuesto MSK que se ha testado *in vitro* contra diversas líneas tumorales humanas y ha obtenido muy buena respuesta (Albertini V. y cols., 2006) y el compuesto DIG-MSK, el cual posee un perfil farmacológico mejorado (Mansilla S. y cols., 2010), y en estudios preliminares en animales ha demostrado presentar una baja toxicidad (Nuñez LE. y cols., 2012). Decidimos por ello, evaluar tanto el mecanismo de acción como las propiedades antitumorales del compuesto DIG-MSK, para considerar si se trata de un buen candidato para futuros ensayos clínicos.

### **Mecanismo de acción**

El compuesto DIG-MSK presenta modificaciones con respecto a la MTA, tanto de la cadena lateral del carbono 3, como cambios en el azúcar E del motivo trisacárido, lo que podría conferir propiedades únicas a este compuesto. No obstante, parece que dichas modificaciones no alteran la captación de este compuesto. De hecho nuestros resultados nos indican que este análogo, al igual que el resto, se capta de forma muy rápida, en apenas 2 horas. Sin embargo, su unión al ADN presenta distinta especificidad y es más débil que la de la MTA. Estas diferencias pueden ser debidas a las modificaciones de la cadena lateral del carbono 3, que es el sitio de unión al ADN, el cual está altamente conservado en todos los ácidos aureólicos. Sin embargo el compuesto MSK que también comparte estas

modificaciones, no presenta un patrón diferente de unión al ADN (Albertini y cols., 2006). Podría ser, por tanto, que no sólo estuviesen afectando las modificaciones en la cadena lateral al sitio de unión, sino que los cambios en el azúcar, podrían conllevar una modificación de la estructura general de la molécula y acentuar las modificaciones en el sitio de unión.

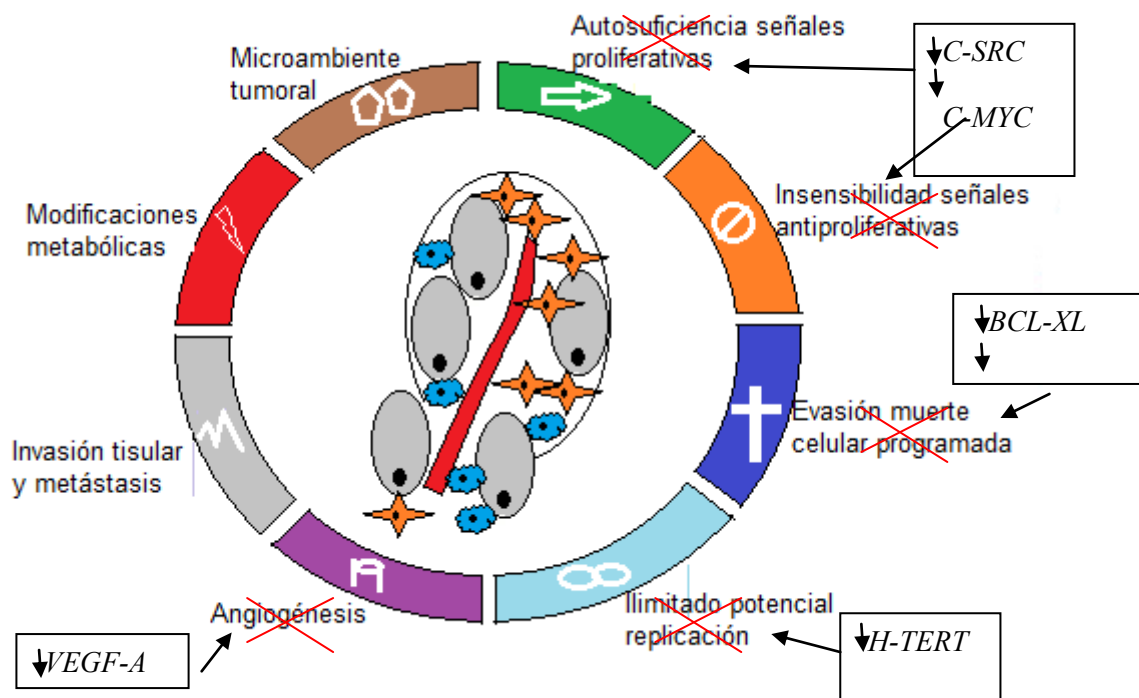


**Figura 26. Estructura del compuesto DIG-MSK con respecto a la MTA.** DIG-MSK difiere de la MTA en la cadena lateral del carbono 3, y tiene cambios en el azúcar E del motivo trisacarídico.

Dichas modificaciones, no obstante, parece que no afectan a la capacidad inhibitoria tanto de la expresión de Sp1 como de la actividad transcripcional mediada por Sp1, que comparte con la MTA. La inhibición de Sp1 no es un mecanismo exclusivo de la MTA y los ácidos aureólicos, sino que se ha visto que las antraciclina, las cuales está aceptado que poseen un mecanismo pleiotrópico, son capaces de unirse al ADN en sitios ricos en regiones GC, inhibiendo a este factor de transcripción (Mansilla S y Portugal J, 2007). Sp1 fue descrito inicialmente como factor ubicuo responsable de reclutar factores de transcripción que se unían a la caja TATA y de fijar el inicio de transcripción en promotores que carecen de caja TATA (Suske G. y cols., 1999) y por ello no se creía beneficioso que un compuesto antitumoral lo inhibiese. Sin embargo, en la literatura reciente se describe que aunque Sp1 sea un factor ubicuo, también regula genes específicos de tejidos y genes implicados en la diferenciación celular, la progresión o parada del ciclo celular y la oncogénesis, activando protooncogenes e inhibiendo genes supresores de tumores (Li li y cols., 2004). Parece, por tanto, que Sp1 es un factor de transcripción que puede jugar un papel clave en la activación de muchos de los procesos que involucran el desarrollo tumoral. También se ha observado que la expresión de Sp1 se encuentra aumentada en muchas células cancerígenas con respecto a las células normales, e incluso los niveles muy elevados de Sp1 en algunos tipos tumorales se asocian a un peor

pronóstico (Wang y cols., 2003). En concreto, Sp1 está incrementado en algunos tipos de tumores epiteliales y en el cáncer de páncreas, donde desempeña un papel clave en la agresividad y capacidad metastásica del tumor (Kumar Ap y cols., 1999) (Yuang P y cols., 2007). Parece que, en realidad la inhibición de Sp1 podría ser un mecanismo importante para la eliminación de tumores. De hecho, existen diversos protooncogenes regulados por Sp1, los cuales están involucrados en procesos tan importantes como el control del crecimiento y la proliferación celular, la reparación del daño cromosómico, la apoptosis y la angiogénesis. Nuestros resultados indican que DIG-MSK, es capaz de inhibir la expresión tanto basal como inducida de Sp1, el cual es un potente regulador de la expresión de estos genes. Entre ellos se encuentran el gen *BRCA2*, que junto con *BRCA1* se encuentran mutados en cáncer de ovario y son uno de los principales marcadores de este tipo tumoral. Se ha visto que en concreto dichos genes se encuentran mutados en aproximadamente el 40% de los cánceres familiares de ovario (Mohamed FZ. y cols., 2013). Aunque la función originaria de estas proteínas es la reparación del daño cromosómico, se ha demostrado que estos genes poseen una alta probabilidad de sufrir mutaciones, en concreto inserciones o deleciones, que conllevan la alteración de la proteína y su pérdida de funcionalidad. Esta pérdida de funcionalidad favorece que los cambios genéticos experimentados en las células tumorales se fijen, y por ello un aumento de la expresión de esta proteína mutada se ha correlacionado con el cáncer de mama y de ovario (Liede A. y cols., 2002). Cabe destacar el papel inhibitorio de DIG-MSK sobre la expresión del gen *BRCA2*, lo que parece indicar que podría ser muy eficaz en la prevención de estos tipos tumorales. DIG-MSK es también capaz de inhibir a *C-SRC*, oncogén que se ha visto implicado en el control del crecimiento y la proliferación en células de colon (Cruzalegui F. y cols., 2010) y a *C-MYC*, que es un regulador de diversos procesos biológicos importantes, como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Es importante la inhibición sobre el oncogén *C-MYC*, ya que se encuentra sobreexpresado en algunos pacientes afectos de cáncer de pulmón, mama, estómago, colon, neuroblastomas, glioblastoma y linfoma de Burkitt entre otros, lo que lo convierte en una buena diana para las terapias antitumorales (Soucek L. y cols., 2008). Se ha demostrado que la proteína c-myc regula el ciclo celular y la viabilidad celular mediante la inhibición de factor p21 (Luo H y cols., 2010). Nuestros resultados nos indican que aunque DIG-MSK es capaz de inhibir la expresión de *C-MYC* en líneas tumorales de ovario, no produce ningún efecto en la expresión de *CDKN1A*, aunque hemos visto que este compuesto es capaz de provocar una parada del ciclo celular de las células tumorales de ovario por la regulación de otra

serie de proteínas implicadas en el paso de la fase G1 a la fase S. No obstante, c-myc no solo actúa regulando el ciclo celular, sino que regula la expresión de *H-TERT*, la cual también está disminuida por el tratamiento con DIG-MSK, y que es una telomerasa inducida en cáncer endometrial por distintos factores como el estradiol (Zhou c. y cols., 2013). La actividad de esta telomerasa está implicada en la adquisición del potencial ilimitado de replicación. Además, DIG-MSK es capaz de inhibir la expresión de *BCL-XL*, oncogén perteneciente a la familia de proteínas Bcl que están implicadas en los procesos de apoptosis. En concreto Bcl-xl participa en la evasión de la muerte celular programada, y su expresión se encuentra aumentada en un gran número de cánceres, incluyendo linfomas, melanomas y carcinomas de mama, próstata y pulmón. Se cree que pueda ser uno de los genes involucrados en la resistencia a los tratamientos antitumorales convencionales (Danial NN. y Korsmeyer SJ., 2004).



