

RESULTATS

1. DETERMINACIÓ DE L'EFECTE ANTITUMORAL IN VITRO DE COMPOSTOS INHIBIDORS SELECTIUS DE COX-2 EN CÈL·LULES DE CARCINOMA DE CÒLON

1.1 L'efecte antitumoral in vitro del Celecoxib, Rofecoxib i Valdecoxib no està relacionat amb la seva capacitat d'inhibició de COX-2

Actualment s'estan desenvolupant diversos compostos que inhibeixen selectivament COX-2 per tal d'utilitzar-los com antiinflamatoris i/o antitumorals. Per ara, els únics que es troben disponibles per al seu ús clínic són: Celecoxib, Rofecoxib, Valdecoxib, Parecoxib i Etoricoxib. Tots ells s'usen com antiinflamatoris i l'únic que està acceptat per l'FDA (Food and Drug Administration) pel seu ús com quimiopreventiu en càncer és el celecoxib.

El nostre objectiu en aquest treball era estudiar el mecanisme d'acció a través del qual els inhibidors de COX-2 tenen efecte antitumoral. Primer de tot, vam determinar si hi havia relació entre l'efecte antitumoral que produeixen i la seva capacitat d'inhibir COX-2. Per això, vam analitzar l'efecte antitumoral in vitro del Celecoxib, Rofecoxib i Valdecoxib i el vam relacionar amb la seva potència i selectivitat d'inhibició de COX-2 (respecte COX-1). Aquests tres compostos són inhibidors molt potents i selectius de COX-2 però el rofecoxib i el valdecoxib són més selectius que el celecoxib.

Amb aquest objectiu, vam realitzar assajos de citotoxicitat per XTT a les 60h d'exposició dels tres compostos en quatre línies cel·lulars de carcinoma de còlon humà: TD20, HCA7, NC59 i HT29.

Dels tres compostos analitzats, el celecoxib fou el més efectiu com antitumoral en les quatre línies cel·lulars (**Figura 12**). El valdecoxib, malgrat tenir una capacitat similar d'inhibir l'enzim COX-2 que el celecoxib, només tenia efecte en les cèl·lules NC59. Finalment, el rofecoxib, malgrat ser més selectiu que el celecoxib, tenia menys efecte antitumoral in vitro en les quatre línies cel·lulars.

A partir de les corbes dosi-reposta vam calcular les IC_{50} per a cada compost (**Taula 4**) en les línies en les que eren efectius. En les línies HCA7 i TD20 el rofecoxib i el valdecoxib tenien molt poc o gens efecte amb una IC_{50} superior a $80\mu M$ mentre que el celecoxib era molt efectiu amb una IC_{50} de $33,78$ i $23,73\mu M$ respectivament. Les cèl·lules

HT29 eren més sensibles al celecoxib ($IC_{50} = 21,66\mu M$) que al rofecoxib ($IC_{50} = 41,88\mu M$) i eren molt poc sensibles al valdecoxib ($IC_{50} >80\mu M$). Finalment, les cèl·lules NC59 eren les més sensibles als tres compostos i tenien una IC_{50} de $27,15\mu M$ pel celecoxib, $39,49\mu M$ pel rofecoxib i de $50,34\mu M$ pel valdecoxib.

En conclusió, l'efecte antitumoral in vitro dels compostos estudiats no està relacionat amb la seva potència i selectivitat d'inhibició de COX-2.

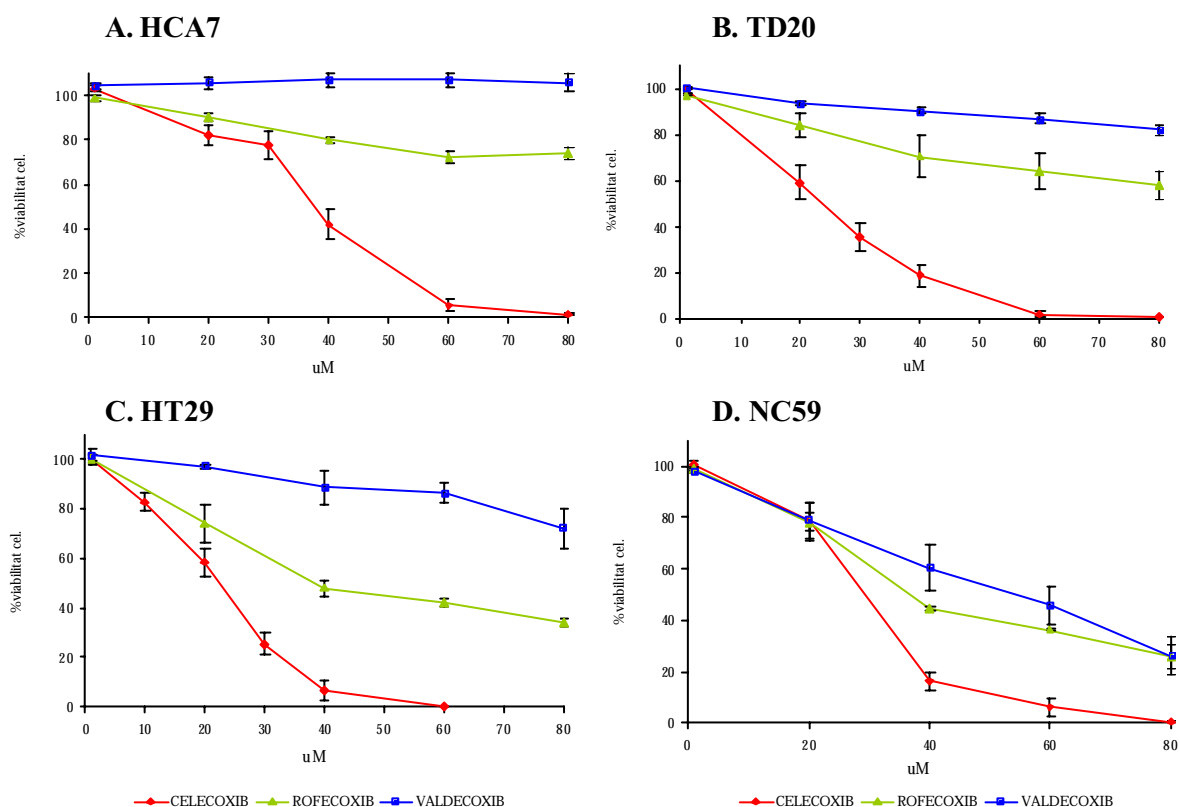


Figura 12. Corbes dosi-resposta de l'efecte antitumoral in vitro del Celecoxib, Rofecoxib i Valdecoxib en les línies cel·lulars HCA7(A), TD20 (B), HT29 (C) i NC59 (D) avaluat amb el mètode d'XTT.

Taula 4 . Efecte dels compostos inhibidors de COX-2 en cèl·lules de carcinoma de còlon

	CELECOXIB	ROFECOXIB	VALDECOXIB
HCA7	$33,78 \pm 2,01$	>80	>80
TD20	$23,73 \pm 2,23$	>80	>80
HT29	$21,66 \pm 1,59$	$41,88 \pm 5,32$	>80
NC59	$27,15 \pm 1,96$	$39,49 \pm 1,66$	$50,34 \pm 6,66$

Valors d' IC_{50} expressats com mitjana \pm error estàndard (μM)

1.2 Comparació entre el celecoxib i l'E6087, un nou compost inhibidor de COX-2

L'E6087 és un nou compost inhibidor de COX-2 sintetitzat pels laboratoris ESTEVE. La seva estructura química és similar a la del celecoxib però amb diferents substituents en l'anell fenil terminal (**Figura 13**). A més, l'E6087 té un doble enllaç menys que el celecoxib entre el carboni 4 i 5 de la pirazolina que fa que hi hagi un centre quiral en el carboni 5 i dóna més mobilitat conformacional a la molècula. Vam determinar la IC_{50} d'inhibició de COX-2 i COX-1 en sang humana total (Whole Blood Assay) i la vam comparar amb la del celecoxib. La IC_{50} d'inhibició de COX-2 de l'E6087 era de $2,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$ mentre que la del celecoxib era de $0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$. La IC_{50} d'inhibició de COX-1 era de $13,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ per l'E6087 i de $9,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$ pel celecoxib. Així, en calcular el quocient de la inhibició COX-1/COX-2 obteníem un valor de 6,3 per l'E6087 i de 16,5 pel celecoxib (**Taula 5**). Per tant, l'E6087 és també, com el celecoxib, un compost inhibidor de COX-2 potent i selectiu.

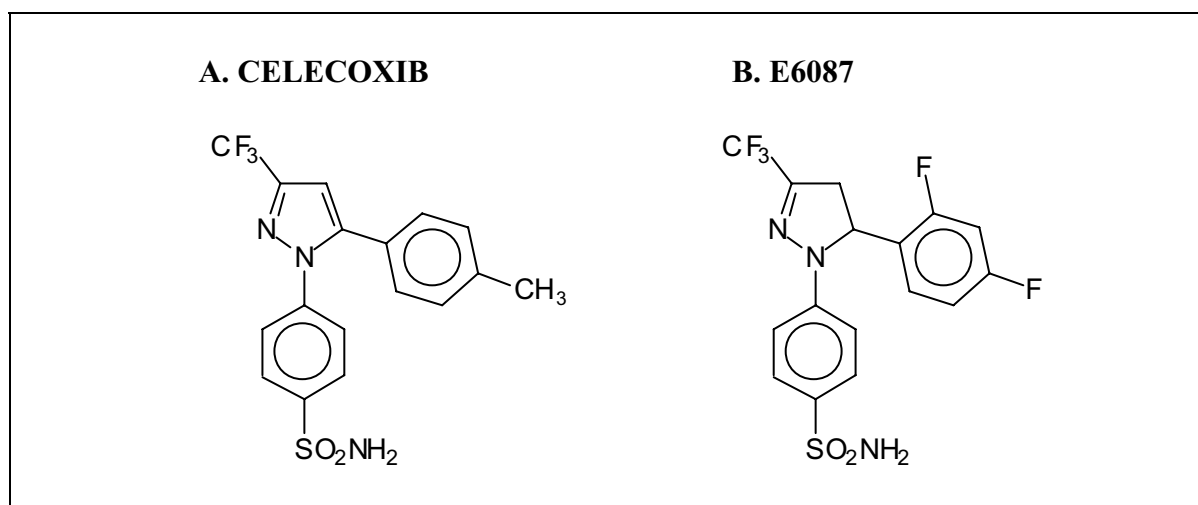


Figura 13. Estructura química del celecoxib (A) i l'E6087 (B)

1.3 L'E6232 i l'E6231 són els dos enantiòmers de l'E6087 i tenen diferent capacitat d'inhibir COX-2

Els enantiòmers són compostos que tenen la mateixa estructura química però divergeixen en l'orientació espacial dels seus àtoms, essent un la imatge especular de l'altre.

L'E0687 és un compost racèmic, és a dir, és una mescla de dos enantiòmers en igual proporció. Els dos enantiòmers que formen l'E6087 són l'E6232 i l'E6231. El fet de disposar d'aquests dos enantiòmers ens ha interessat especialment en aquest estudi perquè, d'una banda, l'E6232 és un inhibidor molt potent de COX-2 amb una IC_{50} d'inhibició de COX-2 (en sang humana total) de $2,4 \pm 0,7 \mu\text{M}$. D'altra banda, l'altre enantiòmer, l'E6231, no té capacitat d'inhibir COX-2 a concentracions inferiors a $40\mu\text{M}$ (**Taula 5**).

Taula 5. Capacitat d'inhibició de COX-1 i COX-2 del celecoxib, l'E6087 i els seus enantiòmers

	COX-1	COX-2	Quocient COX 1/2
Celecoxib	$9,9 \pm 0,6$	$0,6 \pm 0,2$	16,5
E6087	$13,3 \pm 1,2$	$2,1 \pm 0,4$	6,3
E6232	$3,1 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,7$	1,3
E6231	> 40	>40	-

Valors d' $IC_{50} \pm$ error estàndard (μM) obtinguts en sang humana total (Whole Blood Assay)

1.4 Comparació de l'efecte antitumoral in vitro del celecoxib, l'E6087, l'E6232 i l'E6231 en quatre línies cel·lulars de carcinoma de còlon humà

Per tal de determinar si l'E6087 era un compost efectiu com antitumoral, com el celecoxib, i si hi havia diferències entre l'efecte dels dos enantiòmers, l'E6232 i l'E6231, vam avaluar l'efecte antitumoral de tots quatre compostos. Per això, vam realitzar assajos de citotoxicitat per XTT a les 60 hores d'exposició en quatre línies cel·lulars de carcinoma de còlon humà (HCA7, TD20, HT29 i NC59) amb diferents nivells d'expressió de COX-2. Aquest fet ens va permetre analitzar alhora si hi havia alguna correlació entre els nivells d'expressió de COX-2 de les cèl·lules i la seva sensibilitat als compostos.

Tots quatre compostos tenien efecte antitumoral en les línies analitzades i presentaven poques diferències entre ells (**Figura 14**). A partir de les corbes dosi-resposta vam calcular el valor de la IC_{50} per cada compost en les quatre línies (**Taula 6**). Per tal de determinar si hi havia diferències estadísticament significatives entre els valors d' IC_{50} calculats, vam aplicar el test estadístic no paramètric d'anàlisi de la variança de Kruskal-Wallis comparant

l'efecte dels quatre fàrmacs en cada línia cel·lular. No hi havia diferències estadísticament significatives entre l'efecte dels quatre compostos en cada línia ($p > 0,05$). Per tant, els quatre compostos estudiats són igual d'efectius en les línies HCA7 ($p = 0,051$), TD20 ($p = 0,507$), HT29 ($p = 0,759$) i NC59 ($p = 0,093$). En conseqüència, independentment de la seva capacitat d'inhibir COX-2, tots els compostos tenen la mateixa capacitat antitumoral in vitro en cada línia cel·lular.

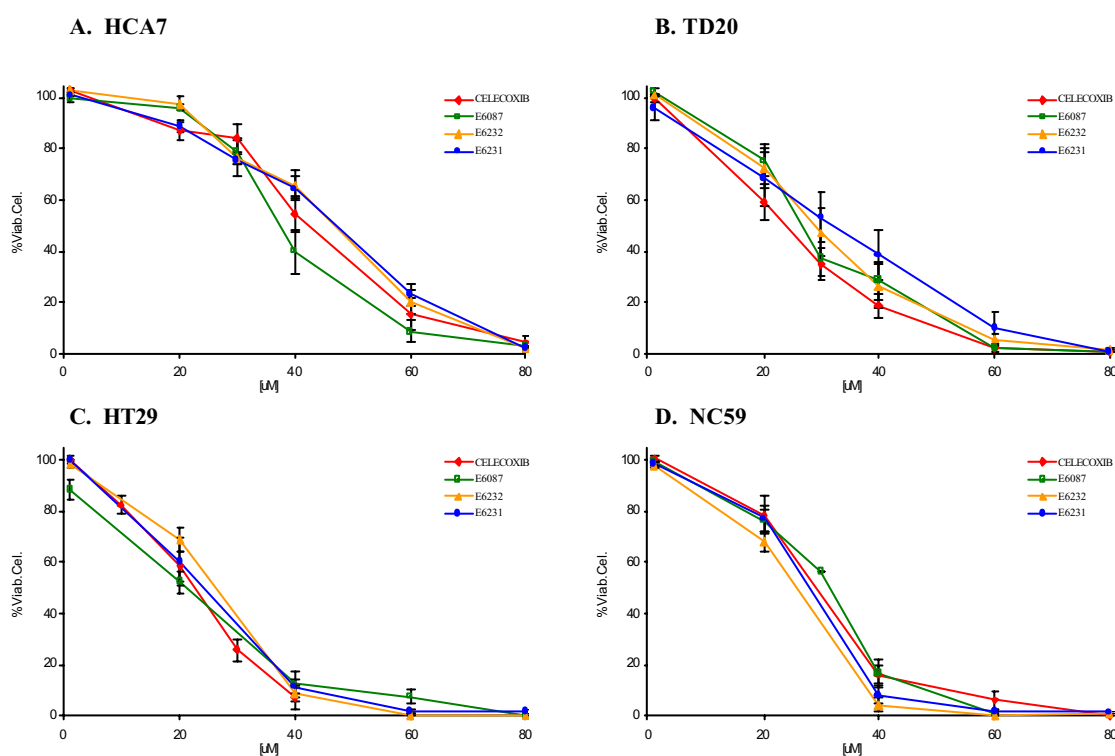


Figura 14. Corbes dosi-resposta de l'efecte antitumoral in vitro del celecoxib, E6087, E6232 i E6231 en quatre línies cel·lulars de còlon avaluat pel mètode d'XTT.

Taula 6. Efecte dels compostos inhibidors de COX-2 en cèl·lules de carcinoma de còlon

	HCA7	TD20	HT29	NC59
CELECOXIB	33,78 ± 2,42	23,73 ± 2,23	21,66 ± 1,59	27,15 ± 1,96
E6087	38,23 ± 2,00	31,71 ± 2,93	21,79 ± 1,86	28,50 ± 1,81
E6231	44,47 ± 1,55	29,94 ± 4,90	22,63 ± 2,31	25,47 ± 1,54
E6232	42,34 ± 3,56	28,90 ± 3,51	23,83 ± 0,93	22,62 ± 0,05

Valors d'IC₅₀ expressats com mitjana ± error estàndard (μM)

D'altra banda, també vam comparar la sensibilitat de les quatre línies cel·lulars a cada compost per tal de determinar si estava relacionada amb el nivell d'expressió de COX-2 de les cèl·lules. Les cèl·lules HCA7 són les que tenen major nivell d'expressió de COX-2 mentre que les NC59 tenen un nivell molt baix de COX-2. Les cèl·lules TD20 i HT29 tenen un nivell d'expressió de COX-2 intermig (**Figura 15**). Vam aplicar el test estadístic de Kruskal-Wallis comparant les IC_{50} de cada compost en les quatre línies i, en aquest cas, vam trobar diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$). Hi havia diferències en la sensibilitat de les línies al celecoxib ($p = 0,018$), al compost E6087 ($p = 0,014$), a l'E6232 ($p = 0,012$) i a l'E6231 ($p = 0,023$).

Per a determinar entre quines línies cel·lulars hi havia les diferències estadísticament significatives, vam comparar l'efecte de cadascun dels compostos per parelles de línies mitjançant el test estadístic no paramètric U de Mann-Whitney (**Taula 7**). La línia HCA7 era, en general, menys sensible als quatre compostos analitzats que les altres línies. Així, les cèl·lules HCA7 eren significativament menys sensibles que les línies TD20 i HT29 als compostos celecoxib i E6231 ($p < 0,05$). Les cèl·lules HCA7 també eren menys sensibles que les cèl·lules HT29 i NC59 al compost E6087 ($p < 0,05$) i menys sensibles que les cèl·lules TD20, HT29 i NC59 al compost E6232 ($p < 0,05$). Finalment, hi havia diferències estadísticament significatives entre línies en la sensibilitat al compost E6087 ($p < 0,05$), essent les cèl·lules TD20 menys sensibles que HT29 i les cèl·lules HT29 menys sensibles que NC59 (**Taula 7**). En resum, les cèl·lules HCA7 eren més resistents als inhibidors selectius de COX-2 estudiats però també eren més resistents al compost E6231 que no és un inhibidor selectiu de COX-2. A més, les cèl·lules HCA7 eren igual de sensibles que les NC59 al celecoxib, malgrat que ambdues línies tenen uns nivells d'expressió de COX-2 molt diferents. D'altra banda, hi havia poques diferències entre la sensibilitat de les altres tres línies (TD20, HT29 i NC59) als compostos malgrat que tenien uns nivells de COX-2 diferents. En conseqüència, no hem trobat cap correlació entre la sensibilitat de les línies cel·lulars estudiades als compostos i el seu nivell d'expressió de COX-2.

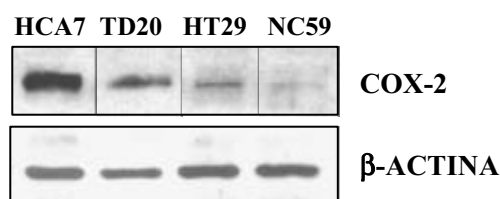


Figura 15. Nivells d'expressió de COX-2 de les línies cel·lulars de carcinoma de còlon. L'expressió de β -actina s'ha determinat com a control de la càrrega proteica.

Taula 7. Comparació de l'efecte de cadascun dels compostos analitzats en les quatre línies de carcinoma de còlon

A. CELECOXIB

	<i>TD20</i>	<i>HT29</i>	<i>NC59</i>
<i>HCA7</i>	p=0,016	p=0,011	n.s.
	<i>TD20</i>	n.s.	n.s.
		<i>HT29</i>	n.s.
			<i>NC59</i>

B.E6087

	<i>TD20</i>	<i>HT29</i>	<i>NC59</i>
<i>HCA7</i>	n.s.	p=0,004	p=0,010
	<i>TD20</i>	p=0,042	n.s.
		<i>HT29</i>	p=0,032
			<i>NC59</i>

C. E6232

	<i>TD20</i>	<i>HT29</i>	<i>NC59</i>
<i>HCA7</i>	p=0,013	p=0,024	p=0,024
	<i>TD20</i>	n.s.	n.s.
		<i>HT29</i>	n.s.
			<i>NC59</i>

D. E6231

	<i>TD20</i>	<i>HT29</i>	<i>NC59</i>
<i>HCA7</i>	p=0,016	p=0,024	n.s.
	<i>TD20</i>	n.s.	n.s.
		<i>HT29</i>	n.s.
			<i>NC59</i>

Valors de probabilitat (p) obtinguts de l'anàlisi estadístic U de Mann-Whitney comparant els valors d'IC₅₀ de cada compost (**A.** celecoxib, **B.** E6087, **C.** E6232, **D.** E6231) en les quatre línies cel·lulars. n.s. = No significatiu (p>0,05).

1.5 Les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió esdevenen resistents al celecoxib, l'E6087, l'E6232 i l'E6231

L'adquisició de capacitat per a créixer en suspensió és una de les característiques típiques de les cèl·lules tumorals. Havíem comprovat anteriorment que les línies utilitzades en aquest treball podien créixer en suspensió en cultivar-les en plaques recobertes amb polyHema.

Per tal de determinar si l'efecte del celecoxib, l'E6087 i els seus enantiòmers s'alterava en cultivar les cèl·lules en suspensió, vam realitzar assajos de citotoxicitat per XTT a les 60 hores d'exposició de les cèl·lules TD20 i HCA7 en plaques recobertes amb polyhema. Vam quantificar l'efecte antitumoral de tots quatre compostos i el vam comparar amb l'obtingut en les cèl·lules adherides. Les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió es tornaven molt menys sensibles a tots quatre compostos (celecoxib, E6087, E6232 i E6231) en comparació amb les cèl·lules en adhesió (**Figura 16**).