**Figura 27. Protooncogenes regulados por DIG-MSK.** DIG-MSK regula la expresión de diversos protooncogenes regulados por Sp1, que intervienen en diversos procesos involucrados en el desarrollo de un tumor. Se representan las inhibiciones con su posible efecto sobre el tumor, utilizando el gráfico explicativo de Hanahan y Weinberg. Parece que DIG-MSK puede ser muy eficaz como citotóxico y citotásico, y como inhibidor de la angiogénesis.

Otra de las inhibiciones promovidas por DIG-MSK es la de la expresión del gen *VEGF-A*. Este efecto indica un papel anti-angiogénico lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en los que se ve que DIG-MSK es capaz de impedir la formación de estructuras tubulares similares a capilares sanguíneos. Todas estas regulaciones, nos

indican que este nuevo análogo puede tener importantes aplicaciones terapéuticas como antitumoral, ya que parece actuar regulando diferentes procesos involucrados en el desarrollo tumoral como son la proliferación celular, la apoptosis y la angiogénesis.

Otro punto importante acerca del mecanismo de acción de DIG-MSK, es que nuestros resultados indican que este análogo difiere de la molécula parental en la regulación, tanto de la expresión génica de *SP3*, como en la actividad transcripcional dependiente de Sp3. Los factores Sp1, Sp2, Sp3 y Sp4 son proteínas que pertenecen a la familia de factores Sp/KLf que se caracterizan por conservar una estructura de unión al ADN altamente conservada (Suske G y cols, 1999). Sin embargo, análisis genéticos, moleculares y bioquímicos han demostrado que Sp2, Sp3 y Sp4 no son meramente factores con una función equivalente a Sp1 (Mansilla S y Portugal J., 2007). Aunque tanto Sp1 como Sp3, se expresan de forma ubicua en las células y compiten por la misma diana, Sp1 es un activador de la transcripción mientras que Sp3 puede ser activador o inhibidor (Safe S. y cols., 2005). Esta característica de Sp3 se evidencia claramente en la expresión de *ULBP1*, uno de los pocos genes que se ha descrito en los cuales Sp3, pero no Sp1, es un regulador clave de su actividad transcripcional (Lopez-Soto A. y cols., 2006). Así se ha demostrado que Sp3 tiene un efecto aproximadamente 50 veces mayor sobre la transcripción de *ULBP1* que Sp1. (López Soto A. y cols., 2006). En la actualidad, Sp3 está empezando a cobrar gran importancia y se están realizando diversos estudios para evaluar su posible efecto en el desarrollo tumoral. Por ejemplo, se ha visto que la expresión de Sp3 se encuentra alterada en cáncer de colon (Pathi S. y cols, 2012), próstata (Bedolla RG, 2012) y páncreas (Sankpal UT, 2012). Podría ser, que la mayor eficacia en la regulación de la expresión de *SP3* y en la transcripción mediada por Sp3 que ejerce DIG-MSK pudiese ser, por tanto, uno de los mecanismos de acción involucrados en las diferencias farmacológicas que posee este compuesto con respecto a la MTA.

Es importante destacar que el efecto inhibitorio de la expresión del vector luciferasa de respuesta a Sp1 junto con la inhibición de un grupo de genes que incluye Sp1, Sp3 y *ULBP1* en la línea IGROV-1 se correlaciona con su mayor efecto antitumoral en estas células (Nuñez L.E. y cols., 2012). Se puede especular que la unión al ADN más débil del compuesto DIG-MSK con respecto a la MTA y la diferente especificidad de unión podrían alterar de una forma significativa los genes regulados por DIG-MSK respecto a MTA, lo que podría involucrar un mecanismo de acción diferente dependiendo del tipo celular.

## **Eficacia**

Las diferencias estructurales y en cuanto a mecanismo de acción que presenta el compuesto DIG-MSK con respecto a la MTA, hacen de él un compuesto muy interesante. DIG-MSK es además muy eficaz en la inhibición de la supervivencia de diferentes líneas tumorales, con valores de IC50 del orden nanomolar y siempre con mayor eficacia que la MTA. Lo cual nos indica que podría utilizarse como medicamento antitumoral en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

Aunque DIG-MSK inhibe de forma muy eficaz la supervivencia de diferentes líneas tumorales, es especialmente importante el efecto que produce en las líneas tumorales de ovario. Este efecto es similar al de diversos derivados de una generación anterior de la MTA que han probado ser muy eficaces inhibiendo el crecimiento y la supervivencia de este tipo tumoral (Previdi S. y cols., 2010), siendo capaces además de alterar los niveles proteicos de Sp1 (Albertini V. y cols., 2006). Nuestros datos sugieren que además en este tipo tumoral es más eficaz que el compuesto parental o MTA, ya que tiene valores del IC50 menores en las líneas IGROV-1 y OVCAR-3. Esos datos parecen indicar que DIG-MSK podría ser un compuesto muy activo frente a este tipo de cáncer.

Uno de los objetivos que se pretendía alcanzar con la generación de nuevos análogos de la MTA, la reducción de su toxicidad, parece haberse conseguido en este compuesto. De hecho, la toxicidad que provoca DIG-MSK sobre PBMCs de donantes sanos, medido a través de la muerte celular inducida, fue cuatro veces menor que la inducida por la MTA. Este análogo también presenta muy baja toxicidad sistémica *in vivo* en estudios llevados a cabo por la empresa Entrechem (Nuñez L.E. y cols., 2012).

## **Efectos antitumorales**

Los quimioterápicos suelen mediar su efecto o bien de forma citotóxica, induciendo la muerte de las células tumorales, o de forma citostática inhibiendo el crecimiento de estas células. Nuestros resultados muestran que DIG-MSK tiene un efecto citotóxico muy importante sobre las células tumorales de ovario, que son aquellas sobre las que presenta una mayor eficacia inhibiendo su supervivencia, siendo capaz de aumentar de forma significativa la apoptosis en estas líneas. La producción de citotoxicidad sobre líneas tumorales es un mecanismo muy común en diversos quimioterápicos, de hecho la posibilidad de que la apoptosis sirviese como barrera frente al cáncer ya fue sugerida por

primera vez por Kerr, Wyllie y Currie en 1972, y durante las últimas 5 décadas el tratamiento del cáncer se ha basado en el uso de varias formas de quimioterapia citotóxica acompañada de radioterapia. Aunque la mayoría de los tratamientos citotóxicos se han visto reducidos debido a sus efectos secundarios (Hannum A.Y., 1997), sin embargo nuestros resultados, como los experimentos llevados a cabo en diversas líneas celulares no tumorales por Entrechem, muestran que este compuesto tiene un perfil de toxicidad bajo en las células sanas.

En la actualidad existe una larga serie de compuestos que aún se usan en clínica los cuales median su principal efecto por citotoxicidad, como son: VM26, m-AMSA, dexametasona, vincristina, cis-platino, cyclofosfamida, paclitaxel, 5'-fluoro-deoxiuridina, 5'-fluorouracilo, y adriamicina. En concreto en el tratamiento del cáncer de ovario, se usa comúnmente la combinación de dos o más compuestos que suelen ser un compuesto derivado del platino, normalmente cisplatino que tiene importantes efectos citotóxicos y un taxano (Sociedad Americana del Cancer), para evitar la resistencia que presentan muchos tipos de cánceres al tratamiento con cisplatino.

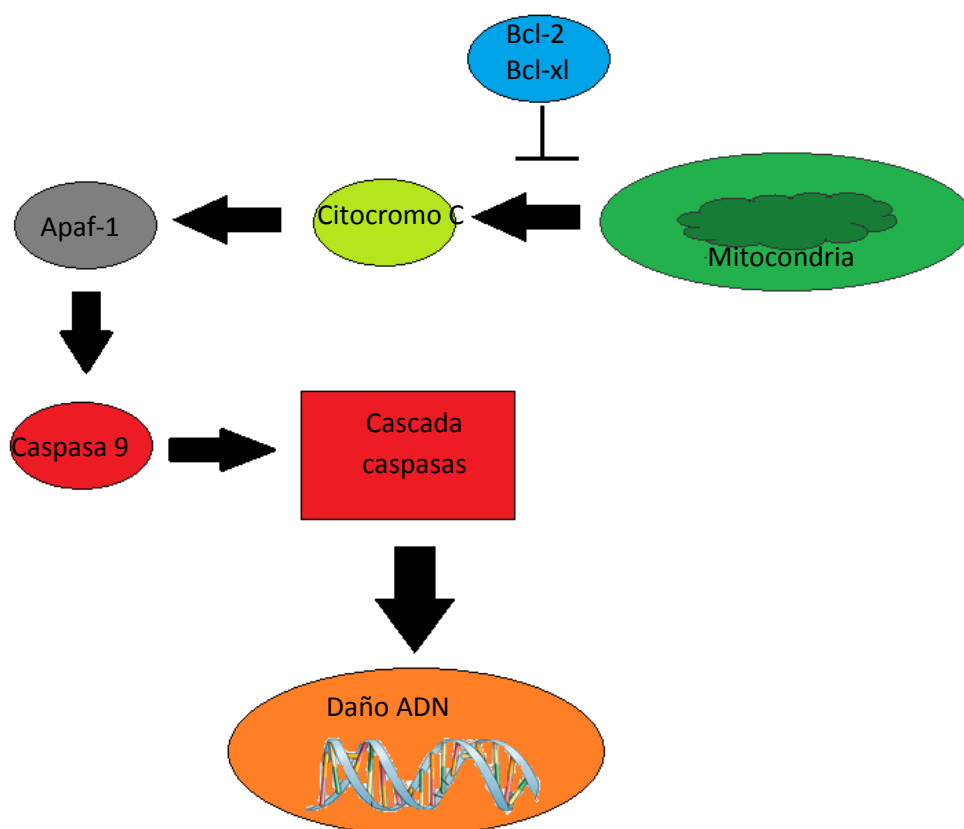
Es también importante destacar el aumento significativo de la concentración de caspasa 9 que provoca DIG-MSK en las líneas tumorales de ovario. Dicho aumento nos permite proponer que el efecto de la apoptosis que promueve DIG-MSK sea debido a la activación de la apoptosis por vía endógena, ya que desde un punto de vista bioquímico, el proceso de la apoptosis mediado por señales internas involucra al activación de las caspasas (Alnemri y cols., 1996), las cuales se pueden dividir en caspasas iniciadoras, caspasa 8 y caspasa 9, y caspasas efectoras, las caspasas 3, 6 y 7 (Cryns y Yuan, 1998).

La activación de la caspasa 9 depende de la liberación de citocromo c por parte de la mitocondria como respuesta al daño celular (Li y cols., 1997) y promueve la activación de las caspasas 3, 6 y 7 que provocan la muerte celular (Srinivasula y cols., 2001). Experimentos realizados en leucemias, muestran que tanto Apaf-1 como caspasa 9 juegan un papel importante en la apoptosis mediada por daño en el ADN (Perkins y cols., 2000). Parece ser, por tanto, que el incremento de la apoptosis provocado por DIG-MSK, puede estar relacionado con el aumento de la concentración de caspasa 9, siendo este proceso un mecanismo eficaz para erradicar el tumor.

Cabe destacar que en concordancia con la ausencia de aumento de apoptosis mediado por el tratamiento con DIG-MSK en PBMCs, tampoco se produce un aumento de



la concentración de caspasa 9. Ambos resultados indican de nuevo que este compuesto presenta muy baja toxicidad en las células sanas.



**Figura 28. Esquema representativo de la apoptosis mediada por vía intrínseca.** La apoptosis por vía intrínseca se inicia con señales liberadas por la mitocondria en forma de citocromo C que activará al complejo Apaf-1, el cual a su vez activará a la caspasa 9. Esta es una caspasa iniciadora que desencadena una cadena de reacciones que terminarán con la fragmentación del ADN y la muerte celular.

Pero no sólo DIG-MSK posee efectos citotóxicos sobre las líneas tumorales de ovario, sino que tiene importantes efectos citostáticos. Nuestros resultados muestran que DIG-MSK fue capaz de provocar una parada significativa del ciclo celular en fase G1 de las líneas OVCAR-3 e IGROV-1. Este efecto citostático puede ser debido a la regulación de las diferentes cinasas y ciclinas dependientes de cinasas involucradas en el punto de control de fase G1 del ciclo celular, especialmente la inhibición de la expresión de CDK6 y ciclina D2 tanto a nivel de ARNm como de proteína.

De hecho, la mayoría de las alteraciones genéticas que provocan cáncer han sido asociadas con genes y proteínas que forman parte de la maquinaria del ciclo celular y de hecho la proliferación celular no controlada es la característica más común de los tumores

(Rodríguez L. y cols., 2004). Por ello, la detención del ciclo celular mediante la regulación de la expresión de CDKs para inhibir la proliferación celular, es uno de los mecanismos más habituales de acción de diversos quimioterápicos, como por ejemplo el bortezomib y el ácido valproico que actúan inhibiendo la proliferación celular y aumentando la apoptosis en leucemia mieloide (Wang AH. y cols., 2011), el compuesto cucurbitacin D en cáncer de ovario (Ishii T. y cols., 2013) y el compuesto pristimerin en cáncer de páncreas (Wang Y. y cols., 2012). Además las cinasas involucradas en la parada del ciclo celular en fase G1 son de gran interés, ya que actúan como marcadores pronóstico en diferentes cánceres, como el cáncer esofágico (Ismail A. y cols., 2011).

En concreto parece que CDK6 y ciclina D2, que son reguladas tanto por DIG-MSK como por MTA en las líneas tumorales de ovario, son un mecanismo importante en cáncer de ovario. Estas dos moléculas son reguladas por la vía AKT de este tipo tumoral (Chaudhuri D. y cols., 2007) y se ha encontrado una sobre-expresión de ciclina D en diferentes tipos tumorales como el adenoma paratiroideo, varios linfomas y algunos carcinomas de células escamosas (Ortega S. y cols., 2002). La expresión de ciclina D2 se encuentra también desregulada en cáncer de pulmón (Ko E. y cols., 2012) y la de CDK4/6 en displasia epitelial (Cabrera MC. y cols., 2012). Otro dato importante es que más del 50% de los cánceres de mama estudiados han mostrado una amplificación en la región cromosómica que codifica para ciclina D (Sutherland RL y Musgrove EA, 2002), ya que se ha observado que la probabilidad de padecer un cáncer de ovario se ve incrementada en pacientes que han superado un cáncer de mama. Además en algunos tipos tumorales se utiliza la sobre-expresión de ciclina D como un mal pronóstico (Michaelis RL y Musgrove EA, 2002).

### **Efectos anti-angiogénicos**

En la actualidad se está tratando de combinar tratamientos quimioterápicos con efecto citotóxico con inhibidores de la angiogénesis como bevacizumab, para el tratamiento del cáncer de ovario (Kemp Z, Lederman Ja, 2013). Esta línea de investigación parece muy esperanzadora, pero sólo se les aplica a aquellas mujeres con alto riesgo de recurrencia. Aunque bevacizumab está aprobado por la Unión Europea, no se sabe bien la dosis y duración que requiere su tratamiento para este tipo tumoral, de hecho dosis bajas menores de 7.5 mg/kg requieren tratamientos prolongados en el tiempo (Aghajanian C. y cols., 2012). El principal problema que presenta este fármaco, es que además de que ya se

han observado casos de resistencia al tratamiento, tanto las dosis altas como la prolongación en el tiempo aumentan mucho el coste económico (Kemp Z, Lederman Ja, 2013). En la actualidad se están probando alternativas al bevacizumab utilizando inhibidores de los receptores del VEGF, como pazopanib o nintedanib, aunque todavía no hay resultados (Kemp Z. y Lederman JA., 2013). También se está administrando AMG 386, un péptido que inhibe la interacción de las angioproteínas 1 y 2 con el receptor Tie 2.