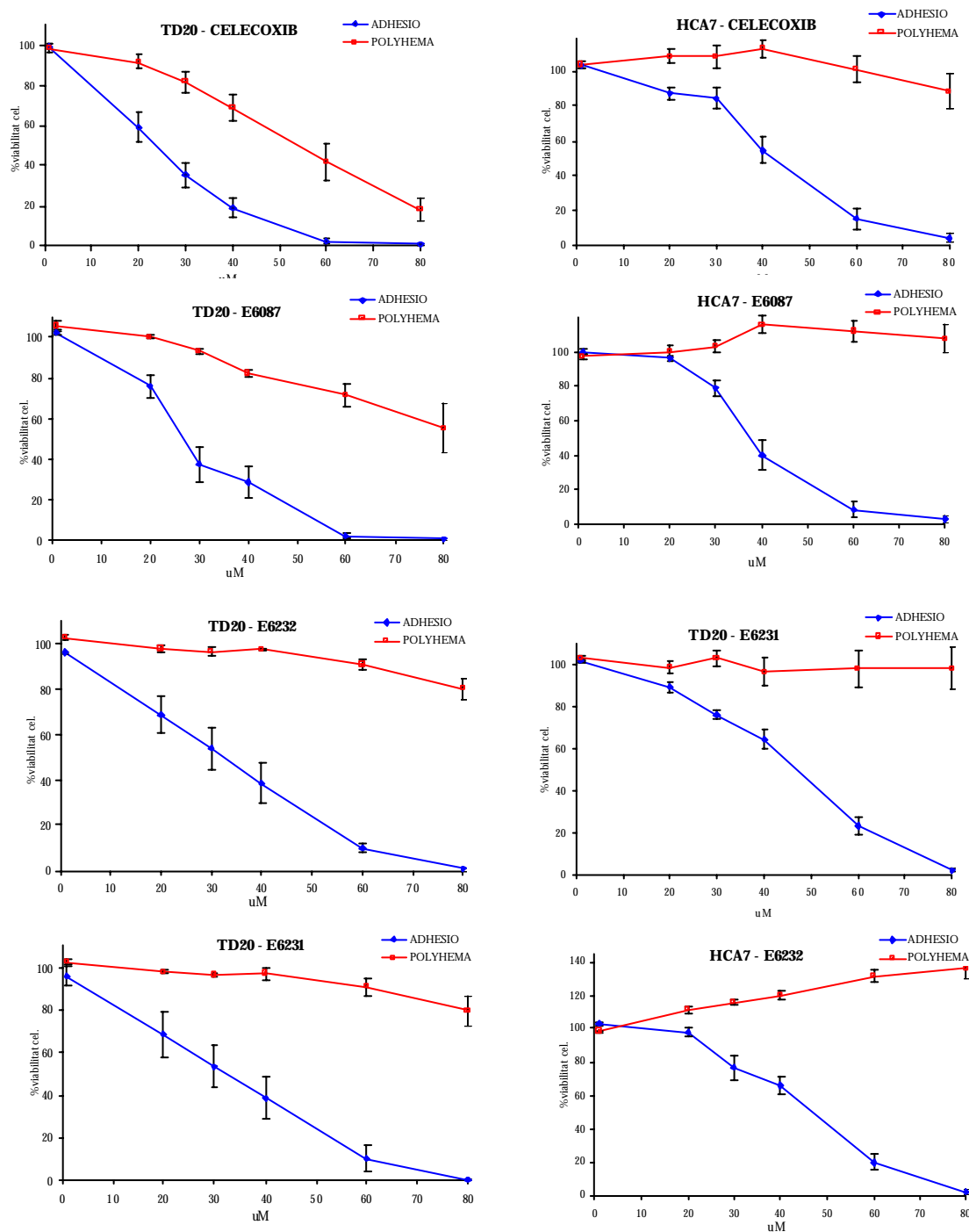


Figura 16. Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib, E6087, E6232 i E6231 en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió i en suspensió (polyHema) avaluat pel mètode d'XTT.

1.6 Les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió són sensibles a la Gemcitabina

Per tal de determinar si el fet de cultivar les cèl·lules TD20 i HCA7 en suspensió les feia resistents a d'altres tipus de compostos antitumorals no relacionats amb els inhibidors de COX-2 vam realitzar assajos de citotoxicitat per XTT a les 60 hores d'exposició en cèl·lules cultivades en adhesió i suspensió amb la Gemcitabina. Aquest fàrmac té un mecanisme d'acció diferent als inhibidors de COX-2 i actua interferint amb la síntesis de l'ADN. En aquest cas, el fàrmac tenia efecte antitumoral tant en adhesió com en suspensió en ambdues línies. L'efecte del fàrmac no presentava diferències entre les dues condicions de cultiu (**Figura 17**). Per tant, les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió són sensibles a d'altres tipus de compostos no relacionats amb els inhibidors de COX-2 com la Gemcitabina.

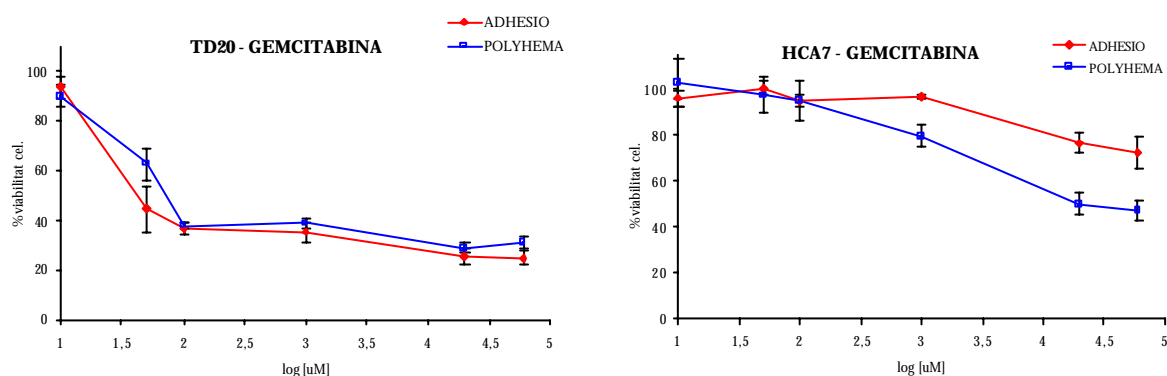


Figura 17. Corbes dosi-resposta de l'efecte de la Gemcitabina en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió i en suspensió avaluat amb el mètode d'XTT .

1.7 L'activitat i l'expressió de COX-2 no varien en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió o en suspensió

Amb l'objectiu d'explicar les diferències en la sensibilitat als compostos inhibidors de COX-2 de les cèl·lules cultivades en adhesió i en suspensió, vam determinar si l'activitat i els nivells d'expressió de COX-2 de les cèl·lules variaven segons si estaven adherides o en suspensió. Les cèl·lules HCA7 i TD20 no tenen nivells detectables de COX-1 (resultat no mostrat) per tant, vam considerar els nivells dels productes derivats de l'activitat COX com a indicador de l'activitat COX-2. Vam determinar el nivells d'expressió COX-2 mitjançant Western Blot d'extractes proteics de cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió i en suspensió. D'altra banda, vam quantificar la síntesi de productes de COX de les cèl·lules cultivades en les dues condicions mitjançant HPLC. En la **figura 18** es mostra un cromatograma control realitzat amb una estàndard (formada per una mescla de les diferents prostaglandines purificades) on es pot veure el temps de retenció dels diferents productes de COX. En realitzar aquests experiments vam veure que tant els nivells d'expressió de COX-2 com els dels productes de la seva activitat no variaven de forma rellevant en cultivar les cèl·lules adherides o en suspensió (**Figura 19**). Les cèl·lules HCA7, en adhesió i suspensió, tenien uns nivells de Prostaglandina E_2 (PGE_2) molt elevats així com també d'àcid 12-hidroxiheptadeca-5,8,10-trienoic (HHT); aquestes cèl·lules també sintetitzaven Tromboxà B_2 (TxB_2) i Prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) però en nivells més baixos. En les cèl·lules TD20 l'únic producte de COX detectable era la PGE_2 i els seus nivells no variaven entre adhesió i suspensió.

Per tant, el fet de cultivar les cèl·lules TD20 i HCA7 en adhesió o en suspensió no altera l'activitat ni els nivells d'expressió de COX-2.

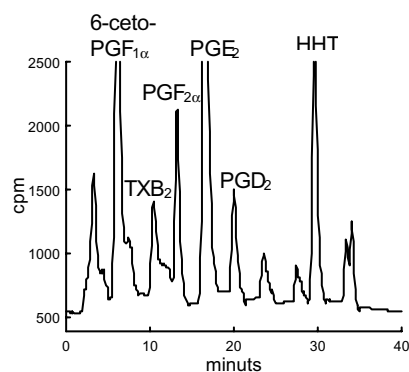


Figura 18. Cromatograma realitzat amb una mescla de prostaglandines purificades. Mostra els pics corresponents als temps de retenció dels principals productes de COX.

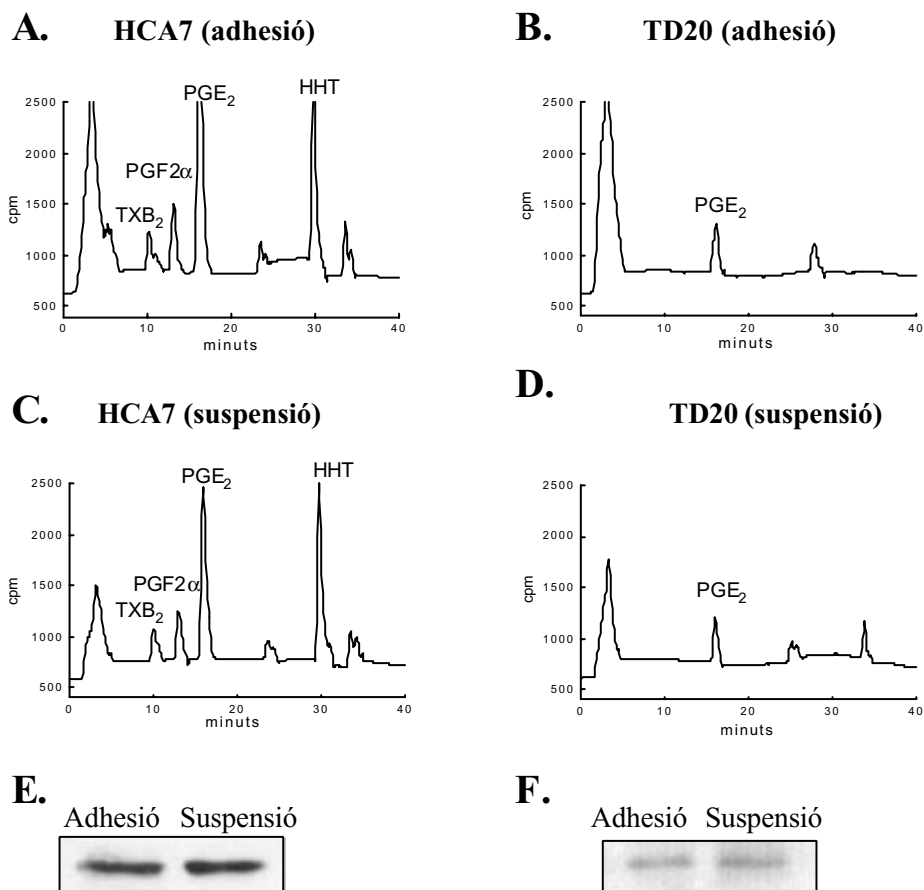


Figura 19. Comparació dels nivells dels productes de COX i d'expressió de COX-2 en les cèl·lules HCA7 i TD20 cultivades en adhesió i en suspensió. Cromatogrames de les cèl·lules HCA7 cultivades en adhesió (A) i en suspensió (C) i de TD20 en adhesió (B) i en suspensió (D). En ambdós casos, els nivells dels productes de COX detectats en cada línia són molt similars en adhesió i suspensió.

Western Blot de la proteïna COX-2 en cèl·lules HCA7 (E) i TD20 (F) cultivades en adhesió i en suspensió.

1.8 Inhibició de l'activitat COX en les cèl·lules HCA7 i TD20 tractades amb els inhibidors de COX-2

Fins ara, havíem comparat l'efecte antitumoral in vitro dels compostos amb la seva IC_{50} d'inhibició de COX-2 determinada en sang humana total. Aquest assaig ens indica la capacitat real d'inhibir COX-2 dels compostos, però no sabem, exactament, la capacitat d'inhibir COX-2 dels compostos en les línies cel·lulars amb què treballem en cultiu. Per aquest motiu, vam quantificar la inhibició de la síntesi dels productes de COX, com a indicador de la inhibició de l'activitat COX-2, mitjançant HPLC en cèl·lules TD20 (en adhesió) i HCA7 (en adhesió i polyhema) control i tractades amb celecoxib, E6087, E6232 i E6231.

Les cèl·lules TD20 tenien uns nivells molt baixos d'activitat COX, essent PGE_2 l'únic producte detectable (**Figura 19**) de manera que no va ser possible determinar les corbes dosi-resposta de la inhibició de COX-2 en aquesta línia ja que a baixes concentracions ja hi havia una inhibició total de PGE_2 . Per aquest motiu, en aquesta línia vam determinar la inhibició de COX-2 en tractar les cèl·lules adherides amb cadascun dels compostos (celecoxib, E6087, E6232 i E6231) a $0,1\mu M$. El celecoxib, l'E6087 i l'E6232 inhibien al 100% la síntesi de PGE_2 a aquesta concentració (**Figura 20**). D'altra banda, el compost E6231, que ja havíem vist en sang humana total que era un inhibidor poc potent de COX-2, no tenia efecte en els nivells de PGE_2 a $0,1\mu M$. Per obtenir una inhibició del 100% de PGE_2 calia tractar les cèl·lules amb una concentració de $100\mu M$ d'E6231.

En resum, a $0,1\mu M$ tots els compostos (celecoxib, E6087 i E6232) inhibien completament la síntesi de PGE_2 en les cèl·lules TD20 excepte l'E6231 que requeria una concentració de $100\mu M$.

D'altra banda, els productes de COX de les cèl·lules HCA7 eren molt elevats (**Figura 19**), per això vam poder determinar les corbes dosi-resposta de l'efecte dels diferents compostos en la síntesi d'aquests productes i calcular la IC_{50} d'inhibició de COX-2 tant per les cèl·lules cultivades en adhesió com en suspensió (**Taula 8**).

Tots els compostos, excepte l'E6231, tenien una IC_{50} menor a $0,1\mu M$ tant en adhesió com en suspensió. En cap dels compostos hi havia diferències estadísticament significatives ($p > 0,05$) entre les mitjanes dels valors d' IC_{50} obtinguts en adhesió i en suspensió. Així, el fet que les cèl·lules estiguin cultivades en adhesió o en suspensió no

altera la inhibició de l'activitat COX-2 per part dels compostos. Per tant, la inhibició de l'activitat COX-2 no està relacionada amb l'efecte antitumoral d'aquests compostos ja que:

1. En tractar les cèl·lules en suspensió amb els diferents compostos, s'inhibeix l'activitat COX-2 en el mateix nivell que en les cèl·lules adherides però, en canvi, l'efecte antitumoral (XTT) és molt menor.
2. El compost E6231, malgrat que no inhibeix COX-2, té el mateix efecte antitumoral en les cèl·lules adherides (TD20 i HCA7) que l'E6232, l'E6087 i el celecoxib.

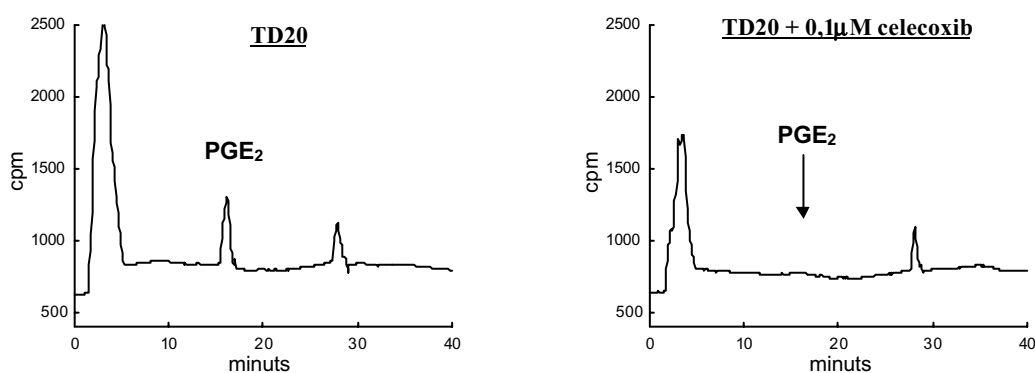


Figura 20. Nivells de PGE₂ en les cèl·lules TD20 control (A) i tractades amb 0,1 μM de celecoxib (B). El celecoxib a 0,1 μM inhibeix completament la síntesi de PGE₂ ; amb els compostos E6087 i E6232 vam obtenir el mateix resultat.

Taula 8. Inhibició de l'activitat de COX-2 dels compostos inhibidors de COX-2 en les cèl·lules HCA7 cultivades en adhesió i en suspensió

	CELECOXIB	E6087	E6232	E6231
ADHESIÓ	0,048 ± 0,025	0,059 ± 0,021	0,011 ± 0,007	90 ± 6,2
POLYHEMA	0,065 ± 0,042	0,0395 ± 0,0015	0,055 ± 0,028	49,8 ± 0,7

Valors expressats com mitjana de la IC₅₀ ± error estàndard (μM). L'activitat de COX-2 s'ha mesurat com a nivell de la síntesi dels productes de COX. No hi ha diferències estadísticament significatives entre els valors obtinguts en les cèl·lules cultivades en adhesió i en suspensió (p>0,05).

2. MECANISME D'ACCIÓ DEL CELECOXIB IN VITRO EN CÈL·LULES DE CARCINOMA DE CÒLON

2.1 El celecoxib indueix apoptosi en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió

Els fàrmacs antitumorals poden exercir el seu efecte a través de diferents mecanismes: inducció d'apoptosi i aturada del cicle cel·lular, entre d'altres. Amb l'objectiu de caracteritzar el mecanisme d'acció del celecoxib in vitro, vam determinar si induïa apoptosi en les cèl·lules de carcinoma de còlon. Per això, vam realitzar el test d'apoptosi per tinció nuclear amb Hoescht en les línies cel·lulars TD20 i HCA7. Les cèl·lules apoptòtiques són fàcilment diferenciables doncs es caracteritzen per presentar la cromatina condensada i l'ADN fragmentat.

Vam exposar les cèl·lules TD20 i HCA7 durant diferents intervals de temps (24h, 48h, 72h i 96h) a una concentració de 60 µM de celecoxib o vehicle (DMSO). Vam utilitzar la concentració de 60µM perquè produeix, en els assajos de citotoxicitat, un 100% d'inhibició de la viabilitat cel·lular. En ambdues línies cel·lulars vam observar ja a les 24 hores de tractament l'aparició de nuclis apoptòtics (**Figura 21**). A mesura que augmentava el temps d'exposició al celecoxib el percentatge de nuclis apoptòtics era major. En les cèl·lules tractades amb vehicle (DMSO) hi havia un percentatge de cèl·lules apoptòtiques inferior a l'1%. Per tant, l'efecte antitumoral in vitro del celecoxib és causat, al menys en part, per la inducció d'apoptosi en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió (**Figura 21**).

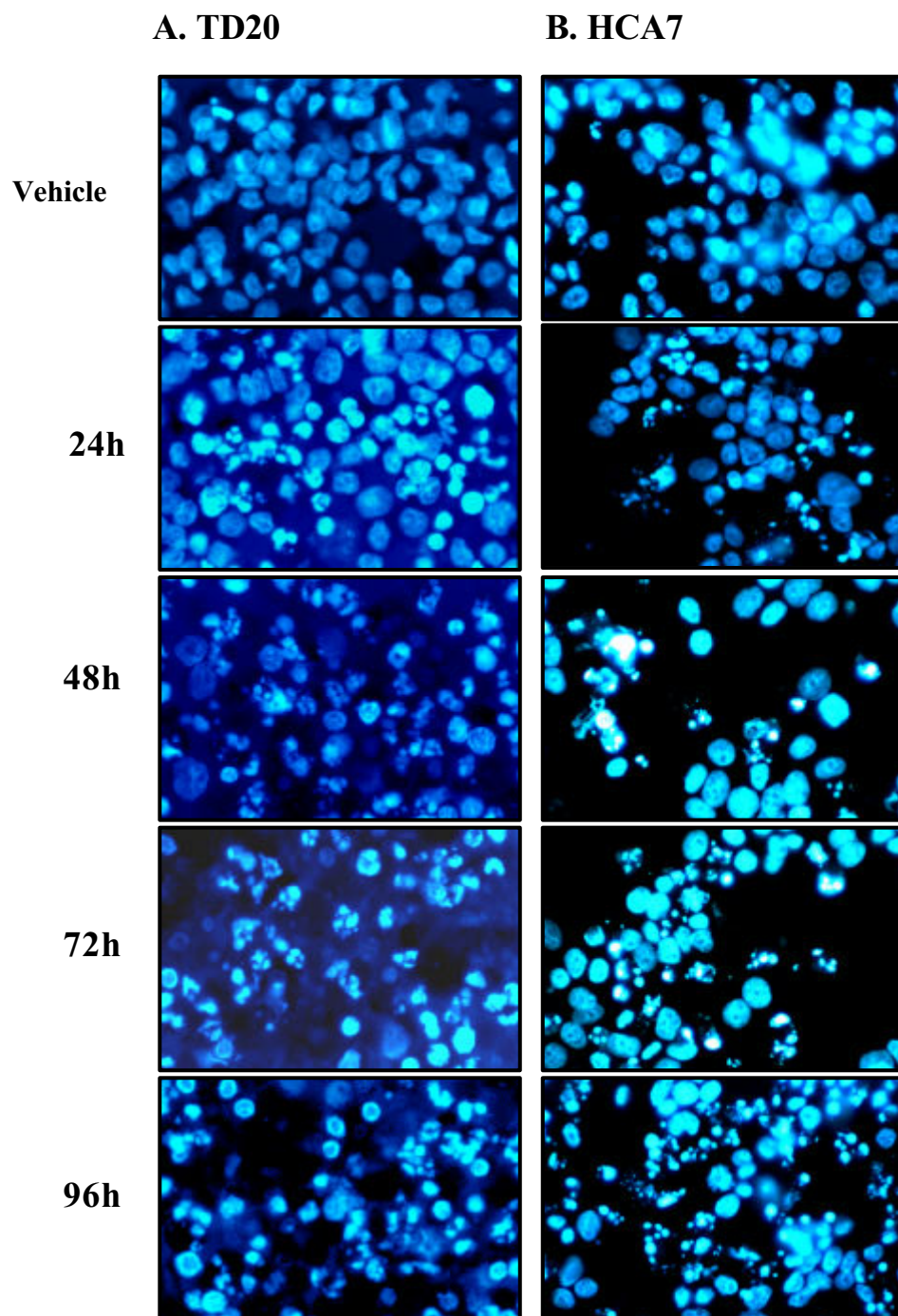


Figura 21. Inducció d'apoptosi en les línies cel·lulars TD20 (A) i HCA7 (B) després del tractament amb vehicle o 60 μ M de celecoxib durant diferents intervals de temps (24h, 48h, 72h i 96h).
Microscopia de fluorescència, filtre DAPI (400X)

2.2 La inducció d'apoptosi per celecoxib és dependent de l'activació de les caspases

L'apoptosi és un procés de mort programada que pot ser induït per diversos estímuls. Les caspases tenen una importància central en l'apoptosi i són activades gairebé sempre durant aquest procés de mort cel·lular. Per tal de determinar si la inducció d'apoptosi produïda pel celecoxib era dependent de l'activació de les caspases vam determinar si el seu efecte podia ser revertit per un inhibidor de les caspases. Vam realitzar assajos de citotoxicitat per XTT tractant prèviament les cèl·lules TD20 (durant 1 hora) amb diferents concentracions del compost zVADfmk (1 μ M, 5 μ M i 10 μ M), un inhibidor de caspases.