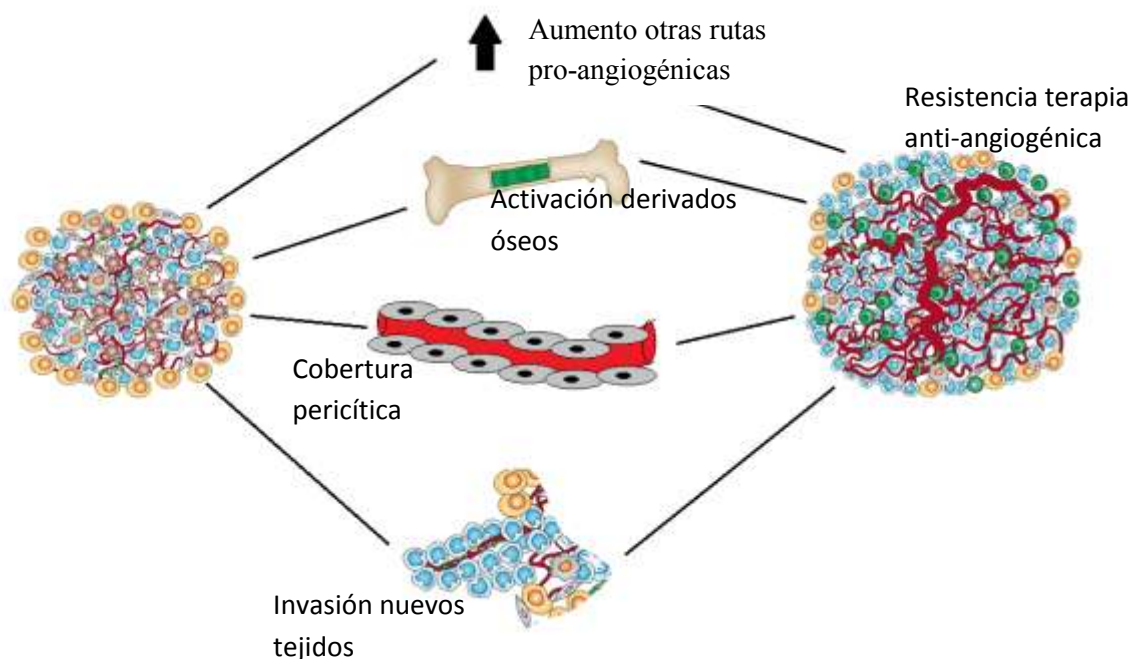
DIG-MSK podría ser una alternativa para inhibir la angiogénesis en tumores de ovario, debido a que ha mostrado tener un potente efecto anti-angiogénico inhibiendo la formación de estructuras similares a vasos sanguíneos a dosis no tóxicas. Que este efecto se produzca a dosis no tóxicas es de gran importancia, ya que se puede atribuir en lugar de a la inducción de la muerte de las células endoteliales a una posible regulación sobre la estabilización de los vasos sanguíneos. Hemos visto que DIG-MSK también induce la mortalidad de las células endoteliales, pero que a dosis no tóxicas no inhibe la migración de las mismas pero sí la estabilización de los vasos sanguíneos. Por ello el efecto anti-angiogénico que presenta DIG-MSK sería de vital importancia, ya que el mismo tratamiento combinaría un efecto de inducción de la mortalidad de las células tumorales y la inhibición de la creación y estabilización de nuevos vasos sanguíneos que eviten al tumor crecer y expandirse.

Cuando evaluamos que genes estaban involucrados en el efecto antiangiogénico promovido por DIG-MSK, obtuvimos mucha variabilidad en las diferentes líneas celulares, pero observamos que se inhibía la expresión de los receptores de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en las líneas endoteliales a nivel de ARNm y de proteína. Esta disminución de la expresión se podría correlacionar con el efecto que posee DIG-MSK impidiendo la formación de estructuras similares a vasos sanguíneos ya que VEGFR2 junto con la angioproteína 2 (ANG-2), son los inductores más importantes de la angiogénesis en condiciones de hipoxia (Bergers y Benjamin, 2003).

Existen ya en clínica distintos quimioterápicos cuyo mecanismo de acción es básicamente la inhibición o bien de VEGF como es el caso de bevacizumab, o bien inhibiendo los dominios tirosinasa de VEGFR2, como sorafenib y sunitinib, que aunque actúan de forma intrínseca no presentan gran especificidad (Bergers y Hanahan, 2008). Además en estudios clínicos de fase III en cáncer de ovario el efecto de estos fármacos se encuentra disminuido (Van der bilt AR. y cols., 2012), al igual que ocurre en otros tipos de

tumores y se observa que aunque estos compuestos provocan una buena respuesta clínica durante unos meses, el tumor vuelve a crecer de forma incontrolada (Kindler HL. Y cols., 2007) (Miller KD. y cols., 2005).

En la actualidad el mayor problema de los compuestos anti-angiogénicos es la resistencia. Estos efectos de resistencia son debidos a 4 mecanismos de evasión principales: creación de vías alternativas de estimulación de la angiogénesis, producción de nuevas células angiogénicas en médula ósea que no son sensibles a estos tratamientos, estabilización de los vasos sanguíneos mediante pericitos e invasión de nuevos tejidos (Bergers y Hanahan, 2008).



**Figura 29. Modelos de resistencia a la terapia antiangiogénica.** Existen diversos mecanismos de resistencia que desarrollan los tumores frente a las terapias actuales antiangiogénicas. Básicamente se agrupan en cuatro mecanismos principales: aumento de la actividad de otras rutas pro-angiogénicas como activación por FGF o angioproteínas, activación de derivados óseos insensibles a los tratamientos, aumento de la cobertura pericitica que forma una barrera que impide la actuación de los tratamientos y la invasión de nuevos tejidos para evadir la actuación de los fármacos. Modificado de Bergers y cols., 2008.

DIG-MSK podría ser eficaz evadiendo estos mecanismos de resistencia ya que, aunque el tumor crease vías alternativas de estimulación de la angiogénesis, nuestros resultados muestran que DIG-MSK es capaz de inhibir otros factores pro-angiogénicos como PDGF $\beta$  o FGF. En concreto FGF es uno de los factores asociados con la evasión de la resistencia en modelos preclínicos y está aumentado en sangre de pacientes con glioblastoma (Batchelor TT. y cols., 2007). De forma que aunque VEGF se encuentra inhibido, en estos pacientes se producen nuevas revascularizaciones dependientes de FGF.

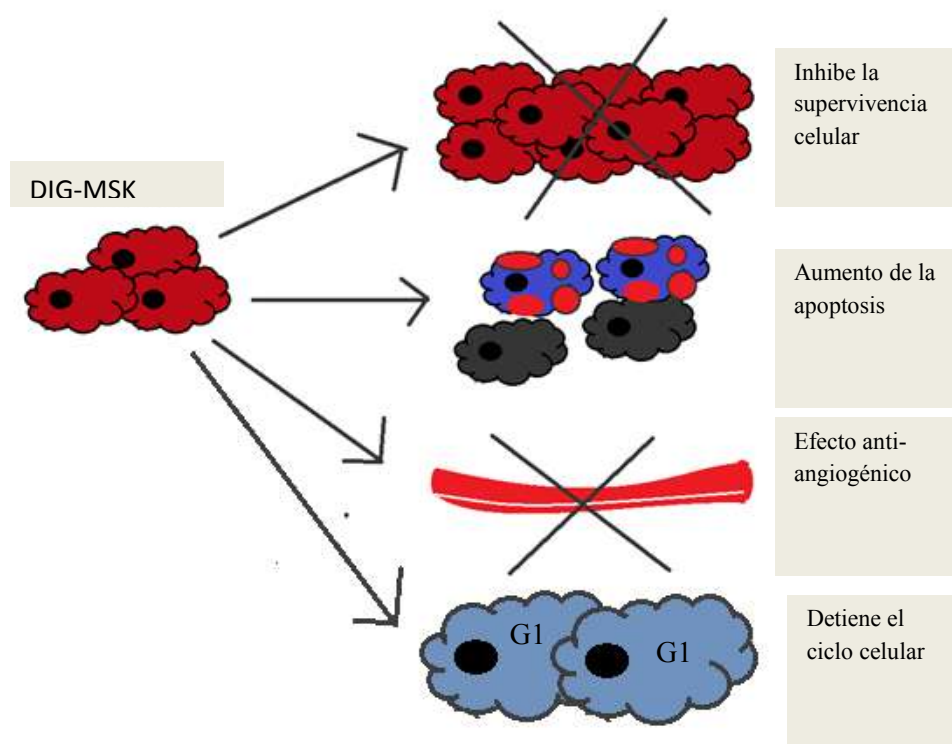
DIG-MSK ejerce su mayor efecto anti-angiogénico en la estabilización de los vasos sanguíneos, lo que nos indica que podría ser también capaz de evitar el tercer mecanismo de resistencia. La debilitación de la estructura de los vasos sanguíneos y su eliminación por parte de DIG-MSK podría involucrar algún efecto sobre los pericitos, que han probado ser células de soporte fuertemente unidas a las superficies externas de los vasos sanguíneos en la vasculatura normal. La función de los pericitos es proveer de soporte mecánico y fisiológico a las células endoteliales (Hanahan y Weinberg, 2011). Podría ser que la regulación de los diferentes receptores y factores pro-angiogénicos que provoca DIG-MSK no fuese exclusiva sobre las células endoteliales, sino que también regulase la expresión de dichos factores y receptores en los pericitos. Este posible efecto, sería muy importante ya que no sólo se ha demostrado que los pericitos evitan la destrucción de la vasculatura, sino que además los vasos sanguíneos que carecen de pericitos son más vulnerables a la inhibición por VEGF debido a que los propios pericitos son capaces de producir VEGF (Bergers G. y cols., 2003). De esta forma producen una alteración de la balanza angiogénica, para mantener la nueva angiogénesis y ayudar a la vasculatura a resistir a la terapia anti-angiogénica (Ferrara, 2010).

Existen fármacos que inhiben la expresión del receptor de PDGF expresado en los pericitos tumorales, lo cual resulta en una disminución de la cobertura de los pericitos, y por tanto, desestabilización de la integridad vascular (Pietras y Ostman, 2010). Se ha descrito que este tipo celular secreta además de VEGF, angioproteína 1 que es recepcionada por el receptor Tie2 en la superficie de las células endoteliales, ayudando en la homeostasis (Gaengel y cols., 2009; Bergers y Song, 2005). Se ha visto que los pericitos también ayudan a las células endoteliales en la síntesis de la membrana basal y en el mantenimiento de la presión hidrostática sanguínea (Hanahan y Weinberg, 2011). Parece ser que, por tanto, el efecto de DIG-MSK sobre la estabilización de los vasos sanguíneos podría involucrar de alguna forma a los pericitos, hipótesis que vemos acentuada por la inhibición de la expresión de *PDGFR* que promueve DIG-MSK no sólo a nivel de ARNm sino también a nivel de proteína.

Una estrategia eficaz para tratar un tumor, es por tanto la combinación de diversos fármacos antitumorales, que se complementen para evitar los mecanismos de resistencia. En este punto, podría ser interesante la realización de estudios combinando bevacizumab, soratenib y sunitinib junto con DIG-MSK.

## Futuros ensayos

DIG-MSK es un fármaco con propiedades antitumorales muy importantes, con efectos citotóxicos, citostáticos sobre las líneas tumorales de ovario y anti-angiogénicos sobre células endoteliales. No obstante, estos resultados de ensayos in vitro deberían ser evaluados en modelos animales. Una opción interesante, sería evaluar el efecto antitumoral que ejerce DIG-MSK sobre animales xenotransplantados, lo que nos daría unos resultados más fácilmente extrapolables a lo que sucedería al administrarlo en clínica. En estos mismos animales se podría comprobar el efecto tóxico que posee este compuesto, sobre el resto del organismo. Asimismo sería importante utilizar tanto animales inmunodeficientes como inmunocompetentes para evaluar el efecto de DIG-MSK sobre el sistema inmune.



**Figura 30. Esquema representativo de los efectos farmacológicos de DIG-MSK sobre células tumorales.** Hemos observado que DIG-MSK es capaz de inhibir la supervivencia de diferentes líneas tumorales a concentraciones nanomolares, provoca el aumento de la apoptosis en líneas tumorales de ovario y posee un efecto anti-angiogénico bloqueando la formación de estructuras similares a vasos sanguíneos.

Cuando analizamos el efecto que tenía DIG-MSK sobre la expresión de *MIC-A*, obtuvimos que se encuentra aumentada en la línea IGROV-1. MICA es una molécula perteneciente a la familia de moléculas de membrana MIC, que se relacionan parcialmente con las moléculas del MHC de clase I y que son ligandos del receptor NKG2D (González

S. y cols., 2008). Los ligandos de NKG2D presentan un patrón de expresión muy restringido en tejidos normales, pero su expresión se induce en células tumorales e infectadas, lo que permite el reconocimiento de estas células por el sistema inmune (López Larrea C. y cols., 2008). De esta forma, un aumento de la expresión de MICA podría conllevar un mayor reconocimiento por el sistema inmune, y un posible mecanismo de eliminación del tumor. No hay que olvidar, que la formación de un tumor involucra la resistencia o la evasión al sistema inmune para formar tanto neoplasias como tumores a largo plazo. La teoría de la inmunovigilancia propone que el sistema inmunológico es el responsable del reconocimiento y la eliminación de tumores incipientes. De acuerdo con esta teoría, los tumores han sido capaces o bien de evadir la detección, o de limitar la muerte celular inducida por el sistema inmune. Esta teoría confirmó con la observación del aumento de la incidencia de ciertos tipos tumorales en individuos inmunocomprometidos (Vajdic y Van Leeuwen, 2009). Recientemente se han encontrado evidencias, tanto en animales modificados genéticamente como en epidemiología clínica, que sugieren un papel del sistema inmune como barrera para la formación y progresión tumoral (Bindea y cols., 2010). Además se ha comprobado que pacientes con tumores de colon y ovario infiltrados con linfocitos T citotóxicos y células Natural Killer, tienen un mejor pronóstico, que aquellos que poseen una falta de estos tipos linfocitarios (Page y cols., 2010; Nelson, 2008). Por todo ello, sería importante evaluar si DIG-MSK podría alterar de alguna manera el reconocimiento tumoral por parte del sistema inmune y de esta forma favorecer, la eliminación del tumor en estudios funcionales.

Parece importante, que el compuesto DIG-MSK continúe con los ensayos clínicos, ya que parece una molécula muy prometedora para el tratamiento del cáncer de ovario. Pero no sólo sería importante realizar los estudios clínicos tradicionales, sino que sería importante evaluar tanto el efecto del compuesto en terapia combinada con otros antitumorales de uso en el tratamiento del cáncer de ovario, como cisplatino. De forma que la terapia combinada con DIG-MSK, no sólo podría aumentar la eficacia de los tratamientos actuales, sino que también podría prevenir la aparición de resistencias, ya que no sólo inhibiría la proliferación de las células tumorales, sino que debido a su efecto citotóxico sobre las líneas tumorales de ovario, promovería la muerte celular principalmente vía apoptosis.

Este efecto citotóxico de DIG-MSK también podría ser útil en la aplicación previa a la cirugía que se utiliza como tratamiento de este tipo de cáncer. Aunque la cirugía ha

sido muy eficaz, la mayoría de las mujeres presentan dificultades y tienen que ser intervenidas varias veces (Van der burg ME. y cols., 1995). Para evitar el paso por dos operaciones, se ha probado el uso de quimioterapia previa a la cirugía, para reducir el tamaño del tumor y facilitar la intervención que se produce tras el tratamiento con 3-4 ciclos de quimioterapia. Esta metodología ha sido muy eficaz en otros tipos de cáncer como el cáncer de mama (Kemp Z. y Lederman JA., 2013) y sería por tanto, necesario incorporar esta posibilidad en el diseño de los ensayos clínicos para nuevas drogas. DIG-MSK, que posee diversas propiedades antitumorales y que en nuestros experimentos ha mostrado ser capaz de inhibir casi al 100% la supervivencia de las células tumorales de ovario, podría ser muy eficaz para este tipo de tratamiento, reduciendo el tamaño del tumor en gran medida para facilitar su extirpación.

Sería también muy importante la evaluación de su efecto sobre todos los componentes del microambiente tumoral, ya que en la actualidad se considera que no se podrá llegar a eliminar el cáncer sin el estudio de los efectos de los diferentes quimioterápicos sobre el conjunto de tejidos involucrados en el desarrollo tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011). Algunos autores como Guido Kroemer apuntan ya, que sería necesario cambiar el diseño de los ensayos clínicos e incorporar ensayos animales inmunocompetentes, para evaluar cómo se comportan los medicamentos antitumorales en animales que tienen su sistema inmune completo, lo cual proporcionaría un medio más cercano a la realidad.

Podemos concluir que DIG-MSK es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis, también actúa alterando la expresión de CDK6 y ciclina D2, provocando una parada del ciclo celular en fase G1. Es además un fármaco con importantes efectos anti-angiogénicos que provoca la apoptosis de las líneas endoteliales e impide la estabilización de estructuras similares a vasos sanguíneos. Por último su perfil toxicológico es muy importante, ya que en concreto en PBMCs presento una toxicidad 4 veces menor que la del compuesto parental, la MTA. Proponemos que por tanto, DIG-MSK es un fármaco muy prometedor, que debería seguir los ensayos clínicos.