En tractar amb l'inhibidor, les cèl·lules es tornaven menys sensibles al celecoxib i aquest efecte era dosi-dependent, és a dir que, com més alta era la concentració de zVADfmk menor era l'efecte antitumoral que produïa el celecoxib (**Figura 22**).

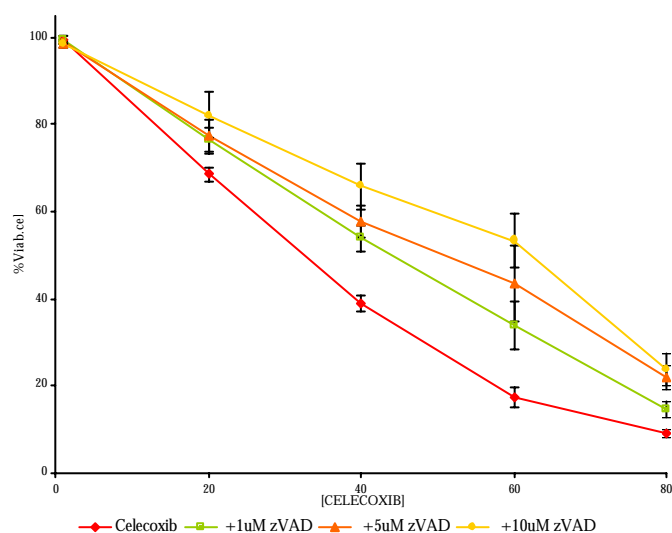


Figura 22. Efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 amb i sense preincubació amb 1 μ M, 5 μ M i 10 μ M de l'inhibidor de caspases zVADfmk.

Vam comparar els valors d' IC_{50} del celecoxib amb i sense preincubació de zVADfmk (test U de Mann-Whitney) per a determinar si hi havia diferències estadísticament significatives. A mesura que augmentava la concentració de zVADfmk, la IC_{50} del celecoxib era major i les diferències eren estadísticament significatives (**Taula 9**).

Taula 9. Efecte del celecoxib amb i sense pretractament amb zVADfmk en TD20

CELECOXIB	+ 1µM zVADfmk	+ 5µM zVADfmk	+10µM zVADfmk
30.38 ± 1.23	41.49 ± 4.72	47.60 ± 5.19	57.61 ± 7.37
<i>p</i> *	0.043	0.021	0.021

Valors d'IC₅₀ expressats com mitjana ± error estàndard (µM)

Test U de Mann-Whitney comparant la IC₅₀ del celecoxib amb i sense zVADfmk

2.3 El celecoxib indueix l'activació de Caspases i la proteolisi de PARP en les cèl·lules TD20 i HCA7

Fins ara, havíem determinat que el celecoxib induïa apoptosi i que aquesta era dependent de les caspases. Per tal de caracteritzar quines caspases eren les responsables de la inducció d'apoptosi pel celecoxib, vam determinar els nivells d'expressió, de proteolisi i activació de diferents tipus de caspases. Per això, vam realitzar extractes proteics de cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió després de tractar durant diferents intervals de temps amb 60µM celecoxib (24h, 48h, 72h i 96h) o vehicle (DMSO). Vam determinar el nivell d'activació de les caspases 8 i 9 (caspases iniciadores), de les caspases 3 i 7 (caspases executores) i d'hidròlisi de PARP, un substrat de les caspases que és proteolitzat durant l'apoptosi.

En les cèl·lules TD20 i HCA7 (**Figura 23A, 23B**), a les 24 h de tractament amb celecoxib, hi havia activació de caspasa-9, causada per la proteolisi de la procaspasa-9 (47Kda) en les dues subunitats de la caspasa-9 activa de 37/35Kda. D'altra banda, en cap de les dues línies cel·lulars, vam veure activació de caspasa-8 malgrat que a partir de les 72h s'observava una lleugera reducció en els nivells de procaspasa-8 (50-55KDa) però sense que es detectessin les bandes corresponents a les subunitats de caspasa-8 activa. En la línia TD20 s'activaven les dues caspases executores (3 i 7) detectant-se les bandes de caspasa-3 i 7 actives a partir de les 24h. En les cèl·lules HCA7 també hi havia activació de la caspasa-7 a les 24h de tractament però no vam poder detectar l'activació de la caspasa-3 malgrat que els nivells de procaspasa-3 disminuïen al llarg del temps. Finalment, en les cèl·lules TD20 hi havia proteolisi de PARP a les 24h de tractament amb celecoxib mentre que en HCA7 l'expressió de PARP disminuïa a les 72h tot i que no vam poder detectar proteolisi.

En resum, el celecoxib indueix apoptosi en les cèl·lules TD20 i HCA7 a través de l'activació de la caspasa-9 (caspasa iniciadora), l'activació de les capasses executores 3, 7 i, finalment, la proteolisi de PARP.

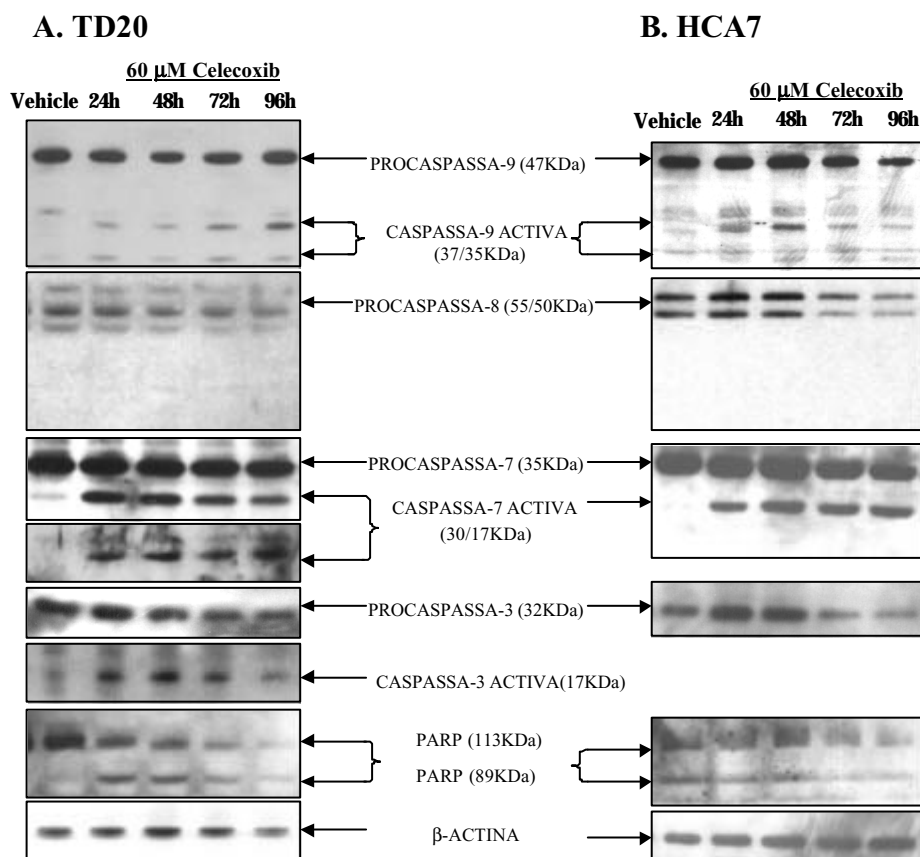


Figura 23. Nivells d'expressió i/ activació de les caspases activadores 8 i 9, de les caspases executores 3 i 7 i de proteolisi de PARP en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) tractades amb vehicle o 60μM celecoxib durant diferents intervals de temps. Els nivells d'expressió de β-actina s'han determinat com a control de la càrrega proteica total.

2.4 El celecoxib indueix la sortida de citocrom c de la mitocòndria

L'activació de la procaspasa-9 es dona en un complex proteic citosòlic anomenat apoptosoma format per la proteïna Apaf-1, citocrom c i dATP/ATP. El citocrom c es troba normalment dins la mitocòndria; per tant, la formació de l'apoptosoma i posterior activació de la procaspasa-9 requereix l'alliberament del citocrom c de la mitocòndria. Com que havíem observat que el celecoxib induïa l'activació de la procaspasa-9 en les cèl·lules TD20 i HCA7, vam analitzar si induïa també l'alliberament de citocrom c de la

mitocòndria. Per això, vam fer un extracte proteic de la fracció citosòlica de les cèl·lules TD20 i HCA7 tractades durant 15h i 24h amb 60 μ M de celecoxib o vehicle (DMSO). Per Western Blot, vam determinar els nivells de citocrom c al citosol en les cèl·lules control i tractades amb 60 μ M celecoxib. El tractament amb celecoxib augmentava els nivells de citocrom c al citosol en ambdues línies cel·lulars (**Figura 24**). Mentre que a les cèl·lules tractades amb vehicle hi havia nivells molts baixos de citocrom c a la fracció citosòlica, a les 15h hores de tractament amb celecoxib es detectava citocrom c al citosol i els nivells augmentaven a les 24h. Per tant, el tractament amb el celecoxib indueix apoptosi de manera caspasa dependent a través de la via mitocondrial amb l'alliberament del citocrom c que conduirà a l'activació de la procaspasa-9 que posteriorment activarà les caspases executores 3 i 7.

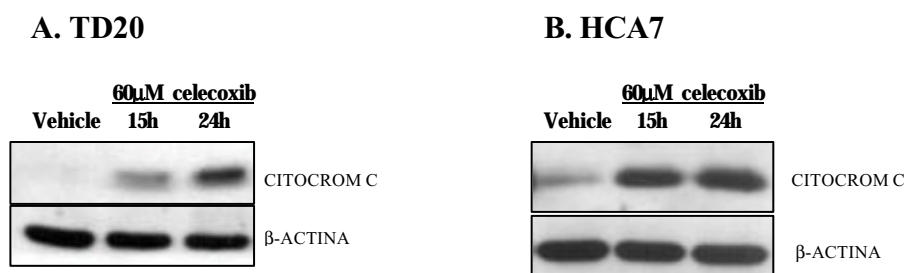


Figura 24. Nivells de citocrom c en la fracció citosòlica en cèl·lules TD20(A) i HCA7 (B) tractades amb 60 μ M celecoxib (15h i 24h) o vehicle. Els nivells d'expressió de β -actina s'han determinat com a control de la càrrega proteica total.

2.5 Regulació de les proteïnes de la família de Bcl-2 pel celecoxib

La sortida de citocrom c de la mitocòndria està principalment regulada per la família de proteïnes de Bcl-2. Aquestes proteïnes regulen la formació de porus en la membrana mitocondrial inhibint o induint la sortida de citocrom c. Dins la família de Bcl-2 hi ha proteïnes antiapoptòtiques (ex: Bcl-2, Bcl-X) i proapoptòtiques (ex: Bax, Bad, Bak). Per tal d'avaluar el paper d'aquesta família de proteïnes en l'efecte del celecoxib vam determinar l'expressió d'alguns dels membres més relacionats en la bibliografia amb l'efecte de fàrmacs antitumorals (Bax, Bcl-2 i Bad) en les cèl·lules TD20 i HCA7 tractades amb celecoxib.

L'expressió de la proteïna proapoptòtica Bad no augmentava amb el tractament amb celecoxib; contràriament, a temps llargs disminuïa lleugerament. A més a més, la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 disminuïa també a temps llargs de tractament (72-96h) (**Figura 25**). El fet de que aquests canvis d'expressió es donessin a temps llargs, després de que l'exposició al compost hagués produït l'apoptosi (24-48h) indica que els canvis en Bad i Bcl-2 poden ser una conseqüència del procés apoptòtic essent improbable que participin en la generació d'aquest procés. Com que la proteïna Bad es regula també per fosforilació, vam voler determinar per Western Blot si el celecoxib regulava aquesta fosforilació. No vam poder detectar Bad fosforilat en cap dels extractes realitzats, no podent confirmar si és degut a que no hi ha fosforilació de Bad en les cèl·lules o a que els anticossos disponibles no tenien prou afinitat pels corresponents epítops.

Contràriament a les observacions amb Bad i Bcl-2, el tractament amb celecoxib induïa un augment de l'expressió de Bax en les dues línies cel·lulars a temps curts (24h). Aquest és l'únic canvi observat a temps curts que podria, per tant, participar en la generació del procés d'apoptosi a través de la inducció de la sortida del citocrom c de la mitocòndria i la posterior activació de caspasa-9. Malgrat això, cal encara estudiar més a fons aquesta família de proteïnes doncs no només es regulen per canvis d'expressió sinó també per la formació de dímers i canvis de localització.

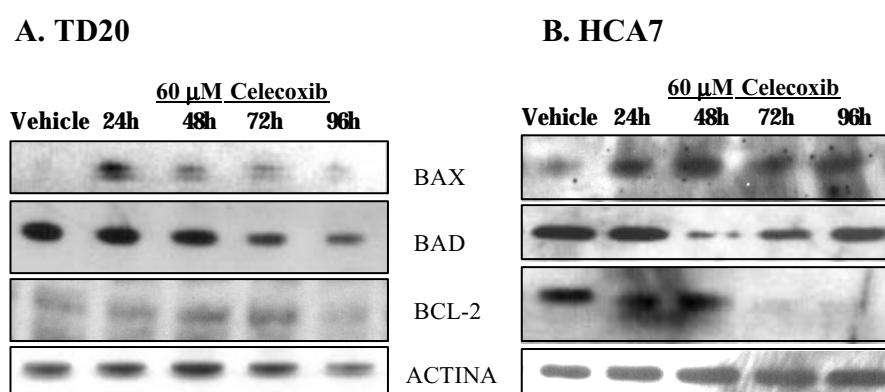


Figura 25. Nivells d'expressió de proteïnes de la família de Bcl-2 en les cèl·lules TD20 (**A**) i HCA7 (**B**) tractades amb vehicle o 60μM celecoxib durant diferents intervals de temps. El nivells de β-actina s'han determinat com a control de càrrega proteica total.

2.6 Efecte del celecoxib en el cycle cel·lular

El celecoxib indueix apoptosi en les cèl·lules TD20 i HCA7. Això però no exclou que el celecoxib pugui també tenir efecte a nivell del cycle cel·lular. Per tal d'analitzar-ho, vam determinar els nivells d'expressió de les principals ciclines que regulen el cycle: ciclina D3, ciclina E, ciclina A i ciclina B1. Vam determinar també l'expressió de p21, un inhibidor dels complexos CDK/ciclina que regulen el cycle cel·lular i de PCNA.

En les cèl·lules TD20 hi havia una forta disminució de ciclina E, A i B1 a partir de les 48h de tractament amb celecoxib. Els nivells de ciclina D3 i de p21 disminuïen ja a les 24h.

En les cèl·lules HCA7 l'efecte en les ciclines es donava més tard, havent-hi una disminució de ciclina D3, E, A i B1 a les 72h i els nivells de p21 augmentaven a les 24h però tornaven a disminuir a les 72h. En ambdues línies, els nivells de PCNA només disminuïen lleugerament a partir de les 72-96h. (**Figura 26**).

Per tant, malgrat que hi ha una disminució dels nivells de ciclines, aquesta es dona majoritàriament després de la inducció d'apoptosi el que suggereix que l'aturada del cycle no seria el mecanisme d'acció principal del celecoxib.

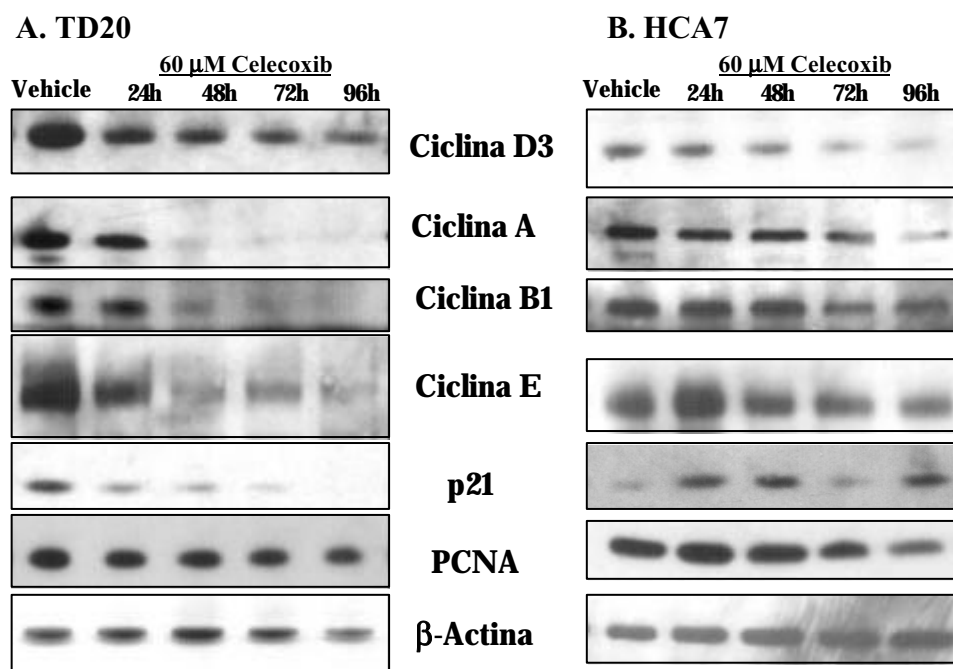


Figura 26. Nivells d'expressió de les ciclines D3, E, A i B1, de PCNA i de l'inhibidor de cycle p21 en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) cultivades en adhesió tractades amb 60μM celecoxib o vehicle (DMSO) durant diferents intervals de temps. Els nivells d'expressió de β-actina s'han determinat com a control de la càrrega proteica total.

3. EFECTE DEL CELECOXIB EN L'ANCORATGE CEL·LULAR

3.1 El celecoxib indueix la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules

Malgrat que una de les característiques de l'apoptosi en la seva fase d'execució és la disminució de l'adhesió cel·lular i dels contactes intercel·lulars; hi ha un tipus particular d'apoptosi que és conseqüència de la pèrdua d'ancoratge a la matriu extracel·lular en el que aquesta pèrdua passa abans de que s'enregistrin els signes de l'apoptosi. En realitzar els tests d'apoptosi vam observar que les cèl·lules es desenganxaven ràpidament de la placa però no entraven en apoptosi fins unes hores més tard, quan observàvem condensació i fragmentació de la cromatina. Per tal de valorar aquesta observació, vam quantificar el percentatge de cèl·lules que estaven en suspensió a les 15 hores d'exposició a 60µM i 80µM de celecoxib. Aquest anàlisi el vam realitzar a les 15h de tractament doncs volíem veure què passava a les cèl·lules abans d'entrar en apoptosi, procés que ja havíem determinat que succeïa a partir de les 24h.

En fer aquest experiment, vam observar que augmentava considerablement el nombre de cèl·lules en suspensió en tractar amb celecoxib, especialment en les cèl·lules TD20. Aquest percentatge era del 55,32% en tractar amb 60µM i del 72,72% en tractar amb 80µM de celecoxib durant 15h mentre que en les cèl·lules tractades amb vehicle (DMSO) era només de l'11,83 %. En les cèl·lules HCA7 el percentatge de cèl·lules en suspensió augmentava menys, així, mentre que les cèl·lules tractades amb vehicle tenien un 14,70 % de cèl·lules en suspensió, en tractar amb 60µM i 80µM de celecoxib el percentatge augmentava a 33,66 i 38,87 % respectivament (**Figura 27**). Aquest fet correlacionaria amb l'observació que les cèl·lules HCA7 creixen més adherides a la placa i tenen uns nivells de fosforilació de Fak i Src majors que TD20.

En conclusió, el celecoxib indueix una ràpida pèrdua d'ancoratge a la placa en les cèl·lules TD20 i HCA7 abans de que aquestes entrin en apoptosi.

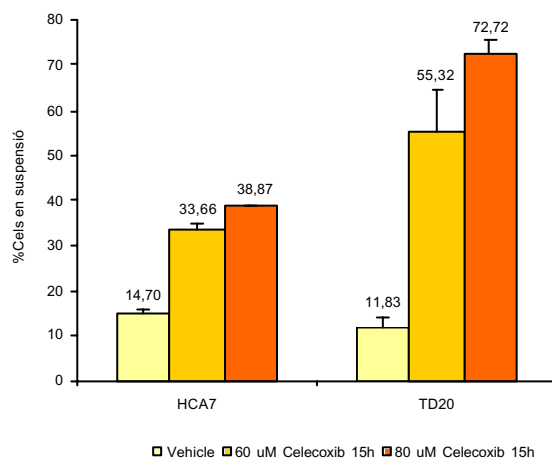


Figura 27. Percentatge de cèl·lules en suspensió en tractar les cèl·lules TD20 i HCA7 durant 15h amb 60µM i 80µM de celecoxib.

3.2 Efecte del celecoxib en les proteïnes implicades en les adhesions focals

Vam analitzar els nivells d'expressió i/o activació de diferents proteïnes implicades en les adhesions focals. Volíem determinar, a nivell molecular, si l'alteració en proteïnes implicades en l'adhesió cel·lular podia explicar la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules i la inducció d'apoptosi produïda pel tractament amb celecoxib.

Vam analitzar, mitjançant Western Blot, els nivells d'expressió i/o activació per fosforilació de les principals proteïnes que formen els contactes focals en les cèl·lules TD20 i HCA7 tractades amb celecoxib durant diferents intervals de temps. Vam determinar l'expressió de p130Cas i la seva activació per fosforilació en Tyr410, l'expressió de les quinasses Fak i Src, i la seva activació per fosforilació en Tyr397 (FAK) i Tyr418 (Src) i els nivells d'expressió de la quinassa ILK.

D'altra banda, vam determinar també el nivell d'expressió i fosforilació d'Akt (Thr308), de fosforilació d'Erk1/2 i d'expressió de Rac-1 ja que són proteïnes que transdueixen els senyals downstream de les adhesions focals.

En ambdues línies cel·lulars, hi havia una ràpida disminució dels nivells de p130Cas que ja era molt marcada a les 24h de tractament. D'altra banda, la fosforilació de p130Cas (Tyr410) era completament inhibida a les 24h de tractament amb celecoxib en TD20. En HCA7 no vam poder detectar fosforilació en p130Cas. L'expressió i fosforilació de FAK (Tyr397) també disminuïa en tractar les cèl·lules amb celecoxib en ambdues línies cel·lulars. Aquesta disminució però, es produïa a temps més llargs que p130Cas. Els nivells

d'expressió de Src no s'alteraven al llarg del tractament. En les cèl·lules TD20 vam observar la defosforilació d'aquesta quinassa a les 24h de tractament amb celecoxib. En les cèl·lules HCA7, malgrat tenir uns nivells més elevats de fosforilació de Src, no hi havia canvis en la fosforilació d'aquesta proteïna. L'expressió d'ILK disminuïa lleugerament a partir de les 72h en ambdues línies (**Figura 28**).