## **CONCLUSIONES**

1. Las diferencias estructurales que presenta el compuesto DIG-MSK no involucran una diferencia en su patrón de captación con respecto a la MTA, sin embargo su unión al ADN se realiza de forma más débil y con una especificidad diferente.
2. DIG-MSK retiene la capacidad de la MTA de inhibir la transcripción mediada por Sp1 y de inhibir diversos proto-oncogenes regulados por Sp1 en las líneas tumorales de ovario.
3. DIG-MSK es un inhibidor más potente que la MTA en la transcripción mediada por Sp3 y de la expresión de Sp3 en algunas líneas tumorales de ovario.
4. MTA y DIG-MSK inhiben la supervivencia de diversas líneas tumorales, siendo mayor la producida en las líneas tumorales de ovario. En estas líneas provocan un aumento de la apoptosis.
5. DIG-MSK es cuatro veces menos tóxico que la MTA en células mononucleares de sangre periférica en individuos sanos.
6. MTA y DIG-MSK provocan una detención del ciclo celular en fase G1 en las líneas OVCAR-3 e IGROV-1 que se asocia con una disminución de la expresión de Cyclina D2 y CDK6 a nivel de ARNm y proteína.
7. MTA y DIG-MSK inhiben la supervivencia e inducen muerte celular en las líneas H-MEC-1 y DIG-MSK. Así mismo, DIG-MSK provoca una parada en fase G1 del ciclo celular en la línea HUVEC, pero no en H-MEC-1, mientras que MTA provoca la parada en fase G1 en ambas líneas endoteliales.
8. Aunque DIG-MSK no posee efecto sobre la migración de las células endoteliales, es capaz de inhibir la formación de estructuras similares a vasos sanguíneos a dosis no tóxicas.
9. MTA y DIG-MSK inhiben la expresión a nivel de ARNm y de proteína de VEGFR1 y VEGFR2 en las líneas HUVEC y H-MEC-1.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Abdollahi, A.; Hahnfeldt, P., Maercker, C., Grone, H., Debus, J., Ansorge, W., Folman, J., Hlatky, L., Huber, P.E. Endostatin's antiangiogenic signaling network. *Mol. Cell* 13, 2004(5): 649–63

Aghajanian C., Blank S. V., Goff B.A., Judson P.L., Teneriello M.G., Husain A., Sovak M.A., Yi J., Nycum L.R. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J Clin Oncol.*2012;30(17):2039–2045.

Albertini V., Jain A., Vignati S., Napoli S., Rinaldi A., Kwee I., Nur-e-Alam M., Bergant J., Bertoni F., Carbone G.M., Rohr J., Catapano C.V. Novel GC-rich DNA-binding compound produced by a genetically engineered mutant of the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* exhibits improved transcriptional repressor activity: implications for cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(6):1721-34.

Alnemri E.S., Livingston D.J., Nicholson D.W., Salvesen G., Thornberry N.A., Wong W.W., Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996 Oct 18;87(2):171.

American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2012.

Artandi, S.E., DePinho, R.A. Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer. *Nat. Med.* (2000). 6, 852–855

Ashkenazi, A., Dixit, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol,* 1999 11, 255–260

Barceló F., Scotta C., Ortiz-Lombardía M., Méndez C., Salas J.A., Portugal J. Entropically-driven binding of mithramycin in the minor groove of C/G-rich DNA sequences, *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: 2215-2226.

Batchelor T.T., Sorensen A.G., di Tomaso E., Zhang W.T., Duda D.G., Cohen K.S., Kozak K.R., Cahill D.P., Chen P.J., Zhu M., Ancukiewicz M., Mrugala M.M., Plotkin S., Drappatz

J., Louis D.N., Ivy P., Scadden D.T., Benner T., Loeffler J.S., Wen P.Y., Jain R.K. ZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell* 2007;11:83–95.

Bedolla R.G., Gong J., Prihoda T.J., Yeh I.T., Thompson I.M., Ghosh R., Kumar A.P. Predictive value of Sp1/Sp3/FLIP signature for prostate cancer recurrence. *PLoS One*. 2012;7(9):e44917.

Berdasco M., Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell*. 2010 Nov 16;19(5):698-711.

Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):592-603. Review.

Bergers, G., Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncol.* 7, 452–464.

Bergers G., Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):401-10. Review.

Bhowmick N.A., Neilson E.G., Moses H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337(2004).

Bindea G., Mlecnik B., Fridman W.H., Page` s F., Galon J. (2010). Natural immunity to cancer in humans. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 215–222.

Bishop J. M., Weinberg R. A. (eds.). *Molecular Oncology*. New York: Scientific American, Inc., 1996

Bishop J.M., Varmus H. (1982) Functions and origins of retroviral transforming genes. In: Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J (eds) *RNA tumor viruses*. Cold Spring Harbor Press, New York, pp 999–1108

Black A.R., Black J.D., Azizkhan-Clifford J. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol.* 2001;188(2):143-60.

Blanco G., Fernandez E., Fernandez M.J., Brana A.F., Weissbach U., Kunzel E., Rohr J., Mendez C. Salas J.A. Characterization of two glycosyltransferases involved in early glycosylation steps during biosynthesis of the antitumor polyketide mithramycin by *Streptomyces argillaceus*. *Mol. Gen. Genet.* (2000), 262, 991–1000.

Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 1976 72: 248–254.

Cabrera M.C., Díaz-Cruz E.S., Kallakury B.V., Pishvaian M.J., Grubbs C.J., Muccio D.D., Furth P.A. The CDK4/6 inhibitor PD0332991 reverses epithelial dysplasia associated with abnormal activation of the cyclin-CDK-Rb pathway. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012 Jun;5(6):810-21

Cao Y., Ji R.W., Davidson D., Marti D., Söhndel S., McCance S.G., O'Reilly M.S., Llinás M., Folkman J. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 1996 (46): pp. 29461–7.

Carbone G.M., Napoli S., Valentini A., Cavalli F., Watson D.K., Catapano C.V. Triplex DNA-mediated downregulation of Ets2 expression results in growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2004 Aug 16.

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):653-60. Review.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):389-95. Review.

Carpenter G . The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* (2000) 22 (8): pp. 697–707.

Castellarin M., Milne K., Zeng T., Tse K., Mayo M., Zhao Y., Webb J.R., Watson P.H., Nelson B.H., Holt R.A. Clonal evolution of high-grade serous ovarian carcinoma from primary to recurrent disease. *J Pathol.* 2012 Sep 21.

Cawley S., Bekiranov S., Ng H.H., Kapranov P., Sekinger E.A., Kampa D., Piccolboni A., Sementchenko V., Cheng J., Williams A.J., Wheeler R., Wong B., Drenkow J., Yamanaka M., Patel S., Brubaker S., Tammana H., Helt G., Struhl K., Gingeras T.R. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell.* 2004 Feb 20

Chan A., Gilks B., Kwon J., Tinker A.V. New insights into the pathogenesis of ovarian carcinoma: time to rethink ovarian cancer screening. *Obstet Gynecol.* 2012 Oct;120(4):935-40.

Chaudhuri D., Orsulic S., Ashok B.T. Antiproliferative activity of sulforaphane in Akt-overexpressing ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jan;6(1):334-45.

Comamala M., Pinard M., Thériault C., Matte I., Albert A., Boivin M., Beaudin J., Piché A., Rancourt C. Downregulation of cell surface CA125/MUC16 induces epithelial-to-mesenchymal transition and restores EGFR signalling in NIH:OVCAR3 ovarian carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, vol. 104, no. 6, pp. 989–999, 2011.

Counter C.M., Avilion A.A., LeFeuvre C.E., Stewart N.G., Greider C.W., Harley C.B., Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992. 11, 1921–1929

Coussens L.M., Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *1996 Chem. Biol.* 3, 895–904.

Cryns V., Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* 1998 Jun 1;12(11):1551-70.

Cruzalegui F. Protein kinases: From targets to anti-cancer drugs. *Ann Pharm Fr.* 2010 Jul;68(4):254-9.

Daniel N.N., Korsmeyer S.J. Cell death: critical control points. *Cell* 2004 Jan 23;116(2):205-19.

Eichholz A., Merchant S., Gaya A.M. Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management. *Onco Targets Ther.* 2010 Jun 24.

Fedi P., Tronick S.R., Aaronson S.A. Growth factors In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), 1997 pp. 41–64

Ferlay J., Shin H.R., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide IARC Cancer Base No 10 Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.

Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2002 Jun;9(6):669-76. Review.

Foijer F.; Te Riele H. Restriction beyond the restriction point: mitogen requirement for G2 passage, *Cell Division* 2008 (1): 8.

Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4604-13.

Frank D.A. Targeting transcription factors for cancer therapy. *IDrugs* 2009;12:29-33.