D'altra banda, l'activació i l'expressió d'Akt disminuïa a partir de les 72h en ambdues línies cel·lulars, i la fosforilació d'erk1 disminuïa a les 24h en les cèl·lules TD20 mentre que en HCA7 ho feia a les 48h. L'expressió de Rac-1 disminuïa ja a les 24h de tractament especialment en les cèl·lules TD20 en les que no es detectava a partir de les 72h (**Figura 28**).

En conclusió, de totes les proteïnes que vam analitzar, les que tenen alteracions més importants i temperanes són p130Cas i Rac-1 en ambdues línies cel·lulars i Src i erk1, en TD20. FAK també es defosforilava en ambdues línies però una mica més tard.

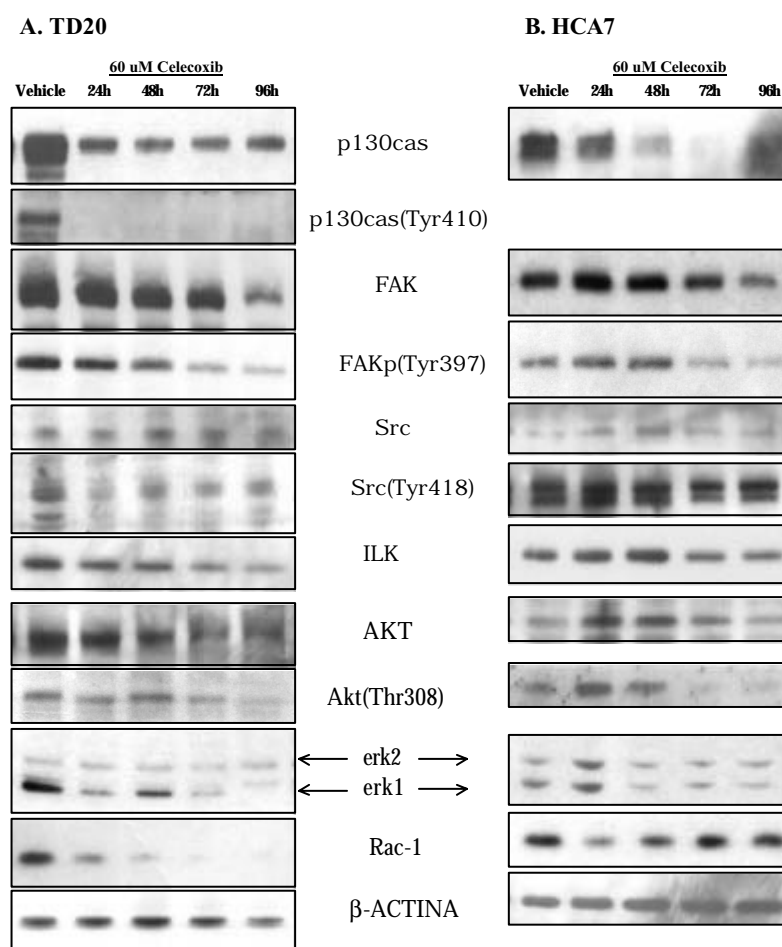


Figura 28. Nivells d'expressió i/o fosforilació de proteïnes implicades en les adhesions focals en les cèl·lules TD20 (**A**) i HCA7 (**B**) tractades amb 60µM de celecoxib o vehicle (DMSO) durant diferents intervals de temps. Els nivells de β-actina s'han determinat com a control de la càrrega proteica.

3.3 Efecte del celecoxib en les proteïnes implicades en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula

D'altra banda, vam determinar també el nivell d'expressió de β -catenina i E-cadherina, les proteïnes que formen les unions cèl·lula-cèl·lula, interaccionen amb el citoesquelet d'actina i participen en la determinació de l'arquitectura del teixit.

En ambdues línies cel·lulars, la β -catenina i E-cadherina disminueixen lleugerament al final del tractament (72h i 96h) (**Figura 29**). Com que aquesta disminució es donava a temps llargs és probablement conseqüència de la proteolisi generalitzada que hi ha durant l'apoptosi essent improbable que tinguin un paper causal en la generació d'aquest procés.

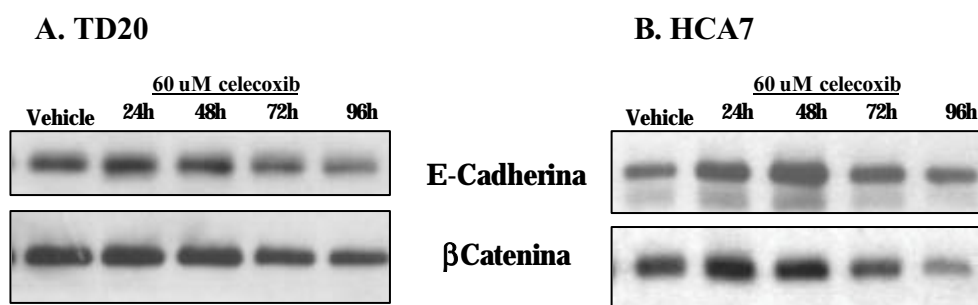


Figura 29. Nivells d'expressió de les proteïnes implicades en les unions cèl·lula-cèl·lula en TD20 (A) i HCA7 (B) tractades amb 60 μ M de celecoxib o vehicle (DMSO) durant diferents intervals de temps.

3.4 Efecte de l'inhibidor de la via PI3K/Akt Wortmannin en les cèl·lules TD20 i HCA7

La via PI3K/Akt juga un paper central en la transducció de senyal antiapoptòtica i la seva inactivació ha estat implicada en nombroses ocasions en inducció d'apoptosi per fàrmacs antitumorals. Per aquest motiu, vam pensar que era rellevant determinar si la inhibició d'aquesta via, utilitzant un inhibidor de la PI3K, Wortmannin, variava en alguna mesura l'activitat antitumoral del celecoxib.

Vam fer doncs assajos de citotoxicitat per XTT per celecoxib amb i sense preincubació amb 0,1 μ M i 0,5 μ M Wortmannin durant 1 hora. Aquest compost no va tenir cap efecte significatiu en les cèl·lules control ni tampoc va variar la seva sensibilitat al celecoxib ni en la línia TD20 ni en l'HCA7 (**Figura 30**).

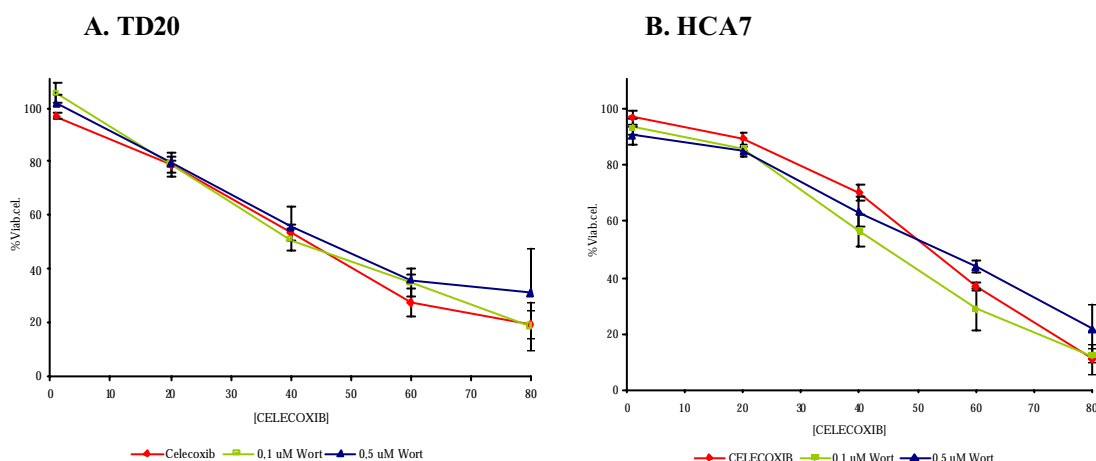


Figura 30. Efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) amb i sense preincubació amb 0,1 μM i 0,5 μM Wortmannin.

3.5 Efecte de l'inhibidor de Src, PP2, en les cèl·lules TD20 i HCA7

Per estudiar el paper de les adhesions focals en l'efecte del Celecoxib vam utilitzar inhibidors específics de les proteïnes implicades en els contactes focals. En aquests moments, els únics inhibidors específics de les proteïnes dels contactes focals disponibles comercialment són els inhibidors de la família de Src. Vam utilitzar l'inhibidor PP2 doncs és un dels més específics per aquesta proteïna.

El tractament amb PP2 produïa diferent efecte en ambdues línies cel·lulars. En les cèl·lules TD20, la inhibició de Src no afectava gaire la viabilitat cel·lular. El tractament amb 10 μM de PP2 no disminuïa la viabilitat cel·lular; amb una concentració de 30 μM la viabilitat era encara d'un 89.3%. Les cèl·lules HCA7 eren molt més sensibles a la inhibició de Src. El tractament amb 10 μM i 30 μM PP2 reduïa la viabilitat cel·lular al 41.1% i 17.7% respectivament (**Figura 31**). Per tant, les cèl·lules HCA7 requereixen l'activació de Src per a la seva supervivència mentre que en les TD20 la senyalització a través de Src no seria tan important.

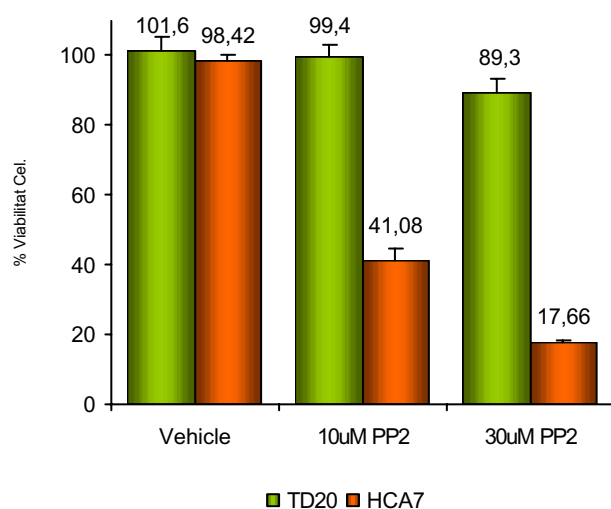
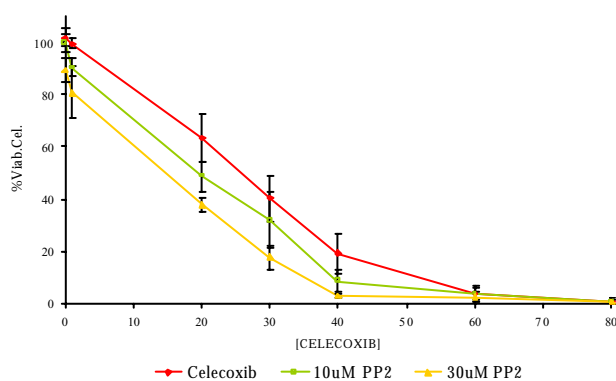


Figura 31. Efecte de l'inhibidor de Src, PP2 en la viabilitat de les cèl·lules TD20 i HCA7

A continuació, vàrem tractar les cèl·lules amb celecoxib preincubant-les abans amb l'inhibidor de Src. En les cèl·lules TD20, el tractament amb PP2 i celecoxib té un efecte sinèrgic, ja que produeix una reducció de la viabilitat superior a l'efecte d'ambdós compostos per separat (**Figura 32A**). En comparar els valors d'IC₅₀ del celecoxib amb i sense preincubació amb PP2, vam veure que el pretractament amb 30µM PP2 reduïa la IC₅₀ de manera estadísticament significativa ($p < 0,05$) (**Taula 10**).

D'altra banda, en les cèl·lules HCA7 tractades amb PP2 augmentava l'efecte del celecoxib però no hi havia sinèrgia doncs l'inhibidor sol produïa una forta reducció de la viabilitat cel·lular (**Figura 32B**).

A. TD20



B. HCA7

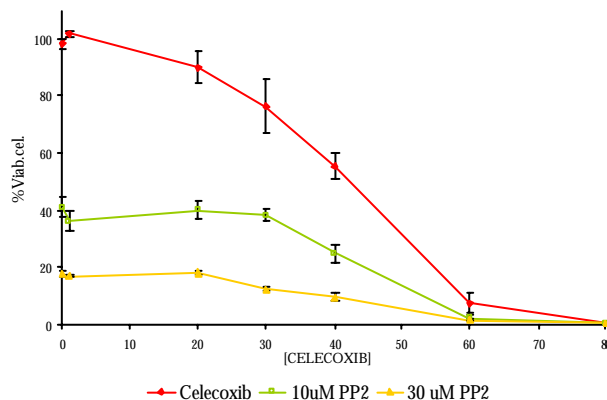


Figura 32. Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 (**A**) i HCA7 (**B**) amb i sense pretractament amb 10µM o 30µM de PP2.

Taula 10. Efecte del celecoxib amb i sense preincubació amb PP2 en TD20

	CELECOXIB	+ 10 μ M PP2	+ 30 μ M PP2
ADHESIÓ	25.08 \pm 2.78	20.34 \pm 2.11	16.94 \pm 0.94
		* $p=0.248$	* $p=0.049$

Valors d'IC₅₀ expressats com a mitjana \pm error estàndard (μ M)

* Test U Mann-Whitney comparant les IC₅₀ amb i sense preincubació amb PP2

3.6 L'activació de Src o Fak no altera l'efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20

Els experiments realitzats fins ara, indicaven el celecoxib induïa una disminució de la senyalització a través de Fak i Src alhora que citotoxicitat. Per a determinar si l'alteració d'aquestes proteïnes podrien jugar un paper causal en l'efecte antitumoral del celecoxib, vam fer transfeccions transitòries de les cèl·lules TD20 amb plàsmids de FAK i Src utilitzant el vector pcDNA3 com a control. Els plàsmids de Fak (Fak-myr) i de Src (Src531) codificaven per proteïnes constitutivament actives. Vam fer assaigs de citotoxicitat per XTT dels transfectants amb el celecoxib per a determinar si alteraven la sensibilitat de les cèl·lules al fàrmac.

Les cèl·lules transfectades amb Fak o Src no modificaven l'efecte del celecoxib obtenint una IC₅₀ de 43,55 μ M en els transfectants de Src531 i de 35,85 μ M en els de Fak-myr mentre que la IC₅₀ de les cèl·lules transfectades amb el plàsmid control era de 42,39 μ M (**Figura 33**). En analitzar els valors d'IC₅₀ no hi havia diferències estadísticament significatives entre el control i cadascun dels transfectants ($p > 0,05$). Aquests resultats indiquen que Fak i Src no tindrien un paper causal en l'efecte del celecoxib.

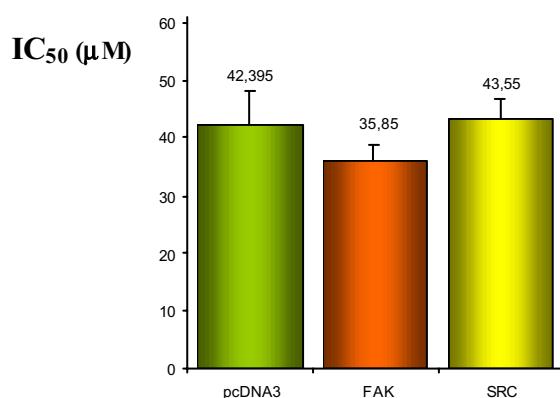


Figura 33. Valors d'IC₅₀ del celecoxib en els transfectants de pcDNA3, FAK-myr i Src531.

3.7 Anàlisi molecular dels transfectants de Fak i Src

A continuació, vam determinar en cadascun dels transfectants, no exposats a celecoxib, els nivells d'expressió i/o activació de proteïnes implicades en les adhesions focals per tal de comprovar, d'una banda, que els plàsmids transfectats s'expressaven i, d'altra banda, per a veure si l'activació de Fak i Src regulava vies implicades en la transducció de senyal relacionades amb les adhesions focals.

Les transfeccions transitòries del plàsmid FAK-myr produïen un augment de l'expressió de Fak, acompanyada d'un augment molt significatiu en la seva fosforilació. De manera similar, la transfecció del plàsmid Src531 va generar un augment molt significatiu de l'expressió i de la fosforilació de Src. La sobreexpressió de Fak-myr no alterava ni l'expressió ni la fosforilació de cap de les proteïnes analitzades que inclouen p130Cas, Erk1/2, Akt i Rac-1. La sobreexpressió de Src531 induïa un augment molt significatiu de la fosforilació de p130Cas però no alterava l'expressió d'aquesta proteïna ni de Rac-1 ni els nivells de fosforilació de les Erks o Akt (**Figura 34**). Per tant, en el nostre model, l'activació constitutiva Fak no altera la senyalització downstream de les adhesions focals, mentre que l'activació constitutiva de Src altera només la fosforilació de p130Cas.

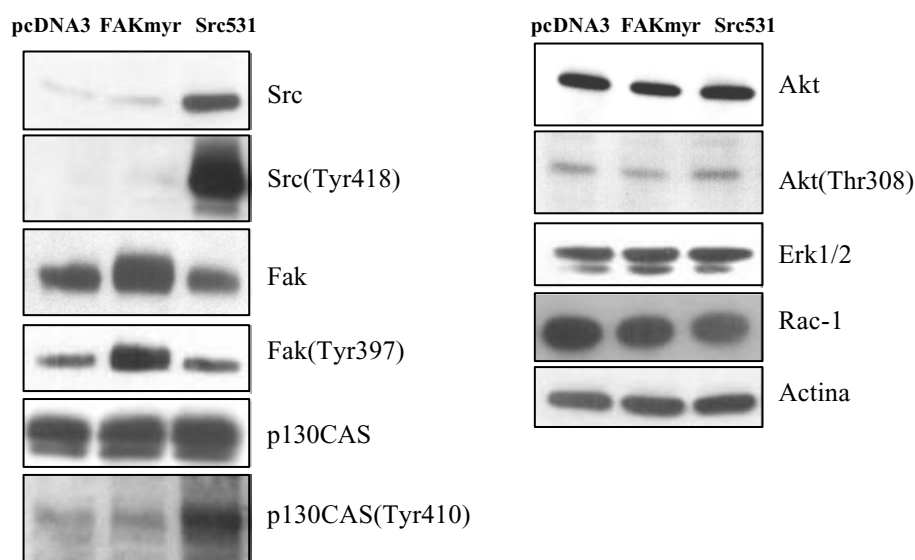


Figura 34. Expressió de proteïnes implicades en les adhesions focals en els transfectants de FAK (Fak-myr), Src (Src531) i control (pcDNA3). Els nivells de β -actina s'han determinat com a control de la càrrega proteica.

3.8 El celecoxib indueix la proteolisi de p130Cas generant un fragment de 31KDa

A les 24h de tractament, el celecoxib reduïa de manera considerable els nivells d'expressió de p130Cas tant en les cèl·lules TD20 com en les HCA7. De totes les alteracions moleculars que produïa aquest fàrmac en les proteïnes de les adhesions focals estudiades, la disminució de p130Cas era la més pronunciada i la que es donava a temps més curt.

La descripció prèvia de la proteolisi de p130Cas a un fragment de 31KDa durant l'apoptosi i la implicació d'aquest fragment en la regulació de la transcripció en el nucli, va estimular l'estudi de la possible proteolisi de p130Cas en el nostre sistema. Mitjançant Western Blot, vam determinar doncs si l'exposició a celecoxib generava aquest fragment de 31KDa. A les 24h de tractament amb celecoxib, tant en TD20 com en HCA7, apareixia una banda a l'alçada de 31KDa que corresponia al fragment proteolitzat de p130Cas (**Figura 35**). Per tant, el celecoxib indueix la proteolisi de p130Cas generant un fragment de 31KDa.

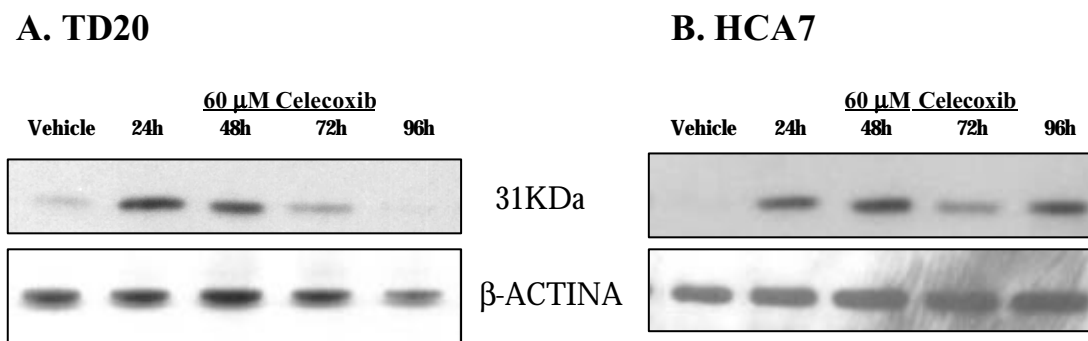


Figura 35. Proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) tractades amb 60μM de celecoxib o vehicle (DMSO) durant diferents intervals de temps. Els nivells de β-actina s'han utilitzat com a control de la càrrega proteica.

3.9 El fragment proteolitzat de p130Cas es transloca al nucli en les cèl·lules tractades amb celecoxib

S'ha descrit que el fragment de 31KDa, producte de la proteolisi de p130Cas, podria tenir activitat inhibidora de la transcripció en translocar-se al nucli. Per aquest motiu, vam determinar la localització de p130Cas mitjançant immunofluorescència en cèl·lules TD20 i HCA7 tractades amb vehicle o 60µM celecoxib durant 24h, utilitzant un anticòs que detecta tant p130Cas silvestre com el fragment de 31 KDa.

En les cèl·lules control (TD20 i HCA7), p130Cas estava localitzat al citosol i a membrana plasmàtica però no al nucli. En tractar les cèl·lules amb celecoxib, es pot observar que p130Cas té també localització nuclear, probablement a conseqüència de l'entrada al nucli del fragment de 31Kda, producte de la seva proteolisi (**Figura 36**). Per tant, la proteolisi de p130Cas i la posterior entrada al nucli del fragment generat de 31KDa, podria inhibir la transcripció de determinats gens que estarien implicats en l'efecte produït pel celecoxib.

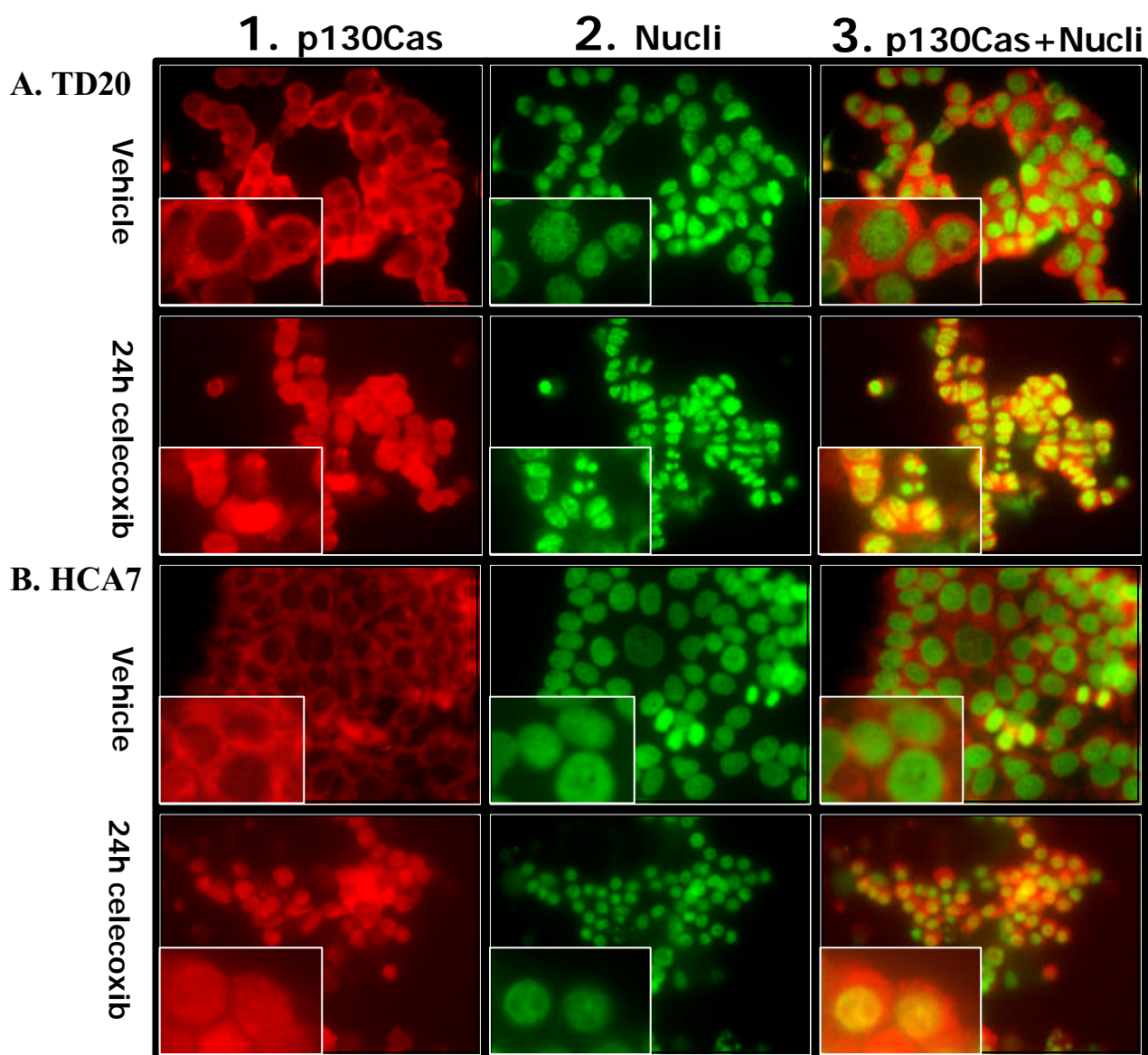


Figura 36. 1. Immunofluorescència de p130Cas (vermell) en cèl·lules TD20 **(A)** i HCA7 **(B)** control o tractades amb 60 μ M celecoxib durant 24h. **2.** Tinció amb el colorant nuclear Hoescht (verd). **3.** Combinació dels senyals de fluorescència de p130Cas (vermell) i de tinció nuclear (verd) per observar la possible localització de p130Cas al nucli (groc).

3.10 La sobreexpressió de p130Cas disminueix l'efecte del celecoxib

La proteolisi de p130Cas i la localització nuclear del fragment proteolitzat suggereixen un paper rellevant de p130Cas en l'efecte del celecoxib. Per a determinar si aquests efectes podrien ser causa o conseqüència de l'apoptosi induïda pel celecoxib vam sobreexpressar p130Cas en les cèl·lules TD20 utilitzant un plàsmid (Cas-FL) que codificava per la proteïna silvestre. La sobreexpressió de p130Cas revertia parcialment l'efecte del celecoxib augmentant de manera significativa ($p=0,026$) la IC_{50} de 33,58 μ M (pcDNA3) a 55,66 μ M (CasFL) (**Figura 37**). Per tant, la sobreexpressió de p130Cas disminueix la sensibilitat de les cèl·lules TD20 al celecoxib.

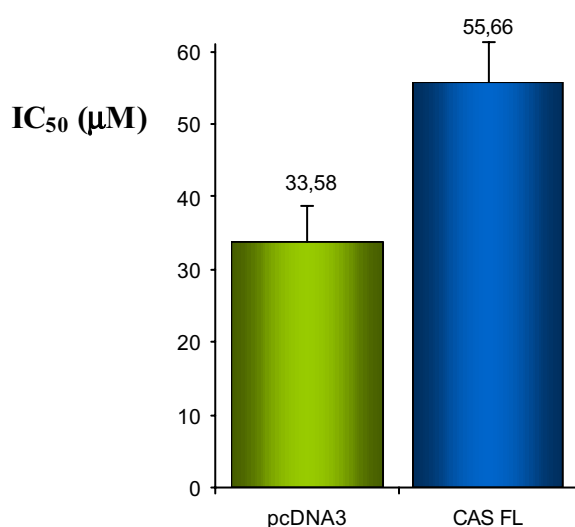


Figura 37. Valors d' IC_{50} del celecoxib en els transfectants de p130Cas silvestre (Cas-FL) i en els de pcDNA3 (control). La sobreexpressió de p130Cas reverteix, significativament ($p=0,026$), part de l'efecte del celecoxib.

3.11 Anàlisi molecular dels transfectants de p130Cas

Vam determinar els nivells d'expressió de proteïnes implicades en les adhesions focals en els transfectants de p130Cas. Els transfectants tenien un augment molt fort de l'expressió de p130Cas i també de la seva fosforilació. No hi havia canvis en la fosforilació ni expressió de Fak o Src. Finalment, p130Cas no alterava ni els nivells d'activació d'Akt ni d'Erk1/2 ni l'expressió de Rac-1 (**Figura 38**).

Aquests resultats, i la menor sensibilitat al celecoxib dels transfectants de p130Cas, indiquen la implicació de p130Cas en el mecanisme d'acció del fàrmac, i la utilització

d'una via independent d'Akt i Erks. Per a determinar la implicació de Rac-1 en la resistència al celecoxib dels transfectants caldria analitzar també el seu nivell d'activació (per unió a GTP) ja que malgrat que no varia la seva expressió podria estar alterada la seva activació.

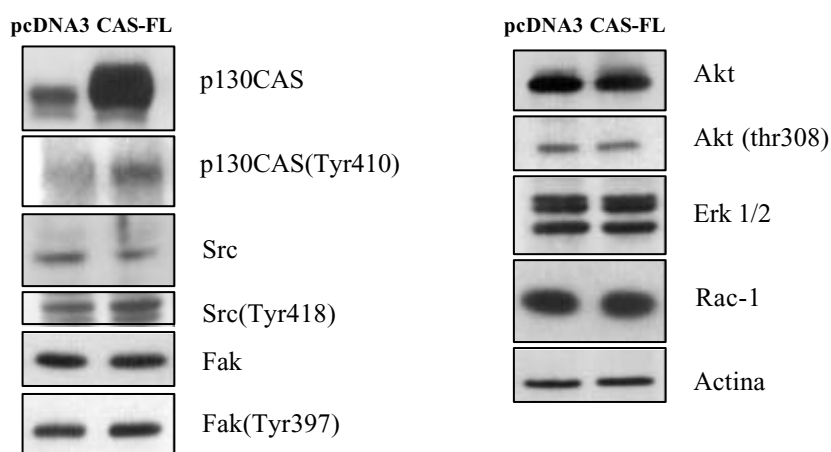


Figura 38. Expressió de proteïnes implicades en les adhesions focals en els transfectants de p130Cas (CasFL) i control (pcDNA3).

4. RESISTÈNCIA AL CELECOXIB DE LES CÈL·LULES EN SUSPENSÍO

4.1 El celecoxib no indueix apoptosi en les cèl·lules en suspensió

Anteriorment, havíem determinat l'efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió (**Figura 16**) veient que esdevenien resistents a aquest fàrmac. Per tal d'intentar explicar aquesta disminució de la sensibilitat al celecoxib, vam analitzar més a fons el comportament de les cèl·lules en suspensió.

Vam realitzar el test d'apoptosi de les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió després de tractar-les amb 60µM de celecoxib durant 24h, 48h, 72h i 96h. En aquest cas, també vam fer el test d'apoptosi de cèl·lules tractades amb vehicle per a cada interval de temps doncs volíem veure alhora si el fet de cultivar-les en suspensió feia que entressin en apoptosi. Les cèl·lules TD20 en suspensió creixien formant agregats de cèl·lules que anaven augmentant de tamany al llarg del temps. Amb la tinció de Hoescht vam poder comprovar que no hi havia un augment significatiu de cèl·lules apoptòtiques ni en els controls (**Figura 39, A1**) ni en tractar amb celecoxib (**Figura 39, A2**).

Les cèl·lules HCA7 també tenen capacitat de créixer en suspensió i s'uneixen entre elles formant agregats. En les cèl·lules control hi havia un augment significatiu de cèl·lules apoptòtiques al llarg del temps malgrat que continuava havent una major proporció de cèl·lules viables (**Figura 39, B1**). Vam observar, també, que les cèl·lules no apoptòtiques corresponien a les que estaven agregades, probablement perquè les unions intercel·lulars els donaven senyals de supervivència. D'altra banda, en tractar les cèl·lules HCA7 amb celecoxib també vèiem un augment de cossos apoptòtics en proporció similar a les cèl·lules tractades amb vehicle (**Figura 39, B2**). Per tant, l'apoptosi observada en les cèl·lules tractades amb celecoxib és causada per la manca d'adhesió i no pel tractament amb el fàrmac.

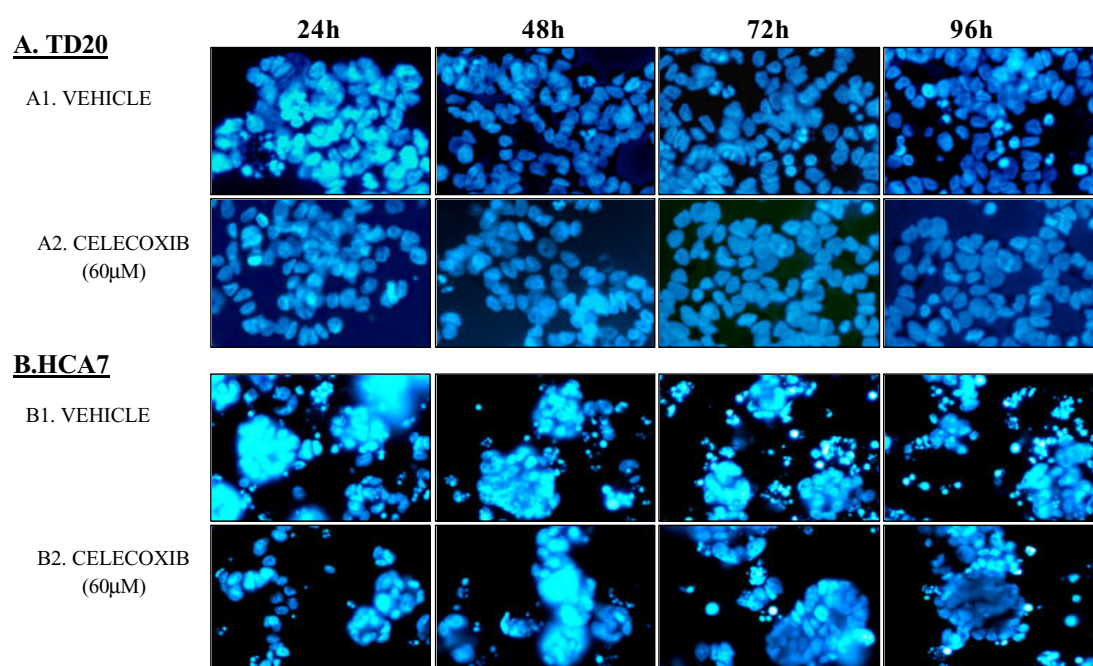


Figura 39. Inducció d'apoptosi en les línies cel·lulars TD20 (A) i HCA7 (B) cultivades en suspensió després del tractament amb 60µM de celecoxib (A2, B2) o Vehicle (A1, B1) durant diferents intervals de temps (24h, 48h, 72h i 96h). Microscopia de fluorescència amb filtre DAPI (400X).

4.2 El celecoxib no activa les caspases en cèl·lules en suspensió

Vam analitzar els nivells d'expressió i activació de caspases en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió tractades amb 60 μ M celecoxib o vehicle durant diferents intervals de temps per tal d'analitzar, a nivell molecular, el que havíem observat en el test d'apoptosi.

En les cèl·lules TD20 no hi havia activació de les caspases 8 i 9 ni en les cèl·lules tractades amb celecoxib ni en les tractades amb vehicle. D'altra banda, malgrat no havíem observat un augment significatiu de l'apoptosi, hi havia una lleugera activació de la caspasa 7 al llarg del temps tant en les cèl·lules tractades amb vehicle com amb celecoxib (**Figura 40A**).

En les cèl·lules HCA7 tractades amb celecoxib o vehicle no vam detectar activació de caspasa 8 ni 9. Hi havia una activació clara de la capassa 7 però en el mateix nivell en les cèl·lules tractades amb vehicle que en les tractades amb fàrmac (**Figura 40B**). Així, aquestes cèl·lules quan estan en suspensió són sensibles a l'anoikis (apoptosi induïda per la pèrdua d'adhesió) i aquesta es donaria a través de l'activació de la caspasa 7. Aquesta activació no és causada pel tractament amb el fàrmac sinó per la pèrdua d'ancoratge.

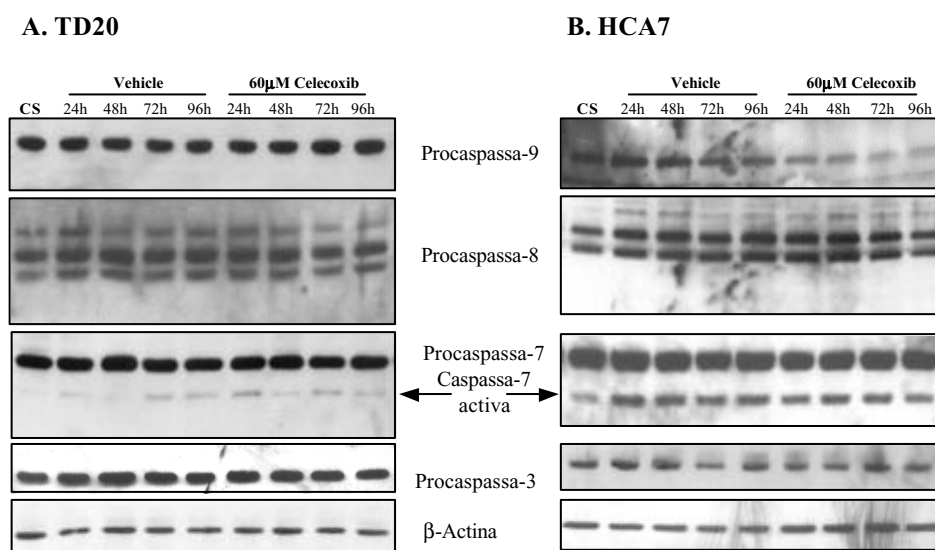


Figura 40. Nivells d'expressió i/ activació de les caspases 8, 9, 3 i 7 en les cèl·lules TD20 (**A**) i HCA7 (**B**) cultivades en suspensió tractades amb 60 μ M de celecoxib o vehicle (DMSO) durant diferents intervals de temps. Els nivells d'expressió de β -actina s'han determinat com a control de la càrrega proteica total. CS : Control Suspensió.

5. ALTERACIÓ DELS CONTACTES FOCALS EN LES CÈL·LULES EN SUSPENSÍO

5.1 Efecte del celecoxib en proteïnes de les adhesions focals en cèl·lules en suspensió

Quan es cultiven les cèl·lules en suspensió, aquestes perden els contactes focals i augmenten les unions cèl·lula-cèl·lula. Ha d'haver, per tant, una reorganització en les proteïnes que formen les adhesions focals i els contactes cèl·lula-cèl·lula que reguli aquests canvis i permeti a la cèl·lula sobreviure sense els senyals de supervivència provinents de l'ancoratge a la matriu extracel·lular (ECM) o a la placa. Les cèl·lules TD20 i HCA7 esdevenen resistents al celecoxib en créixer en suspensió, per tant, han de tenir activada alguna via que els dona la supervivència i que no pot ser inhibida pel celecoxib. Un dels nostres objectius era determinar quines vies estarien implicades en aquesta resistència al celecoxib. Per això, vam analitzar els nivells d'expressió i/o activació per fosforilació de les proteïnes implicades en les adhesions focals i en els contactes cèl·lula-cèl·lula que havíem estudiat en les cèl·lules adherides.

En comparar l'expressió i activació d'aquestes proteïnes en les cèl·lules (TD20 i HCA7) cultivades en adhesió i en suspensió sense tractament, vam observar molt poques diferències. En les cèl·lules TD20 la única diferència la trobàvem en la fosforilació de Src, que era lleugerament major en les cèl·lules adherides i en HCA7 hi havia major expressió de p130Cas en les cèl·lules en suspensió. En analitzar si el celecoxib alterava alguna d'aquestes proteïnes tampoc vam veure canvis importants, algunes proteïnes disminuïen al llarg del temps (Fak, p130Cas) però ho feien tant en les cèl·lules control com en les tractades amb celecoxib, per tant, eren alteracions causades pel cultiu en suspensió i no pel fàrmac. La fosforilació d'Akt també disminuïa al llarg del temps i aquesta disminució era més marcada en les cèl·lules tractades amb celecoxib que en les control (**Figura 41**).

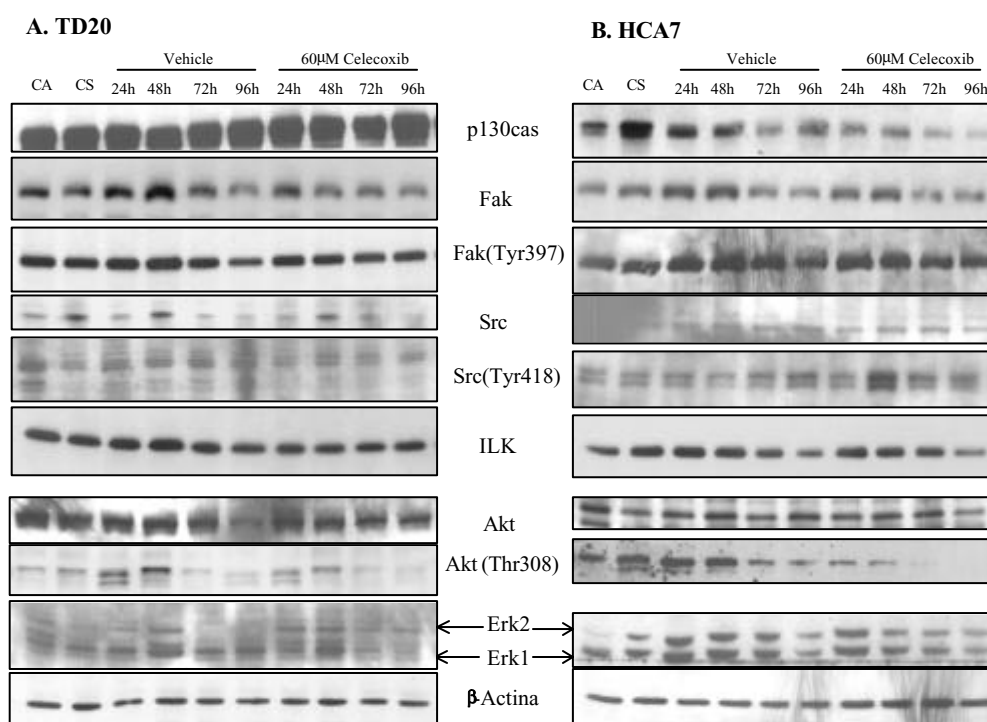


Figura 41. Nivells d'expressió i/o fosforilació de proteïnes implicades en les adhesions focals en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) en suspensió tractades amb 60µM de celecoxib o vehicle (DMSO) durant diferents intervals de temps. CA: control adhesió. CS: control suspensió

5.2 Efecte del celecoxib en les proteïnes implicades en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula

Vam determinar els nivells d'expressió d'E-cadherina i β -catenina ja que en cultivar les cèl·lules en suspensió augmenten els contactes cèl·lula-cèl·lula. Els nivells d'E-cadherina no variaven significativament entre les cèl·lules cultivades en adhesió i en suspensió ni tampoc amb el tractament amb el celecoxib.

Els nivells de β -catenina tampoc presentaven diferències en les cèl·lules TD20 però sí en les HCA7 on hi havia major expressió en les cèl·lules en suspensió tot i que a partir de 72h disminueixen tant en les cèl·lules control com en les tractades amb celecoxib (**Figura 42**).

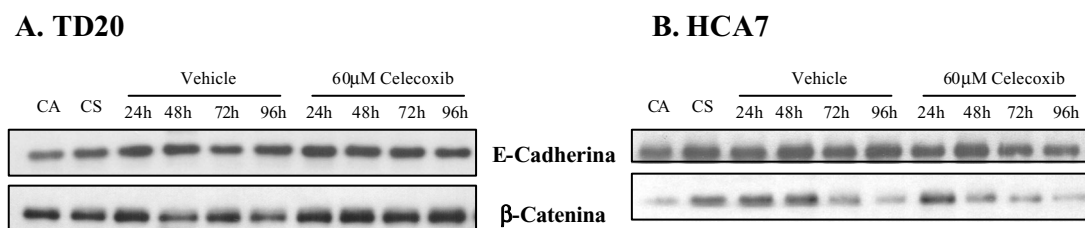


Figura 42. Nivells d'expressió d'E-cadherina i β -catenina en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) en suspensió tractades amb 60µM celecoxib o vehicle. CA: Control adhesió. CS : Control suspensió

5.3 Efecte de l'inhibidor de la via PI3K/Akt Wortmannin en les cèl·lules en suspensió i en la seva sensibilitat al celecoxib.

Una de les principals vies de supervivència de les cèl·lules és la de PI3K/Akt. A més, s'ha descrit que aquesta via pot ser activada per les unions cèl·lula-cèl·lula mediades per E-cadherina. Per tal de determinar si les cèl·lules en suspensió esdevenien resistents al celecoxib, com a conseqüència de l'activació d'aquesta via, vam tractar-les amb l'inhibidor de PI3K, Wortmannin. Vam fer assajos de citotoxicitat per XTT pretractant les cèl·lules TD20 i HCA7 amb 0,1µM o 0,5µM Wortmannin durant 1 hora i, a continuació, amb celecoxib. En ambdues línies cel·lulars, l'inhibidor de la via PI3K/Akt, Wortmannin, no va tenir cap efecte significatiu en les cèl·lules control ni tampoc en la seva sensibilitat al celecoxib (**Figura 43**). Per tant, aquesta via no és important per la supervivència de les cèl·lules en suspensió ni per l'adquisició de resistència al celecoxib.