Gaengel K., Genove' G., Armulik A., Betsholtz C. Endothelial mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2009).29, 630–638.

García Mata J., García-Palomo Pérez A., García Gómez J. Quimioterapia antineoplásica. En: *Principios del tratamiento oncológico*. Cortés Funes H, Colomer Bosch, R. Publicaciones Permanyer. ISBN: 978-84-92620-17-3. Barcelona, 2009, p. 219-259

Gatenby R.A., Gillies R.J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature Rev. Cancer* 2008;8:56–61.

González S., López-Soto A., Suarez-Alvarez B., López-Vázquez A., López-Larrea C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol.* 2008 Aug; 29(8):397-403.

González Martín A., Bratos R., Márquez R., Alonso S., Chiva L. Bevacizumab as front-line treatment for newly diagnosed epithelial cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2013 Feb;13(2):123-9.

Gniazdowski M., Denny W.A., Nelson S.M., Czyz M. Effects of anticancer drugs on transcription factor-DNA interactions, *Expert Opin. Ther. Targets.* 2005; 9, 471-489.

Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899 (2010).

Graña X., Reddy E.P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* 1995 Jul 20;11(2):211-9.

Hall T.J., Schaeublin M., Chambers T.J. The majority of osteoclasts require mRNA and protein synthesis for bone resorption in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 195: 1245-1253.

Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74

Hanahan D., Weinberg R.A. The Hallmarks of cancer. *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7, 2000.

Hannun Y.A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood*. 1997 Mar 15;89(6):1845-53. Review

He S., Sun J.M., Li L., Davie J.R. Differential intranuclear organization of transcription factors Sp1 and Sp3. *Mol Biol Cell*. 2005 Sep;16(9):4073-83.

Heim S., Mitelman F. Molecular screening for new fusion genes in cancer. *Nat Genet*. 2008 Jun;40(6):685-6.

Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell*. 1991 Jan 25;64(2):249-70.

Ishii T., Kira N., Yoshida T., Narahara H. Cucurbitacin D induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. *Tumour Biol*. 2013 Feb;34(1):285-91

Ismail A., Bandla S., Reveiller M., Toia L., Zhou Z., Gooding W.E., Kalatskaya I., Stein L., D'Souza M., Litle V.R., Peters J.H., Pennathur A., Luketich J.D., Godfrey T.E. Early G<sub>1</sub> cyclin-dependent kinases as prognostic markers and potential therapeutic targets in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Jul 1;17(13):4513-22.

Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005 Jan 7;307(5706):58-62. Review.

Johnson J.P. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation to metastatic disease. 1991. *Cancer Metastasis Rev*. 10,11–22.

Jones R.G., Thompson C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009 Mar 1;23(5):537-48. doi: 10.1101/gad.1756509. Review.

Karin M., Lawrence T., Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell.* 2006 Feb 24;124(4):823-35. Review.

Kemp Z.; Lederman J.A. Update on first-line treatment of advanced ovarian carcinoma *Int J Womens Health.* 2013; 5: 45–51.

Kerbel S.R. Tumor angiogenesis: past, present and near future. *Carcinogenesis* vol. 21 n°3 pp505-515, 2000.

Kindler H.L., Niedzwiecki D., Hollis D., Sutherland S., Schrag D., Hurwitz H., Innocenti F., Mulcahy M.F., O'Reilly E., Wozniak T.F., Picus J., Bhargava P., Mayer R.J., Schilsky R.L., Goldberg R.M. A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of gemcitabine (G) plus bevacizumab (B) versus gemcitabine plus placebo (P) in patients (pts) with advanced pancreatic cancer (PC). *J. Clin. Oncol* 2007;25:4508.

Ko E., Kim Y., Park S.E., Cho E.Y., Han J., Shim Y.M., Park J., Kim D.H. Reduced expression of cyclin D2 is associated with poor recurrence-free survival independent of cyclin D1 in stage III non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2012 Aug;77(2):401-6

Kumar M., Path V., Abbas K. A., Nelson F., Aster J. Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair. *En Saunders (Elsevier, 2009). Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.*

Kumar A.P., Butler A.P. Enhanced Sp1 DNA-binding activity in murine keratinocyte cell lines and epidermal tumors. *Cancer Lett.* 1999;137(2):159-65.

Kwak C., Jin R.J., Lee C., Park M.S., Lee S.E. Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor expression and their relationship with p53 status in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.* 2002 Feb;89(3):303-9.

Lertxundi U., Corcóstegui B., Peral J., Ibarra O., Martínez MJ. Modulación de las cinasas dependientes de ciclinas como nueva estrategia terapéutica. *Gac Med Bilbao*. 2005; 102: 31-39.

Levine B., Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27–42 (2008).

Li L., He S., Sun J.M., Davie J.R. Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol*. 2004;82(4):460-71.

Liede A.; Malik I.A.; Aziz Z.; Rios P.D.; Kwan E.; Narod S.A. Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to breast and ovarian cancer in Pakistan. *American Journal of Human Genetics* (2002) 71: pp. 595 – 606

Livak K. J., Schmittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* (2001) 25 (4): 402-408.

Lodish. *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana(2005). ISBN 950-06-1974-3.

Lombó F., Menéndez N., Salas J.A., Méndez C. The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;73(1):1-14.

López-Larrea C., Suárez-Alvarez B., López-Soto A., López-Vázquez A., Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med*. 2008 Apr;14(4):179-89..

López-Soto A., Quiñones-Lombrana A., López-Arbesú R., López-Larrea C., González S. Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor. *J Biol Chem*. 2006 Oct 13.

Lukashev M.E., Werb Z. ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. 1998. *Trends Cell Biol.* 8, 437–441.

Luo H., Daddysman M.K., Rankin G.O., Jiang B.H., Chen Y.C. Kaempferol enhances cisplatin's effect on ovarian cancer cells through promoting apoptosis caused by down regulation of cMyc. *Cancer Cell Int.* 2010 May 11;10:16.

Maeshima Y., Sudhakar A., Lively J.C., Ueki K., Kharbanda S., Kahn C.R., Sonenberg N., Hynes R.O., Kalluri R. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science* 295, 2002(5552): 140–3.

Malumbres M., Barbacid M. Milestones in cell division To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2001(3): 222–231,

Mansilla S., Garcia-Ferrer I., Méndez C., Salas J.A., Portugal J. Differential inhibition of restriction enzyme cleavage by chromophore-modified analogues of the antitumour antibiotics mithramycin and chromomycin reveals structure–activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 2010;79:1418-27.

Mansilla S., Portugal J. Sp1 transcription factor as a target for anthracyclines: effects on gene transcription. *Biochimie.* 2008 Jul;90(7):976-87.

Masutomi K., Possemato R., Wong J.M., Currier J.L., Tothova Z., Manola J.B., Ganesan S., Lansdorp P.M., Collins K., Hahn W.C. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8222–8227 (2005).

McDonnell T.J., Deane N., Platt F.M., Nunez G., Jaeger J., McKearn J.P., Korsmeyer S.J. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*, 57 (1989), pp. 79–88

Meng F., Sun G., Zhong M., Yu Y., Brewer M.A. Anticancer efficacy of cisplatin and trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine on ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2013 Jan 31. doi: 10.1038/bjc.2013.10.

Michaelis R.J., Van de Brekel M., Balm F. Defects in G1-S cell cycle control in head and neck cancer: a review. *Head Neck*. 2002;24(7):694-704

Miller K.D., Sweeney C.J., Sledge G.W. Jr. Can tumor angiogenesis be inhibited without resistance? *EXS* 2005; 2005:95–112.

Mohamed F.Z., Hussien Y.M., Albakry M.M., Mohamed R.H., Said N.M. Role of DNA repair and cell cycle control genes in ovarian cancer susceptibility. *Mol Biol Rep*. 2013 Jan 1.

Moscow J.A., Cowan K.H. Biology of cancer. In: Goldman L, Ausiello D, eds. *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier;2007:chap 187.

Nelson, B.H. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol. Rev.* 222, 101–116. (2008).

Núñez L. E., Nybo S. E., González-Sabín J., Pérez M., Menéndez N., Braña A. F., He M., Morís F., Salas J. A., Rohr J. Méndez C. (2012) A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis, *J Med Chem* 2012.

Ortega S., Malumbres M., Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochem. Biophys. Acta*. 2002;1602(1):73-87

Page` s F., Galon J., Dieu-Nosjean M.C., Tartour E., Saute` s-Fridman C., y Fridman W.H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093–1102.

Pardee A.B. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1994, **71** (4): 1286–1290.