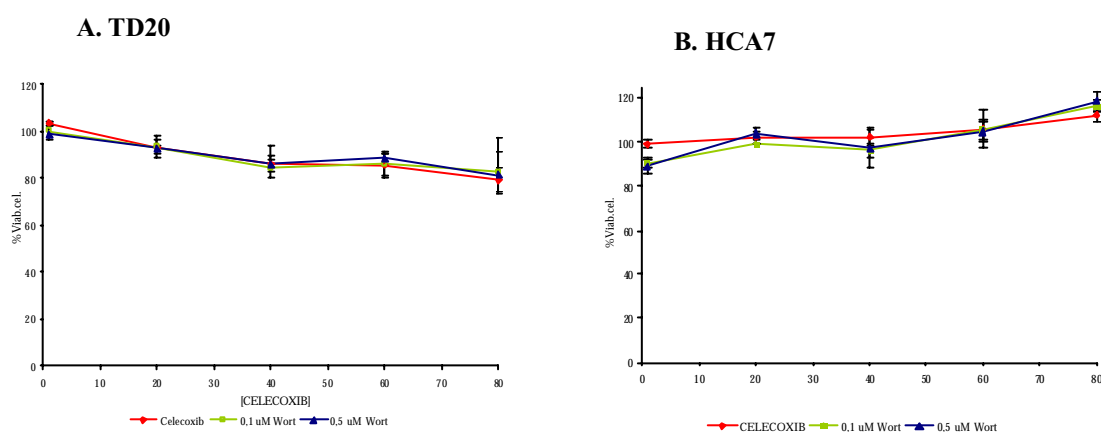


Figura 43. Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) en suspensió amb i sense preincubació amb 0,1µM i 0,5µM Wortmannin.

5.4 El celecoxib i l'inhibidor de Src, PP2, no tenen efecte citotòxic sinèrgic en les cèl·lules en suspensió

Vam analitzar l'efecte de l'inhibidor de Src, PP2, en les cèl·lules en suspensió i en la seva sensibilitat al celecoxib. En les cèl·lules TD20, el tractament amb PP2 no inhibia la viabilitat cel·lular mentre que en les HCA7 hi havia una forta reducció del percentatge de

cèl·lules viables en tractar amb 10 μ M i 30 μ M de PP2 (**Figura 44**), de manera molt semblant al que vam observar en les cèl·lules adherides (**Figura 31**).

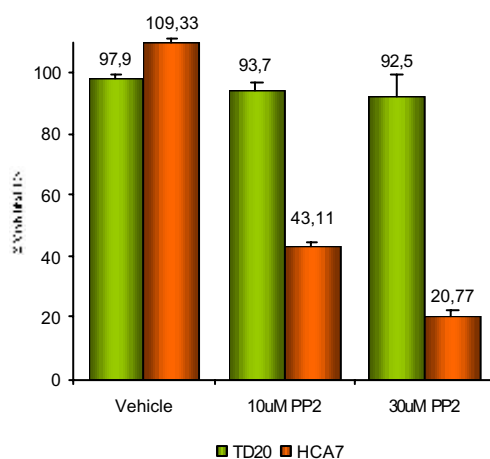


Figura 44. Efecte de l'inhibidor de Src, PP2, en la viabilitat de les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió

D'altra banda, en comparar l'efecte del celecoxib amb i sense preincubació amb PP2 en les cèl·lules TD20, no hi havia diferències estadísticament significatives entre les IC₅₀ obtingudes (**Taula 11**). Per tant, en les cèl·lules TD20 en suspensió la inhibició de Src no modifica la sensibilitat de les cèl·lules al celecoxib (**Figura 45A**). En les cèl·lules HCA7 el PP2 reduïa molt la viabilitat de manera que el celecoxib no produïa gairebé cap efecte quan preincubàvem amb PP2 (**Figura 45B**).

Taula 11. Efecte del celecoxib amb o sense pretractament amb PP2 en TD20

	CELECOXIB	+ 10 μ M PP2	+ 30 μ M PP2
IC ₅₀	55.93 \pm 2.20	55.76 \pm 4.33	47.10 \pm 4.51
		<i>p</i> =0.827	<i>p</i> =0.127

Valors d'IC₅₀ expressats com a mitjana \pm error estàndard (μ M)

* Test U de Mann-Whitney comparant les IC₅₀ del celecoxib amb i sense preincubació de PP2

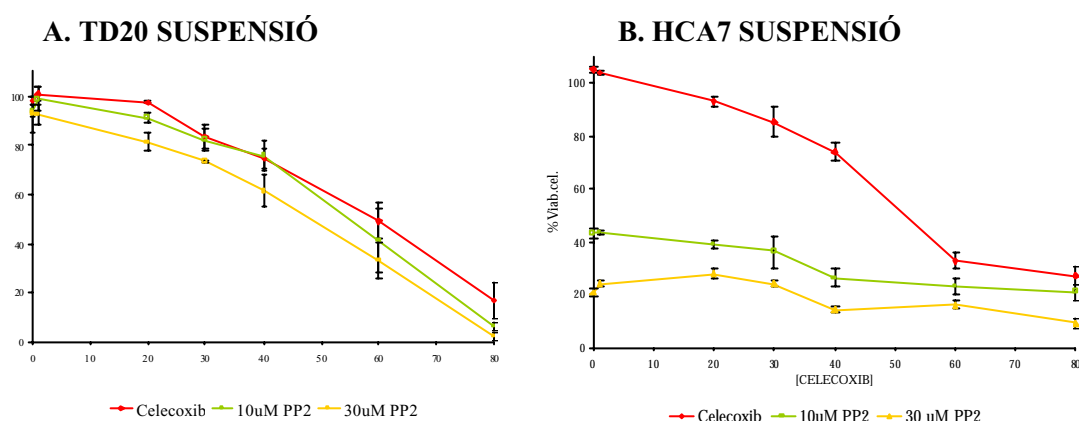


Figura 45. Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) amb i sense pretractament amb 10µM o 30µM de PP2.

5.5 El celecoxib no indueix la proteolisi de p130Cas en cèl·lules en suspensió.

A continuació, vam determinar si en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió, p130Cas era proteolitzat en tractar-les amb celecoxib i si hi havia diferències entre les cèl·lules control adherides i en suspensió. (Figura 46).

En ambdues línies hi havia un augment en la banda de 31KDa corresponent a la proteolisi de p130Cas en cultivar les cèl·lules en suspensió però no augmentava ni al llarg del temps ni amb el tractament amb celecoxib. Per tant, quan les cèl·lules creixen en suspensió hi ha un nivell baix de proteolisi de p130Cas que no augmenta pel tractament amb el celecoxib.

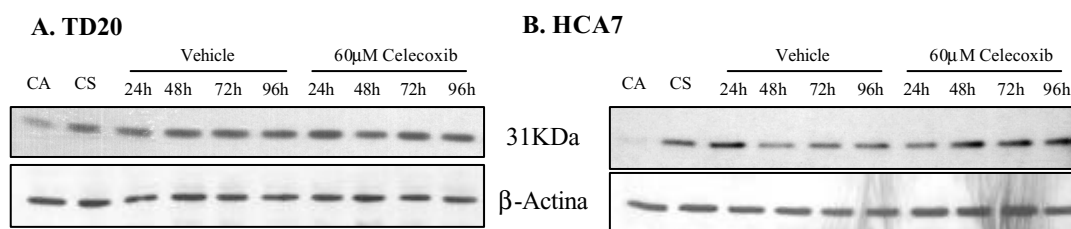


Figura 46. Proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en les cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) en suspensió tractades amb 60µM de celecoxib o vehicle (DMSO) durant diferents intervals de temps. CA: Control adhesió. CS : Control suspensió

5.6 El celecoxib no indueix la translocació al nucli de p130Cas en cèl·lules en suspensió

Finalment, vam determinar la localització de p130Cas per immunofluorescència en les cèl·lules en suspensió control i tractades amb celecoxib. Volíem veure si la proteolisi de p130Cas també produïa l'entrada del fragment de 31KDa a nucli. A diferència de les cèl·lules adherides, en les que el nucli no tenia gens de marcatge per a p130Cas, les cèl·lules en suspensió tenien un marcatge tot i que molt flux que podria correspondre a l'augment de proteolisi de p130Cas que havíem observat en els western blots. En ambdues línies cel·lulars, p130Cas estava localitzat principalment al citosol tant a les cèl·lules tractades amb vehicle i amb celecoxib, malgrat aquest marcatge feble nuclear (**Figura 47**).

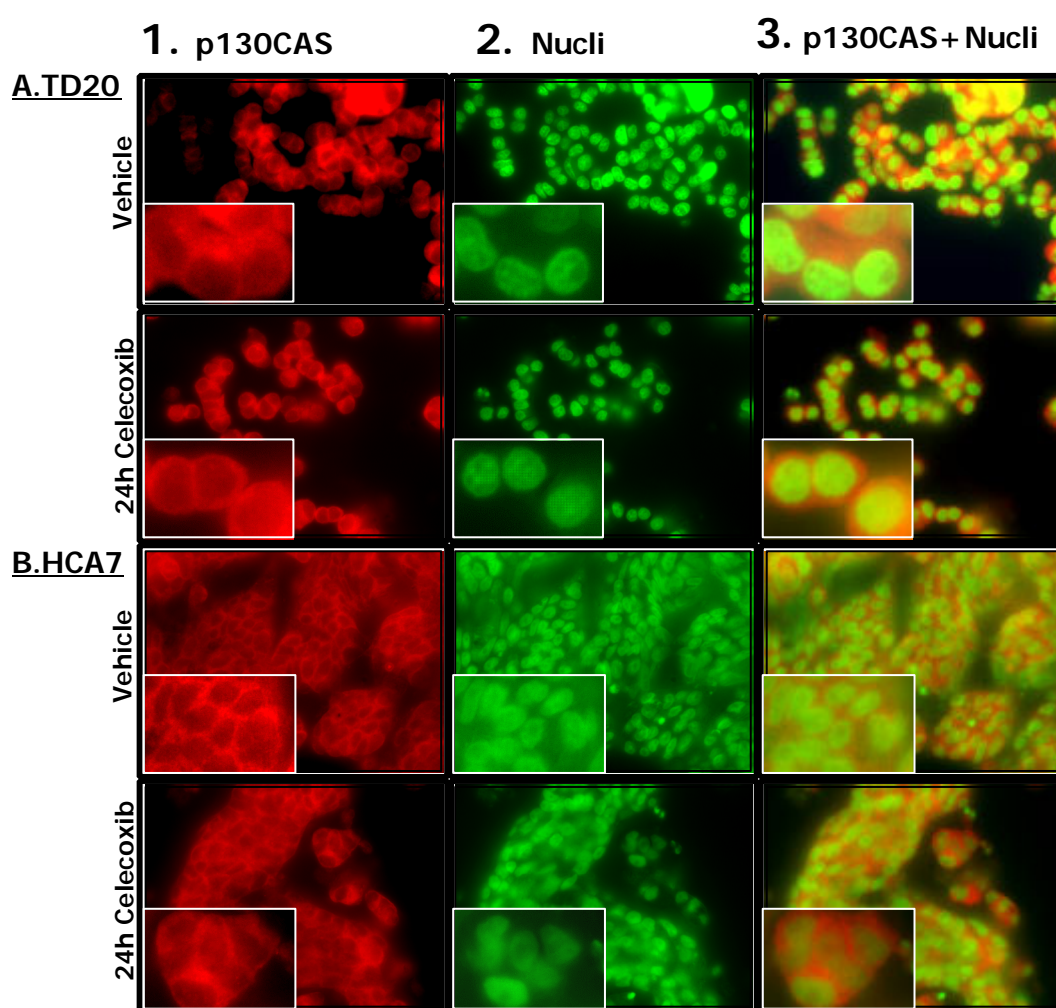


Figura 47. 1. Immunofluorescència de p130Cas (vermell) en cèl·lules TD20 (A) i HCA7 (B) en suspensió control o tractades amb 60µM celecoxib durant 24h. 2. Tinció amb el colorant nuclear Hoescht (verd). 3. Combinació dels senyals de fluorescència de p130Cas i de tinció nuclear (groc).

6. MECANISME D'ACCIÓ DEL CELECOXIB EN TUMORS XENOTRANSPLANTATS DE CARCINOMA DE CÒLON

El lloc on es localitza el tumor (tumor primari o metàstasi) influencia la resposta al tractament amb fàrmacs. En models animals, això es tradueix en una diferent resposta d'un mateix tumor quan s'implanta ortotòpicament (en l'òrgan d'on prové el tumor) o heterotòpicament. Per aquest motiu, per analitzar l'efecte antitumoral in vivo del celecoxib vam realitzar els experiments in vivo amb ratolins atòmics xenotrasplantats amb el tumor TD20 en dues localitzacions: subcutània i ortotòpica (còlon). D'aquesta manera, vam poder analitzar l'efecte del celecoxib in vivo i avaluar si hi havia diferències segons el lloc d'implantació tumoral.

En ambdós experiments, vàrem administrar diàriament una dosi de 150 mg/Kg celecoxib (grup experimental) o vehicle (grup control) per via oral durant 16 dies.

6.1 El celecoxib redueix el volum tumoral en els xenotrasplants subcutanis i ortotòpics de TD20

El tumor TD20 implantat subcutàniament i ortotòpicament respon de manera similar en ambdues localitzacions en relació a la reducció del volum tumoral. En els dos experiments vam observar una reducció significativa del volum tumoral final ($p < 0,05$) dels tumors tractats amb celecoxib respecte als tractats amb vehicle (**Figura 48A**). El percentatge de reducció del volum tumoral era del 60.42% en el cas del subcutani i del 55.84 % en l'ortotòpic (**Taula 12**). Per tant, el celecoxib redueix el volum tumoral in vivo en els tumors xenotrasplantats en localització subcutània i ortotòpica.

En l'experiment in vivo realitzat en localització subcutània vam mesurar també el volum dels tumors cada tres dies per a controlar el creixement tumoral. En la **Figura 48B** s'observa com, al llarg de l'experiment, el volum tumoral del grup control augmentava amb el temps mentre que el grup tractat es mantenia força constant. Hi havia diferències significatives entre els volums tumorals d'ambdós grup a partir del desè dia de tractament ($p < 0,05$).

Per a comparar el creixement del volum tumoral en ambdós grups, vam calcular l'àrea sota la corba (AUC) per a cada tumor. El valor d'AUC promig dels tumors control era gairebé el doble que l'AUC del grup tractat (**Taula 13**). En comparar ambdós grups (test U-Mann Whitney) hi havia diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$).

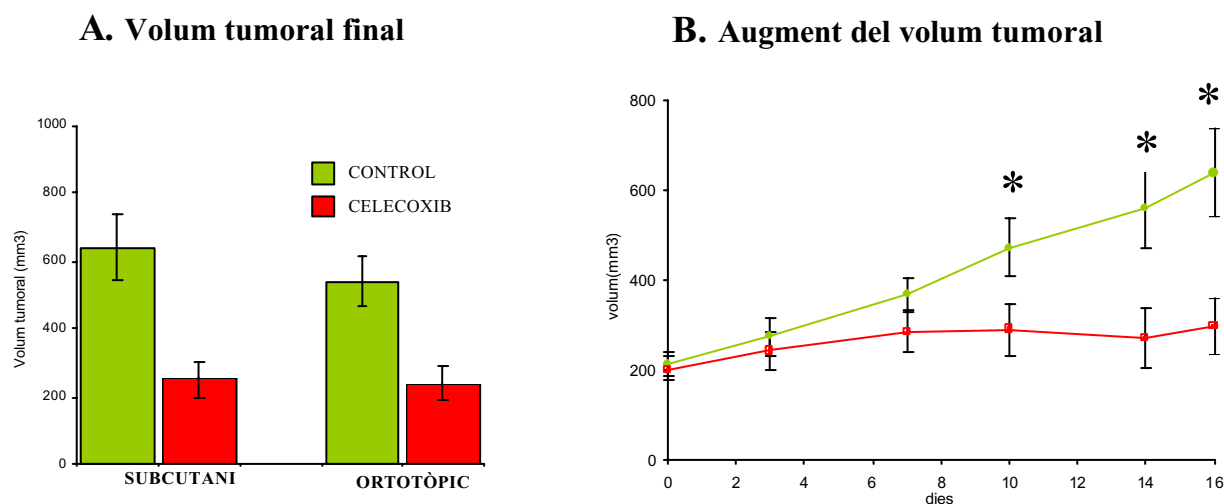


Figura 48. El celecoxib redueix el volum tumoral en tumors TD20 implantats en localització subcutània i ortotòpica. **A.** Comparació entre el volum tumoral final (mm^3) en els grups control i tractat en els xenotrasplants subcutanis i ortotòpics. En ambdues localitzacions hi ha diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) entre el grup control i tractat. **B.** Volum tumoral al llarg de l'experiment del grup control i tractat en els tumors TD20 implantats subcutàniament (* $p < 0,05$).

Taula 12. Efecte del celecoxib en el volum final tumoral en els experiments in vivo amb tumors TD20 implantats en localització ortotòpica i subcutània

		Volum(mm^3)	% Reducció	p^*
SC	CONTROL	637.55± 97.24	60.42 %	0.004
	CELECOXIB	252.29±51.97		
ORT	CONTROL	538.69±74.13	55.84 %	0.004
	CELECOXIB	237.84±50.47		

Valors expressats com mitjana del volum final tumoral \pm error típic (mm^3) per a cada grup, i percentatge de reducció del volum dels grups tractats respecte al control.

*Test U de Mann- Whitney

Taula 13. Valors d'AUC de les corbes del volum tumoral en els tumors subcutanis control i tractats amb celecoxib

		AUC	p*
SC	CONTROL	6527.23 ± 826.03	0.014
	CELECOXIB	3623.71 ± 474.12	

Valors d'AUC (àrea sota la corba) ± error estàndard

* Test U Mann-Whitney

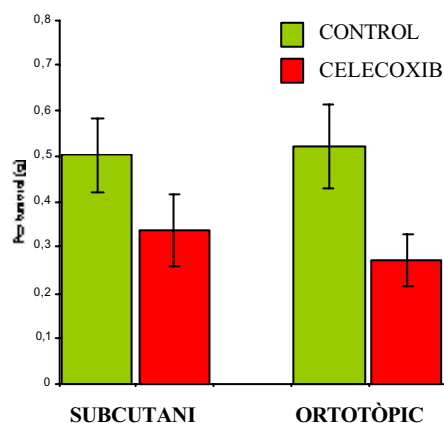
6.2 El celecoxib redueix el pes total dels tumors en els xenotrasplants ortotòpics però no en els subcutanis

D'altra banda, vam analitzar la reducció produïda pel celecoxib en el pes total final dels tumors. En els tumors implantats ortotòpicament hi havia una reducció del pes tumoral del 48% essent les diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$). En els tumors implantats subcutàniament, malgrat que el celecoxib reduïa significativament el volum tumoral, no hi havia una reducció significativa en el pes total final del tumor (**Figura 49A; Taula 14**).

6.3 El celecoxib indueix més necrosi macroscòpica en el tumors subcutanis que en els ortotòpics

Amb els valors del pes total del tumors i del pes sec (tumor sense necrosi líquida) vam calcular el percentatge de necrosi macroscòpica de cada grup de tumors. El percentatge de necrosi macroscòpica dels grups control de les dues localitzacions tumorals no presentava diferències significatives ($p > 0,05$), essent en el cas del subcutani del 19.27 ± 6.34 % i en l'ortotòpic del 13.89 ± 3.94 %. En tractar amb celecoxib, els tumors subcutanis tenien un percentatge de necrosi macroscòpica significativament major (30.56 ± 4.61 %) que els tumors tractats de l'ortotòpic (5.46 ± 2.13 %) ($p < 0,05$) (**Figura 49B, Taula 15**). Per tant, la localització tumoral influeix en els nivells de necrosi macroscòpica induïts pel tractament amb el celecoxib.

A. Pes tumoral



B. % Necrosi macroscòpica

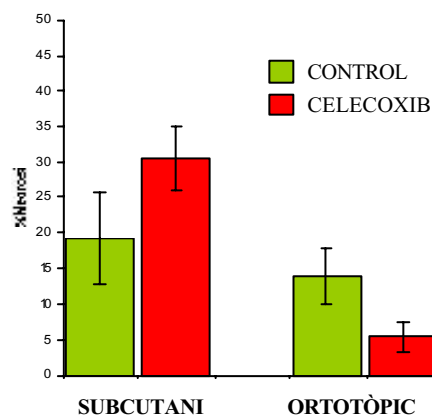


Figura 49. Efecte del celecoxib en la reducció del pes total tumoral **(A)** i en el percentatge de necrosi macroscòpica **(B)** en tumors TD20 implantats en localització subcutània i ortotòpica. Hi ha diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) en la reducció del pes total només en la localització ortotòpica. La necrosi macroscòpica s'ha calculat com $((\text{pes total} - \text{pes sec}) / \text{pes total}) * 100$.

Taula 14. Efecte del celecoxib en el pes total final dels tumors de localització subcutània i ortotòpica

		Pes total(g)	% Reducció	p*
SC	CONTROL	0.50 ± 0.08	32.85 %	0.234
	CELECOXIB	0.33 ± 0.07		
ORT	CONTROL	0.52 ± 0.09	48 %	0.03
	CELECOXIB	0.27 ± 0.05		

Valors del pes total final expressats com mitjana ± error estàndard (g) per a cada grup i percentatge de reducció del pes tumoral dels grups tractats respecte al control (* Test U de Mann-Whitney).

Taula 15. Percentatge de necrosi macroscòpica en els grups control i tractat de localització subcutània i ortotòpica

	SC	ORT	p*
CONTROL	19.27 ± 6.34	13.89 ± 3.94	0.620
CELECOXIB	30.56 ± 4.31	5.46 ± 2.13	0.001

% de Necrosi Macroscòpica calculada com $(\text{pes total} - \text{pes sec} / \text{pes total}) * 100$.

* Test U-Mann Whitney

6.4 El celecoxib augmenta el nivell de necrosi microscòpica en els tumors implantats subcutàniament

Mitjançant la tinció amb Hematoxilina-Eosina de seccions dels tumors parafinats vam analitzar els nivells de necrosi microscòpica presents en els tumors controls i tractats amb celecoxib de localització subcutània i ortotòpica. Els tumors control implantats subcutàniament tenien un nivell més elevat de necrosi microscòpica que els ortotòpics (**Figura 50**). A més, el tractament amb celecoxib, augmentava els nivells de necrosi microscòpica en els tumors implantats en el subcutis (45-55%) respecte als controls (20-30%) mentre que en els ortotòpics no hi havia diferències entre el grup tractat (5-15%) i control (5-15%). Per tal d'intentar quantificar els nivells de necrosi presents en cada grup, vam estimar l'àrea necròtica respecte l'àrea total tumoral en totes les mostres. En la **taula 16** es mostren els intervals obtinguts pel percentatge de necrosi dins de cada grup.

Taula 16. Percentatge de necrosi microscòpica presents en els tumors controls i tractats amb celecoxib implantats subcutàniament i ortotòpicament

	SUBCUTANI		ORTOTÒPIC	
	Control	celecoxib	Control	celecoxib
% necrosi microscòpica*	20-30 %	45-55 %	5-15 %	5-15 %

* àrea necròtica/ àrea total tumoral.

6.5 El celecoxib indueix apoptosi en els tumors implantats ortotòpicament

Vam realitzar el test d'apoptosi amb tinció amb colorant nuclear Hoescht en seccions dels tumors parafinats per tal de d'analitzar el nivell d'apoptosi dels tumors. Per avaluar-ho, només vam tenir en compte les àrees microscòpicament viables descartant les àrees necròtiques. Vam observar un augment significatiu de nuclis apoptòtics en els tumors tractats amb celecoxib implantats ortotòpicament (**Figura 51**). En els tumors implantats al subcutis, no s'observaren figures apoptòtiques ni en els controls ni en els tractats amb celecoxib.

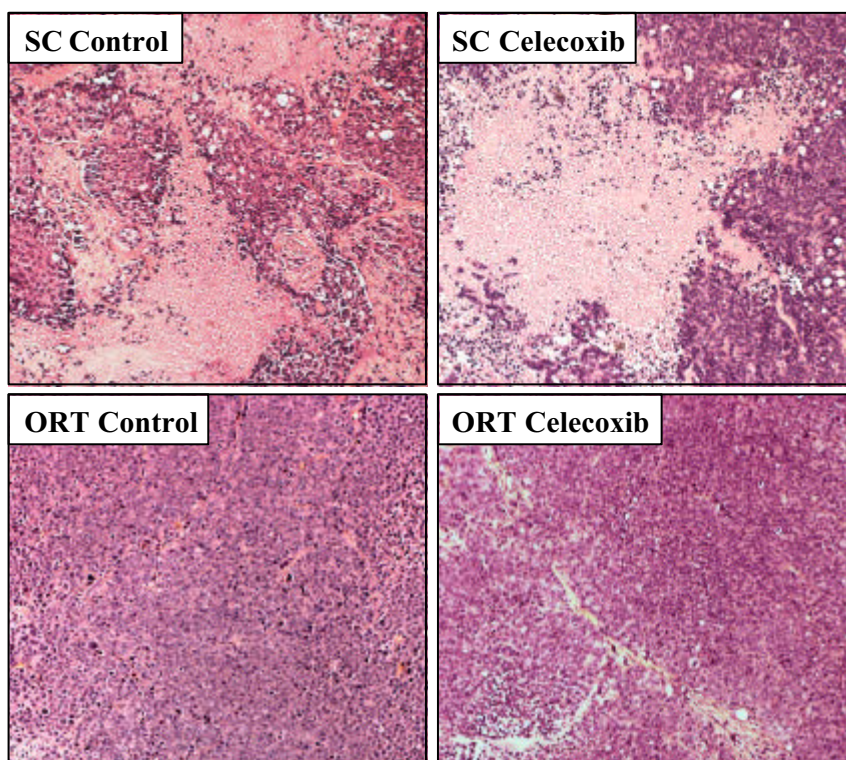


Figura 50. Anàlisi de la necrosi microscòpica dels tumors control i tractats amb celecoxib implantats subcutàniament (SC) i ortotòpicament (ORT). Les imatges corresponen a tincions d'Hematoxilina – Eosina de seccions dels tumors parafinats (100X). Els tumors subcutanis tractats amb celecoxib tenen un percentatge de necrosi microscòpica superior als ortotòpics tractats.

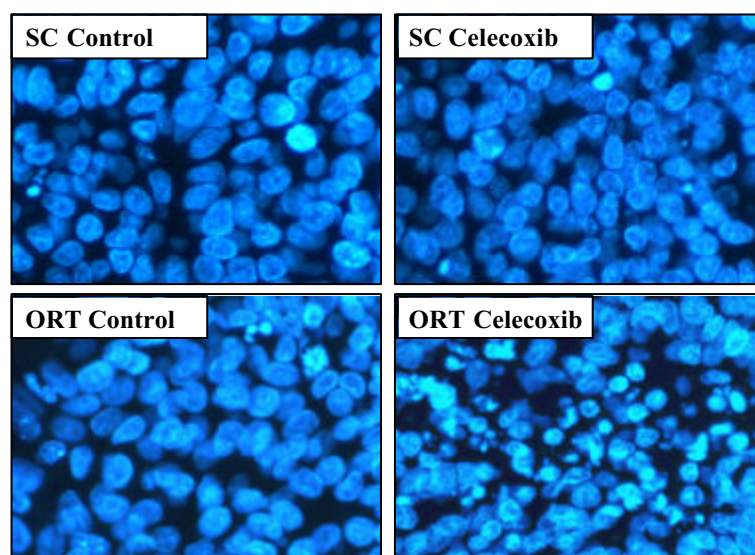


Figura 51. Anàlisi de la inducció d'apoptosi en tumors controls i tractats amb celecoxib implantats subcutàniament (SC) i ortotòpicament (ORT). El celecoxib induïx apoptosi només en els tumors implantats ortotòpicament. Les imatges corresponent a tincions amb Hoescht de seccions de teixit de tumor (400X).

6.6 El celecoxib no produeix toxicitat en els animals xenotrasplantats

En ambdós experiments vam administrar diàriament per via oral una dosi de 150mg/kg de celecoxib o vehicle durant 16 dies. Per tal de determinar si el fàrmac produïa algun tipus de toxicitat, es pesaven els animals cada tres dies i es controlava si presentaven algun efecte advers (urticàries, caquèscia...) causat pel tractament. Al final de l'experiment s'analitzà també, durant la necròpsia, l'estat dels òrgans. El celecoxib no va produir cap tipus de toxicitat en els experiments realitzats i no va haver-hi mortalitat en cap dels grups. El pes dels animals al llarg de l'experiment no presentava diferències ($p>0,05$) entre els grups control i tractat ni en localització subcutània ni en l'ortotòpica (**Figura 52**).

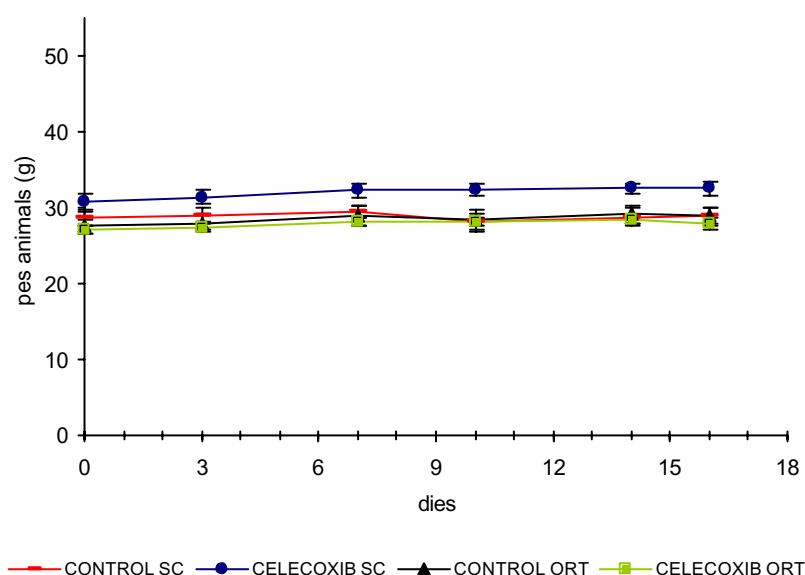


Figura 52. Pes dels animals durant els experiments (subcutani i ortotòpic). Els animals es van pesar cada tres dies. En ambdós experiments no hi havia diferències estadísticament significatives ($p>0,05$).

6.7 El celecoxib indueix l'activació de caspasa 9 en els tumors implantats ortotòpicament

Vam analitzar, a nivell molecular, els tumors derivats de la implantació de la línia cel·lular TD20 per intentar explicar els resultats obtinguts en l'anàlisi histològic. Per això, vam fer extractes proteics dels tumors controls i tractats amb celecoxib i vam determinar

mitjançant Western Blot els nivells d'expressió i/o activació de aquelles proteïnes que en l'estudi *in vitro* es van trobar alterades, fonamentalment aquelles relacionades amb la inducció d'apoptosi i la regulació de les adhesions focals. L'anàlisi molecular el vam fer amb 6 tumors control i 6 tumors tractats per tal observar la variabilitat interindividual existent en els models animals.

En el test d'apoptosi, realitzat en les seccions de tumors, vam veure que hi havia inducció d'apoptosi en els tumors ortotòpics tractats amb celecoxib. Per tal d'interpretar aquest resultat, vam determinar, mitjançant western blot, els nivells d'expressió i activació de caspasa 9 i el nivell de proteolisi de PARP, que s'associaven amb la inducció d'apoptosi en els experiments *in vitro*. Vam observar un nivell significatiu d'activació per proteolisi de la caspasa-9 en els tumors ortotòpics tractats que no s'observava en els controls (**Figura 53**). A més, els tumors ortotòpics tractats presentaven més proteolisi del substrat de caspases PARP que els tumors control. De nou, aquests resultats reproduïen troballes fetes en els estudis *in vitro* i són consistents amb l'observació d'inducció d'apoptosi en els tumors ortotòpics tractats amb celecoxib.

A diferència de les observacions en el model ortotòpic, en els tumors subcutanis el celecoxib no activava la procaspasa 9, ja que no observàvem proteolisi d'aquesta proteïna ni en el grup tractat ni en el control (**Figura 54**). De manera consistent, el celecoxib tampoc induïa la proteolisi del substrat de caspases PARP. Això concorda amb l'absència d'inducció d'apoptosi observada en els tumors subcutanis.

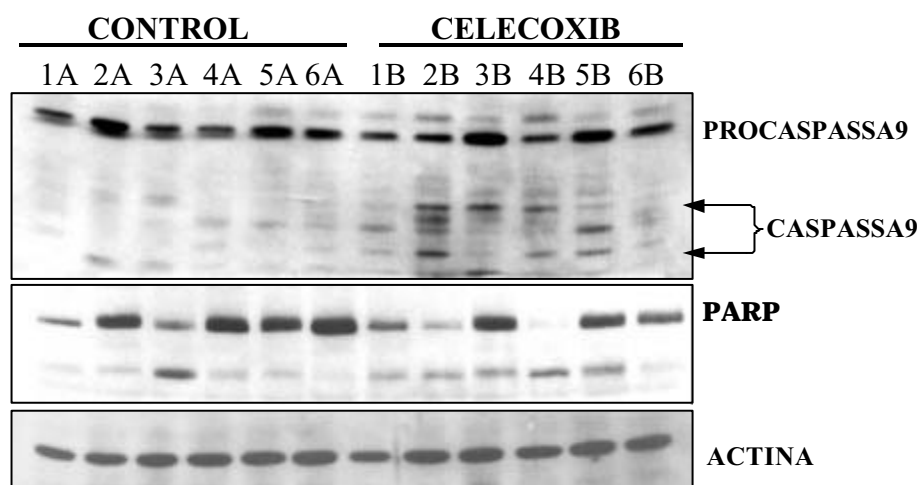


Figura 53. Anàlisi per western blot de l'expressió i activació de caspasa-9 i de proteolisi de PARP en tumors ortotòpics control i tractats amb celecoxib. Els nivells de β -actina s'han determinat com a control de càrrega proteica.

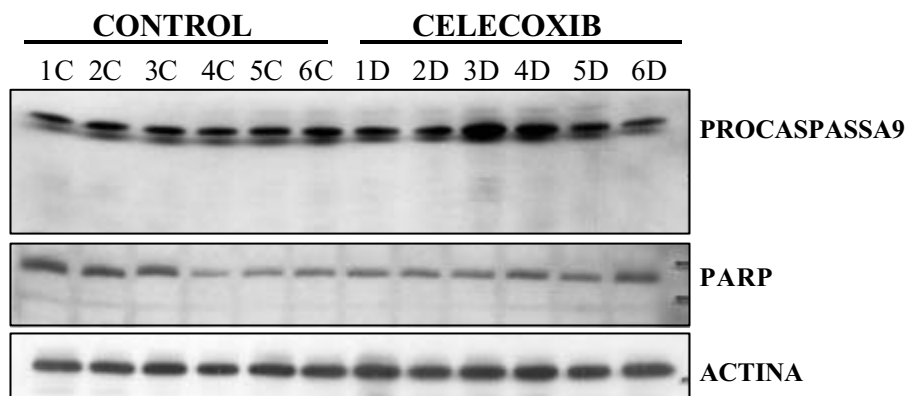


Figura 54. Anàlisi per western blot de l'expressió i activació de caspasa-9 i de proteolisi de PARP en tumors subcutanis control i tractats amb celecoxib. Els nivells de β -actina s'han determinat com a control de càrrega proteica.

6.8 El celecoxib indueix la desregulació de les proteïnes implicades en els contactes focals en els tumors ortotòpics

A continuació, vam analitzar si el celecoxib alterava l'expressió i/o l'activació de les proteïnes de les adhesions focals en els tumors ortotòpics i subcutanis.

En els tumors trasplantats ortotòpicament, el tractament amb celecoxib, malgrat no alterar el nivell d'expressió de la proteïna Fak, disminuïa significativament la seva fosforilació en Tyr397 (**Figura 55**). Aquest fàrmac disminuïa també la fosforilació en Tyr418 de la proteïna Src. Finalment, l'expressió de p130Cas presentava molta variabilitat tant dins el grup dels tumors control com dels tractats amb celecoxib, de manera que no vam observar una alteració d'aquesta proteïna causada pel celecoxib. El fragment proteolitzat de p130Cas de 31 KDa també presentava variabilitat en ambdós grups de tumors, hi havia però uns nivells d'aquest fragment lleugerament majors en la majoria de tumors tractats respecte als controls. Per tant, el resultat dels tumors ortotòpics *in vivo* reproduïen, en part, la desregulació de les proteïnes reguladores de les adhesions focals observades *in vitro*.

Contràriament a les observacions en el model de xenotrasplantament ortotòpic, el model subcutani no reproduïen les observacions derivades de l'anàlisi molecular *in vitro*. Així, en els tumors trasplantats subcutàniament, el tractament amb celecoxib no alterava ni l'expressió ni la fosforilació de Fak i Src (**Figura 56**). El celecoxib, tampoc alterava significativament l'expressió ni el nivell de proteolisi de la proteïna p130Cas. Aquests

resultats indiquen que en aquesta localització l'efecte del fàrmac difereix del mecanisme observat in vitro.

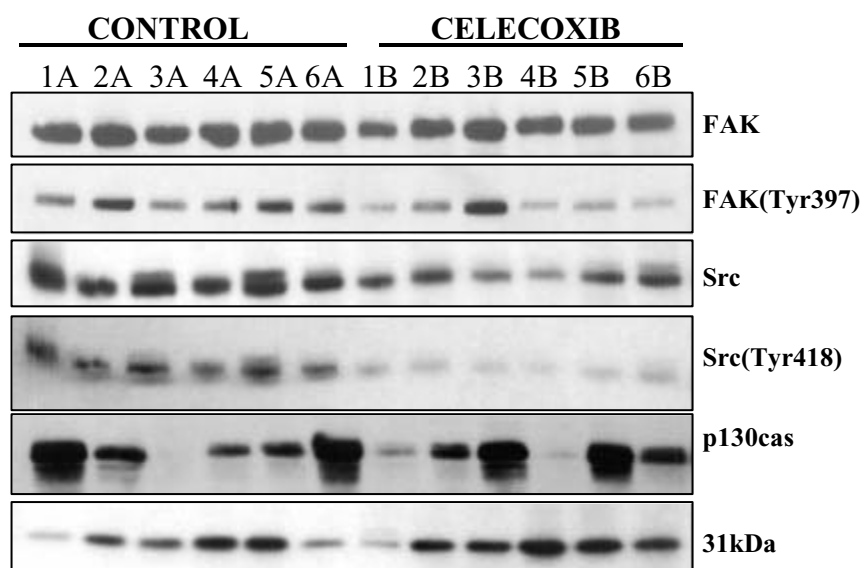


Figura 55. Anàlisi per western blot de l'expressió i activació de Fak i Src i d'expressió i proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en tumors ortotòpics control i tractats amb celecoxib.

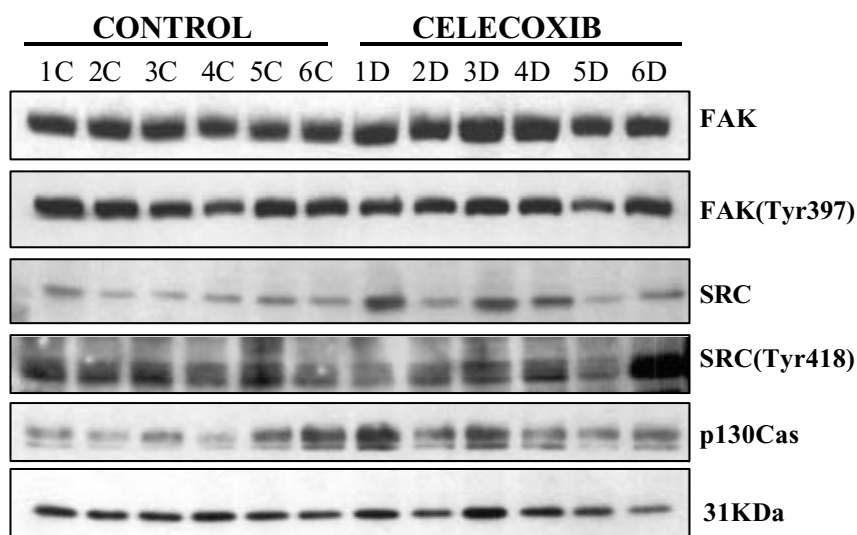


Figura 56. Anàlisi per western blot de l'expressió i activació de Fak i Src i d'expressió i proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en tumors subcutanis control i tractats amb celecoxib.

7. DESENVOLUPAMENT DE NOUS COMPOSTOS ANTITUMORALS

A partir dels resultats obtinguts sobre el mecanisme d'acció del celecoxib, vam iniciar un projecte de col·laboració amb Laboratoris Esteve amb l'objectiu de desenvolupar nous compostos amb el mateix mecanisme d'acció que el celecoxib però més potents com antitumorals. Partint de la base que l'efecte del celecoxib no depèn de la seva capacitat d'inhibir COX-2, el mètode de cribatge no estava basat en la selecció de compostos amb major capacitat i especificitat d'inhibir COX-2. El nostre objectiu era seleccionar nous compostos d'estructura química relacionada amb els inhibidors de COX-2 que tinguessin un efecte antitumoral major i un mecanisme d'acció semblant.

En estudiar el mecanisme d'acció del celecoxib, havíem vist, d'una banda, que el seu efecte antitumoral era independent de la inhibició de COX-2. D'altra banda, el celecoxib induïa apoptosi a través de la via mitocondrial, amb un ràpida pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules relacionada amb la reducció de l'expressió i/o activitat de les proteïnes de les adhesions focals (Fak, Src i p130Cas). També havíem determinat que el tractament amb celecoxib induïa la proteolisi i posterior localització al nucli de p130Cas revertint-se part de l'efecte del fàrmac per la sobreexpressió d'aquesta proteïna.

El mètode de cribatge de nous compostos antitumorals tenia com objectiu distingir compostos capaços d'induir apoptosi de manera ràpida i potent d'aquells que no compartissin el mecanisme d'acció del celecoxib. Així, buscàvem compostos potents com antitumorals, que induïssin pèrdua d'ancoratge, apoptosi i que, a nivell molecular, alteressin les proteïnes implicades en l'adhesió a la matriu extracel·lular (Fak, Src i p130Cas).

Aquests estudis els vam realitzar en dues línies cel·lulars, TD20 i PC3. La línia TD20 prové d'una carcinoma de còlon humà i és amb la que havíem realitzat tots els estudis sobre el mecanisme d'acció del celecoxib. D'altra banda, també vam treballar amb la línia PC3, derivada d'un carcinoma de pròstata humà per tal de comprovar que els compostos també fossin efectius en un altre tipus tumoral i perquè era d'especial interès pels Laboratoris Esteve.

7.1 Síntesi de nous compostos d'estructura relacionada amb el celecoxib

Per a desenvolupar nous compostos més potents com antitumorals que el celecoxib, Laboratoris Esteve va sintetitzar 9 compostos d'estructura relacionada amb el celecoxib que foren dissenyats basant-nos en els estudis realitzats per Song i col·laboradors (Song et al., 2002; Zhu et al., 2002). En aquests treballs, realitzaven modificacions estructurals del celecoxib dissociant l'activitat inductora d'apoptosi de l'activitat inhibidora de COX-2 de la molècula. En el nostre estudi, vam partir de l'estructura química del compost E6087, molt semblant a la del celecoxib, per a sintetitzar compostos que contenen diferents substituents en l'anell fenil terminal.

Els compostos sintetitzats foren: E7123, E6061, E6122, E6126, E6165, E7029, E6016, E6179 i E6907.

Laboratoris Esteve ens va facilitar l'estructura química de tots ells excepte de l'E7029, i E6907. Tots els compostos són derivats de pirazolines diaril substituïdes amb un radical sulfonamida i contenen diferents substituents en l'anell fenil terminal (**Figura 57**).

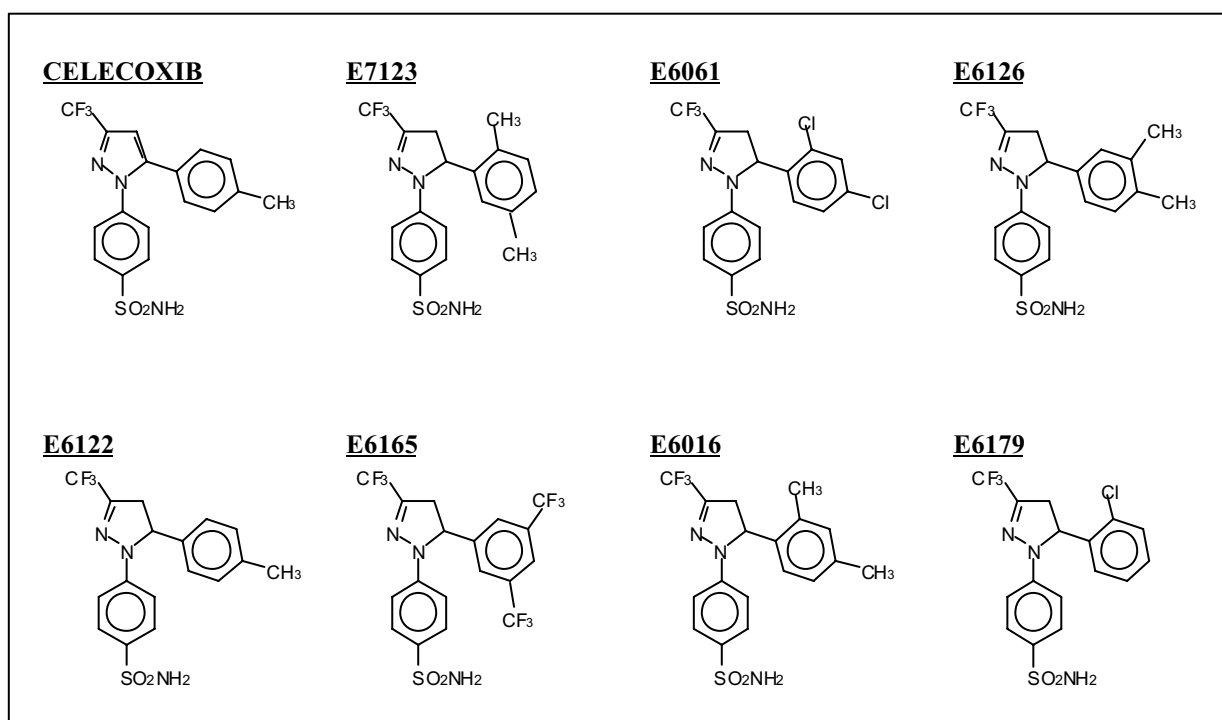


Figura 57. Estructura química del celecoxib i dels nous compostos derivats.