Parker J.I., Venteicher A.S., Hong J.Y., Choi J., Jun S., Shkreli M., Chang W., Meng Z., Cheung P., Ji H., McLaughlin M., Veenstra T.D., Nusse R., McCrea P.D., Artandi S.E. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460, 66–72 (2009).

Pathi S., Jutooru I., Chadalapaka G., Nair V., Lee S.O., Safe S. Aspirin inhibits colon cancer cell and tumor growth and downregulates specificity protein (Sp) transcription factors. *PLoS One*. 2012;7(10):e48208.

Perkins C.L., Fang G., Kim C.N., Bhalla K.N. The role of Apaf-1, caspase-9, and bid proteins in etoposide- or paclitaxel-induced mitochondrial events during apoptosis. *Cancer Res*. 2000 Mar 15;60(6):1645-53.

Picó C. Bases farmacológicas del tratamiento antineoplásico. En: Cortés Funes H, Colomer Bosch, R. Principios del tratamiento oncológico. Publicaciones Permanyer. ISBN: 978-84-92620-17-3. Barcelona, 2009, p. 201-218.

Pietras K., Ostman A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res*. 316, 1324–1331.

Previdi S., Malek A., Albertini V., Riva C., Capella C., Brogini M., Carbone G.M., Rohr J., Catapano C.V. Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts. *Gynecol Oncol*. 2010;118:182-8.

Remsing L.L., Bahadori H.R., Carbone G.M., McGuffie E.M., Catapano C.V., Rohr J. Inhibition of c-src transcription by mithramycin: structure-activity relationships of biosynthetically produced mithramycin analogues using the c-src promoter as target. *Biochemistry*. 2003; 42: 8313-8324.

Rein B.J.D., Gupta S., Dada R., Agarwal A., Safi J., Michener C. Potential markers for detection and monitoring of ovarian cancer, *Journal of Oncology*, vol. 2011, Article ID 475983, 17 pages, 2011.

Rodríguez Fragoso L., Hernández Baltasar E., Reyes Esparza J.A. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología Aplicada* 2004,21:60-69

Rodríguez-Rodero S., González S., Rodrigo L., Fernández-Morera J.L., Martínez-Borra J., López-Vázquez A., López-Larrea C. Transcriptional regulation of MICA and MICB: a novel polymorphism in MICB promoter alters transcriptional regulation by Sp1. *Eur J Immunol.* 2007 Jul;37(7):1938-53.

Safe S., Abdelrahim M. Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41(16):2438-48.

Sankpal U.T., Maliakal P., Bose D., Kayaleh O., Buchholz D., Basha R. Expression of specificity protein transcription factors in pancreatic cancer and their association in prognosis and therapy. *Curr Med Chem.* 2012;19(22):3779-86.

Sarojini S., Tamir A., Lim H., Li S., Zhang S., Goy A., Pecora A., Suh S.K. Early Detection Biomarkers for Ovarian Cancer. *J Oncol.* 2012; 2012:709049.

Sastry M., Patel D.J. Solution structure of the mithramycin dimer-DNA complex, *Biochemistry.* 1993; 32, 6588-6604.

Scorrano L., Oakes S.A., Opferman J.T., Cheng E.H., Sorcinelli M.D., Pozzan T., Korsmeyer S.J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science.* 2003 Apr 4;300(5616):135-9.

Shay J.W., Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. 1997 *Eur. J. Cancer* 33, 787–791.

Sleiman S.F., Langley B.C., Basso M., Berlin J., Xia L., Payappilly J.B., Kharel M.K., Guo H., Marsh J.L., Thompson L.M., Mahishi L., Ahuja P., MacLellan W.R., Geschwind D.H., Coppola G., Rohr J., Ratan R.R. Mithramycin is a gene-selective Sp1 inhibitor that identifies a biological intersection between cancer and neurodegeneration. *J Neurosci.* 2011 May 4;31(18):6858-70



Soucek L., Whitfield J., Martins C.P., Finch A.J., Murphy D.J., Sodik N.M., Karnezis A.N., Brown Swigart L. Nasi S., Evan G.I. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy, *Nature*, 2-10-2008

Srinivasula S.M., Saleh A., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Alnemri E.S. Isolation and assay of caspases. *Methods Cell Biol.* 2001;66:1-27.

Suske G. The Sp-family of transcription factors. *Gene.* 1999;238(2):291-300.

Sutherland R.L, Musgrove E.A. Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models. *Breast Cancer Res.* 2002;4(1):14-7.

Suzuki M., Youle R.J., Tjandra N. Structure of Baxcoregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*, 103 (2000), pp. 645–654.

Taylor R.C., Cullen S. P.; Seamus J.M. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature*, 2008. Review, vol 9, 231-241.

Teng M.W., Swann J.B., Koebel C.M., Schreiber R.D., Smyth M.J. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol.* 2008 Oct;84(4):988-93. Epub 2008 May 30. Review.

Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003 Oct;314(1):61-8.

Vacchelli E., Martins I., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G., Galluzzi L. Trial watch: Peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2012 Dec 1;1(9):1557-1576.

Vajdic C.M., Van Leeuwen M.T. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* (2009) 125, 1747–1754.

Van der Bilt A.R., de Vries E.G., de Jong S., Timmer-Bosscha H., van der Zee A.G., Reyners A.K. Turning promise into progress for antiangiogenic agents in epithelial ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Nov;84(2):224-42.

Van der Burg M.E., van Lent M., Buyse M., Kobierska A., Colombo N., Favalli G., Lacave A.J., Nardi M., Renard J., Pecorelli S. The effect of debulking surgery after induction chemotherapy on the prognosis in advanced epithelial ovarian cancer. Gynecological Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *N Engl J Med*. 1995;332(10):629–634.

Vichai V., Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 2006.

Vizcaíno C., Mansilla S., Núñez L.E., Méndez C., Salas J.A., Morís F., Portugal J. Novel mithramycins abrogate the involvement of protein factors in the transcription of cell cycle control genes. *Biochem Pharmacol*. 2012;84:1133-42

Wang A.H., Wei L., Chen L., Zhao S.Q., Wu W.L., Shen Z.X., Li J.M. Synergistic effect of bortezomib and valproic acid treatment on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome cells. *Ann Hematol*. 2011 Aug;90(8):917-31.

Wang S.; Liu X.; Ji Y.; Chen N. The Effect of Tumstatin Anti-tumor Peptide on Proliferation and Apoptosis of Different Cells. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 2007. ICBBE 2007. IEEE. pp. 122–5.

Wang Y., Zhou Y., Zhou H., Jia G., Liu J., Han B., Cheng Z., Jiang H., Pan S., Sun B. Pristimerin causes G1 arrest, induces apoptosis, and enhances the chemosensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(8):e43826.

Wang W., Dgany O., Dym O., Altman A., Shoseyov O., Almog O. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of SP1, a novel chaperone-like protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2003 Mar.

Wei C.M., Zong W.X., Cheng E. H. Y., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., Roth K.A., MacGregor R.G., Thompson C.B., Korsmeyer J.S. Proapoptotic BAX and BAK: A requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science.* 2001 April 27; 292(5517): 727–730.

Weinberg R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. 1995. *Cell* 81, 323–330.

Wu G. S., Ding Z. Caspase 9 is required for p53 dependence chemosensitivity in a human ovarian cancer cell line. *Oncogene* 3 January 2, Number 1, Pages 1-8

Yang J., Mani S.A., Donaher J.L., Ramaswamy S., Itzykson R.A., Come C., Savagner P., Gitelman I., Richardson A., Weinberg R.A. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004 Jun 25;117(7):927-39.

Yang P.M., Lin P.J., Chen C.C. CD1d induction in solid tumor cells by histone deacetylase inhibitors through inhibition of HDAC1/2 and activation of Sp1. *Epigenetics.* 2012;7:390-9.

Yu J.C., Li W., Wang L.M., Uren A., Pierce J.H., Heidaran MA. Differential requirement of a motif within the carboxyl-terminal domain of alpha-platelet-derived growth factor (alpha PDGF) receptor for PDGF focus forming activity chemotaxis, or growth. *J. Biol. Chem.* 270, 1995 (13): pp. 7033–6

Yuan P., Wang L., Wei D., Zhang J, Jia Z., Li Q., Le X., Wang H., Yao J., Xie K. Therapeutic inhibition of Sp1 expression in growing tumors by mithramycin a correlates directly with potent antiangiogenic effects on human pancreatic cancer. *Cancer.* 2007;110(12):2682-90.

Yuan T.L., Cantley L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497–5510 (2008).

Zhou C., Steplowski T.A., Dickens H.K., Malloy K.M., Gehrig P.A., Boggess J.F., Bae-Jump V.L. Estrogen Induction of Telomerase Activity through Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Dependent Pathway in Human Endometrial Cancer Cells. PLoS One. 2013;8(2):e55730.