7.2 Posada a punt del mètode de cribatge de nous compostos antitumorals

Fins ara, els assajos de citotoxicitat per XTT dels diferents compostos els realitzàvem a les 60h de tractament doncs era l'interval de temps al que analitzàvem l'efecte de tot tipus de fàrmacs independentment del seu mecanisme d'acció. Havíem observat però, que el celecoxib era efectiu a temps menors ja que tant la pèrdua d'ancoratge com la inducció d'apoptosi es donaven molt abans de les 60h. Per tal de poder diferenciar si els nous compostos sintetitzats per Laboratoris Esteve eren més potents que el celecoxib, vam voler reduir al màxim el temps d'exposició als compostos en fer els assajos de citotoxicitat. D'aquesta manera, distingiríem millor aquells compostos que tinguessin un mecanisme d'acció semblant al celecoxib, amb una ràpida inducció d'apoptosi, i els diferenciaríem d'aquells que, per un mecanisme diferent (ex: aturada del cicle cel.lular), podrien tenir efecte antitumoral a temps llargs però no a temps més curts.

Per això, calia primer de tot determinar quin era el mínim temps d'exposició al qual el celecoxib produïa un efecte antitumoral similar a l'observat a les 60h d'exposició. Amb aquest objectiu, vam realitzar assajos de citotoxicitat per XTT a les 4h, 8h i 16h d'exposició en les cèl·lules TD20 (**Figura 58A**) i vam comparar els valors d' IC_{50} obtinguts (**Figura 58B**) entre ells i amb la IC_{50} a temps llarg (60h) (**Taula 17**). No hi havia diferències significatives entre les IC_{50} a 4, 8 i 16h però sí entre aquestes i la IC_{50} a 60h. De totes maneres, gran part de l'efecte del celecoxib es produïa ja a les 4h. Per aquest motiu vam establir aquest temps per a fer el cribatge de nous compostos.

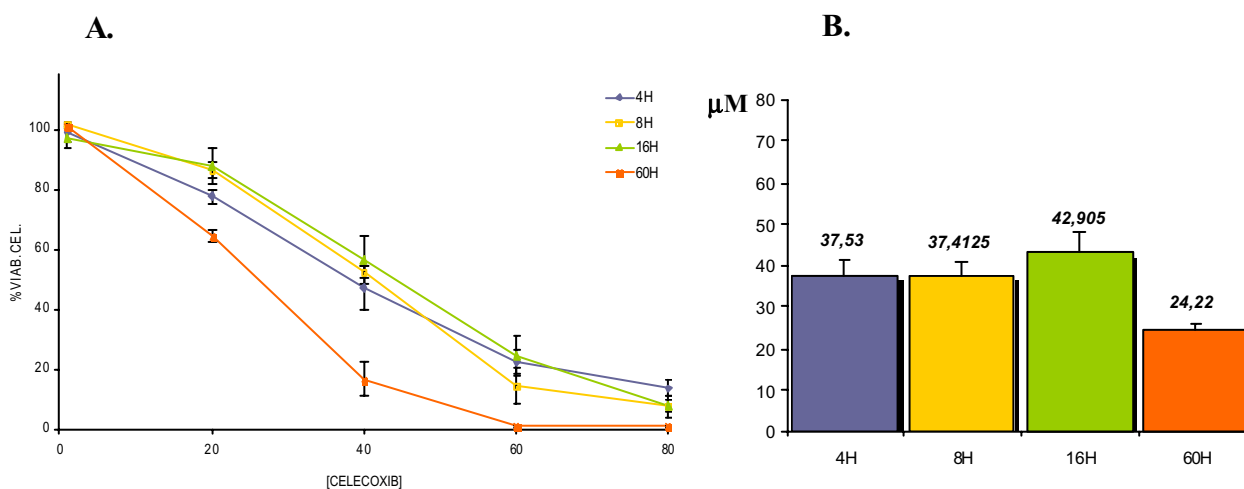


Figura 58. Efecte del celecoxib a diferents temps d'exposició (4h, 8h, 16h i 60h) en les cèl·lules TD20. A. Corbes dosi-resposta mesurades per XTT B. Valors d' IC_{50} per a cada temps d'exposició.

Taula 17. Efecte del celecoxib a diferents temps d'exposició en TD20

TEMPS	IC ₅₀ (μM)	
60 hores	24,22 ± 1.86	<i>p</i> *
16 hores	42,90 ± 4.97	0,026
8 hores	37,41 ± 3.43	0,043
4 hores	37,53 ± 3.52	0,019

Valors d'IC₅₀ expressats com a mitjana ± error estàndard (μM)

* Test U de Mann-Whitney comparant cada IC₅₀ amb la de 60h d'exposició

7.3 El celecoxib és igual d'efectiu a les 60h i 4h d'exposició en les cèl·lules PC3

Per a realitzar el cribatge de nous compostos antitumorals vam utilitzar les línies TD20 i PC3. Calia determinar primer si el celecoxib era efectiu en la línia PC3 i si el seu efecte era diferent a les 4h i 60h d'exposició. Per això, vam realitzar assajos de citotoxicitat per XTT en les cèl·lules PC3 a 4h i 60h d'exposició al celecoxib (**Figura 59A**) i vam analitzar si hi havia diferències estadísticament significatives entre les IC₅₀ (**Figura 59B**). La IC₅₀ del celecoxib a les 60h era de 25,37±1,73 μM mentre que a les 4h era de 30,58±3,17 μM, no hi havia diferències significatives entre ambdues IC₅₀ (p=0,188). Per tant, el celecoxib té efecte antitumoral in vitro en les cèl·lules de carcinoma de pròstata PC3 i aquest efecte és igual a les 4h i 60h d'exposició. Aquest resultat validava també l'ús de 4h com a temps d'exposició pel cribatge dels nous compostos

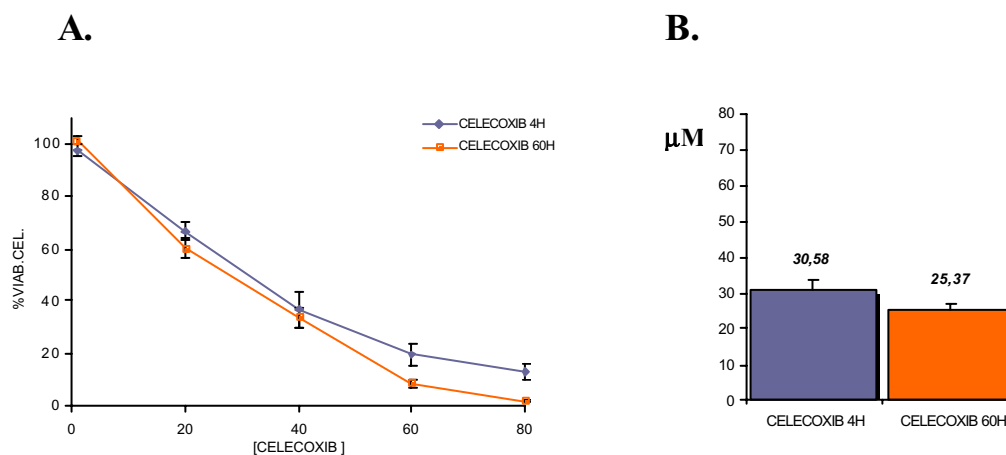


Figura 59. Efecte del celecoxib a 4h i 60h d'exposició en les cèl·lules PC3. **A.** Corbes dosi-resposta mesurades per XTT **B.** Valors d'IC₅₀ per a cada temps d'exposició.

7.4 Cribatge de nous compostos antitumorals mitjançant assajos de citotoxicitat a 4h

Un cop posat a punt el mètode de cribatge, vam determinar l'efecte antitumoral dels compostos sintetitzats per Laboratoris Esteve. Vam realitzar assajos de citotoxicitat per XTT a les 4h d'exposició per a cada compost en les cèl·lules TD20 i PC3. Vam calcular les IC_{50} per a cada compost i vam analitzar si eren més efectius que el celecoxib comparant les IC_{50} (test U de Mann-Whitney).

Tots els compostos estudiats tenien efecte antitumoral in vitro en les cèl·lules TD20 i PC3. Els compostos E7123, E6061, E6126, E6122 i E6165 eren més efectius que el celecoxib ($p < 0,05$) en ambdues línies cel·lulars. L'E6907 també era més efectiu que el celecoxib en les cèl·lules TD20 ($p < 0,05$) però en PC3 tenia el mateix efecte ($p > 0,05$). Els compostos E6016 i E6179 tenien el mateix efecte que el celecoxib en ambdues línies cel·lulars ($p > 0,05$). Finalment, el compost E7029 era igual d'efectiu que el celecoxib en les cèl·lules TD20 ($p < 0,05$) i menys efectiu que el celecoxib en les PC3 ($p < 0,05$). L'E6165 era el compost que presentava major efecte antitumoral en les dues línies cel·lulars estudiades (**Taula 18, Figura 60**)

Taula 18. Efecte del celecoxib i dels nous compostos en les cèl·lules TD20 i PC3

	<i>TD20</i>		<i>PC3</i>	
	IC_{50} (μM)	p^*	IC_{50} (μM)	p^*
CELECOXIB	37,53 \pm 3,52		30,58 \pm 3,18	
E7123	20,49 \pm 2,49	0,009	12,33 \pm 1,36	0,003
E6061	18,32 \pm 1,16	0,002	16,74 \pm 1,06	0,001
E6122	17,49 \pm 1,39	0,004	17,62 \pm 1,81	0,002
E6126	18,55 \pm 1,71	0,002	17,2 \pm 1,68	0,004
E6165	12,87 \pm 0,99	0,001	10,62 \pm 0,55	0,002
E7029	44,24 \pm 3,52	0,153	53,45 \pm 5,00	0,005
E6016	30,26 \pm 1,42	0,240	34,06 \pm 1,81	0,386
E6179	30,58 \pm 2,68	0,083	36,01 \pm 3,36	0,329
E6907	20,80 \pm 1,53	0,002	25,82 \pm 2,80	0,284

Valors d' IC_{50} expressats com mitjana \pm error estàndard (μM)

* Test U de Mann-Whitney comparant la IC_{50} del celecoxib amb cadascun dels compostos

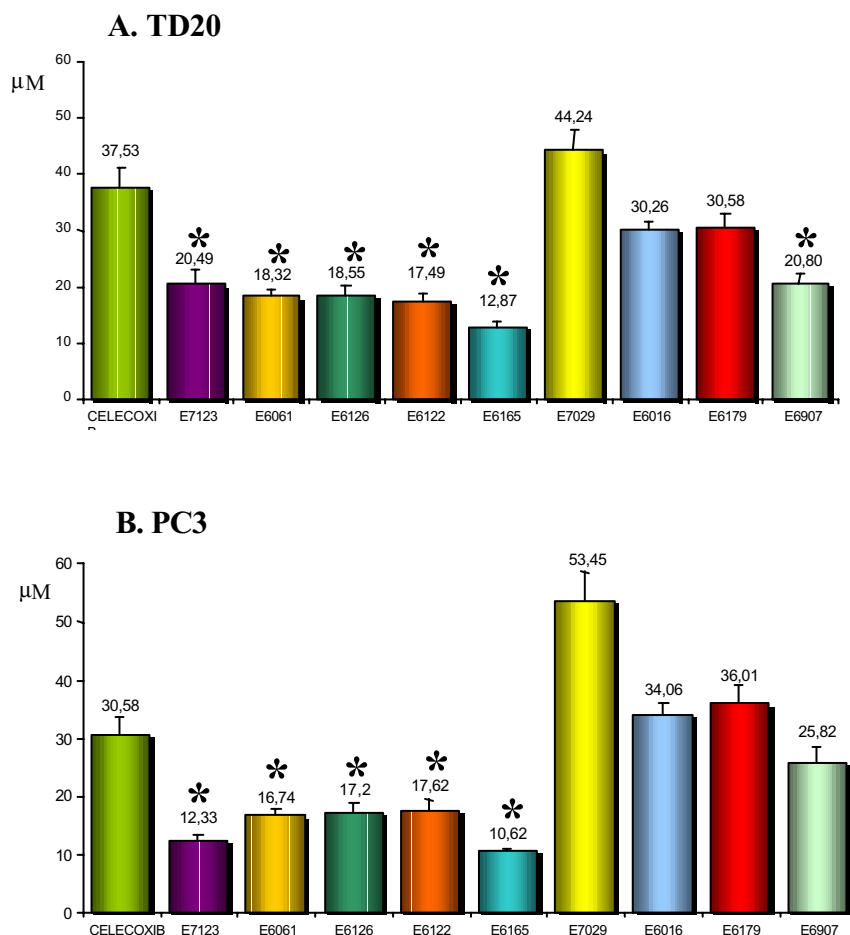


Figura 60. Valors IC₅₀ dels nous compostos analitzats mitjançant XTT a 4 hores en la línia cel·lular TD20 (A) i PC3 (B). * Compostos més efectius que el celecoxib ($p < 0,05$).

7.5 Activitat inhibidora de COX-2 dels nous compostos d'estructura relacionada amb el celecoxib

Els estudis que havíem realitzat prèviament (Capítol 1 de Resultats) indicaven que l'efecte antitumoral in vitro dels inhibidors de COX-2 es produeix per un mecanisme independent de COX-2. Per a confirmar la nostra hipòtesi, vàrem determinar si els nous compostos tenien capacitat inhibidora de COX-2 comparant-la posteriorment amb el seu efecte antitumoral. Com que la disponibilitat dels nous compostos era limitada, només vàrem poder determinar la capacitat inhibidora de COX-2 de cinc d'ells : E6016, E6122, E6165, E6179 i E7123.

Per a determinar la capacitat d'inhibició de COX-2 d'aquests compostos vàrem utilitzar la síntesi de productes de COX com a indicador de l'activitat COX-2. Com ja havíem explicat abans, aquest experiment no es podia fer en les cèl·lules TD20 degut a la seva baixa activitat COX-2 de manera que vàrem utilitzar la línia HCA7 comprovant

prèviament que els compostos eren efectius en aquesta línia cel·lular. Per això, vam realitzar assajos d'XTT a les 60h d'exposició i vam comparar els valors d'IC₅₀ de cada compost amb la del celecoxib (**Taula 19**). En aquest cas vàrem realitzar els assajos de citotoxicitat a temps llargs perquè havíem comprovat que aquesta línia era menys sensible i a 4h el celecoxib tenia molt poc efecte. Els cinc compostos analitzats eren efectius en les cèl·lules HCA7 essent els compostos E6165, E7123 i E6122 més potents que el celecoxib ($p < 0,05$).

Taula 19. Efecte del celecoxib i dels nous compostos en les cèl·lules HCA7

	IC ₅₀	
CELECOXIB	33,78 ± 2,01	<i>p</i>*
E7123	23,5 ± 2,36	<i>0,045</i>
E6122	22,09 ± 1,02	<i>0,006</i>
E6165	17,25 ± 1,37	<i>0,002</i>
E6016	29,86 ± 0,25	<i>0,781</i>
E6179	30,89 ± 1,79	<i>0,463</i>

Valors d'IC₅₀ expressats com mitjana ± error estàndard (µM)

Test U de Mann-Whitney comparant la IC₅₀ del celecoxib amb cadascun dels compostos

A continuació, vam determinar l'activitat inhibidora de COX-2 d'aquests compostos. Com que havíem vist que el celecoxib inhibia completament l'activitat COX-2 a 0,1µM vam tractar primer les cèl·lules HCA7 amb 0,1µM de cada compost i vam determinar la inhibició de la síntesi de productes de COX per HPLC. Cap dels nous compostos analitzats inhibia al 100% l'activitat de COX-2 a 0,1µM i només l'E6122 i l'E6179 tenien activitat inhibidora de COX-2 a aquesta concentració, malgrat que menor que el celecoxib. A continuació, vàrem tractar les cèl·lules HCA7 amb 10µM de cada compost. A aquesta concentració els compostos E6122 i E6179 inhibien completament l'activitat COX-2 mentre que els compostos E6165 i E7123 seguien sense produir cap efecte. El compost E6016 inhibia l'activitat COX-2 tot i que no ho feia al 100%. A 100µM, el compost E6016 inhibia al 100% l'activitat COX-2 mentre que l'E6165 tenia una activitat inhibidora del 61.33%. Finalment, l'E7123 a 100µM no inhibia l'activitat COX-2, essent doncs un compost sense capacitat d'inhibició de COX-2 (**Taula 20**).

En resum, tots els compostos tenien una capacitat d'inhibició de COX-2 menor que el celecoxib, doncs cap d'ells produïa una inhibició del 100% a 0,1µM. A més, el compost E6165, que era el més efectiu com antitumoral en totes les línies estudiades, tenia una activitat inhibidora de COX-2 molt baixa. Finalment, l'E7123, que era més efectiu que el celecoxib, no tenia capacitat d'inhibició de COX-2. En conclusió, l'efecte antitumoral d'aquests compostos no està relacionat amb la seva capacitat d'inhibició de COX-2.

Taula 20. Inhibició de l'activitat COX-2 en cèl·lules HCA7

	0.1µM	10µM	100µM
E6122	36,66 ± 9,78	100	100
E6179	37,46 ± 8,55	100	100
E6016	0	72,89 ± 2,19	100
E6165	0	3,62 ± 6,41	61,33 ± 15,40
E7123	0	0	0

Els resultats s'expressen com percentatge d'inhibició de la síntesi de productes de COX

7.6 Els nous compostos indueixen apoptosi en les cèl·lules TD20 i PC3

El mecanisme d'acció del celecoxib és per inducció d'apoptosi. Per tal de comprovar si tots els nous compostos tenien el mateix mecanisme d'acció que el celecoxib vam realitzar el test d'apoptosi per tinció nuclear. Per això, vam exposar les cèl·lules TD20 i PC3 durant 24 hores als compostos i vam realitzar una tinció nuclear amb colorant Hoescht. Les concentracions utilitzades foren: 60 µM per aquells compostos més potents que el celecoxib i 80 µM pels que tenien efecte similar o menor que el celecoxib.

En ambdues línies cel·lulars vam observar un augment significatiu de cèl·lules apoptòtiques en tractar amb cadascun dels compostos. Les cèl·lules apoptòtiques les identifiquem perquè presenten condensació i fragmentació nuclear. L'E6165 és el compost en el que observarem una major inducció d'apoptosi tant en les cèl·lules TD20 (**Figura 61**) com en PC3 (**Figura 62**), ja que tots els nuclis estaven condensats o fragmentats mentre que amb els altres compostos encara observàvem cèl·lules viables. Aquest fet correlacionava amb el major efecte antitumoral in vitro de l'E6165 en ambdues línies.

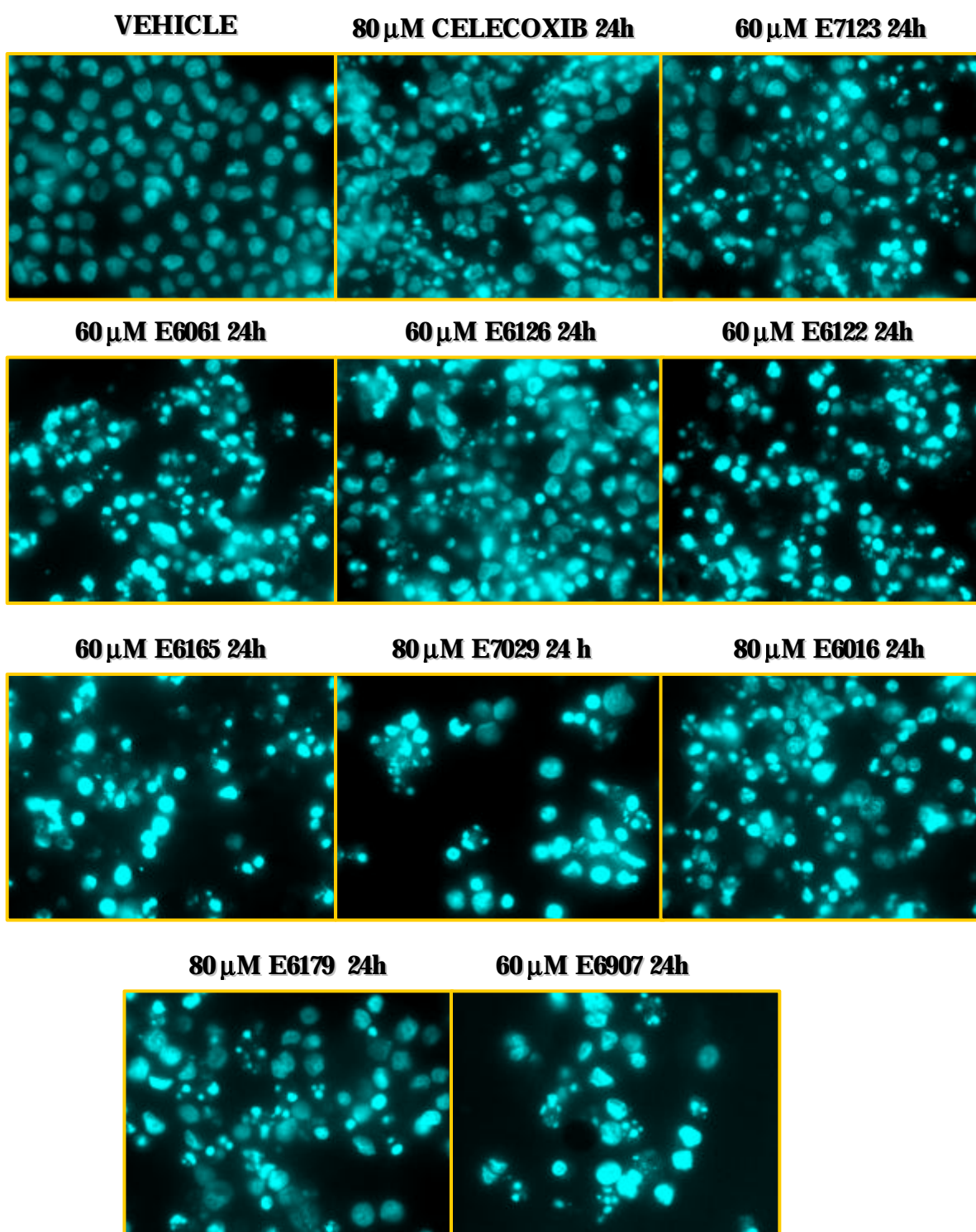


Figura 61. Inducció d'apoptosi causada pels compostos celecoxib, E7123, E6061, E6122, E6126, E6165, E7029, E6016, E6179, E6907 en les cèl·lules TD20 a les 24h d'exposició. Hem realitzat el test d'apoptosi per tinció nuclear amb Hoescht i hem observat les preparacions amb microscopi de fluorescència amb filtre DAPI (400x).

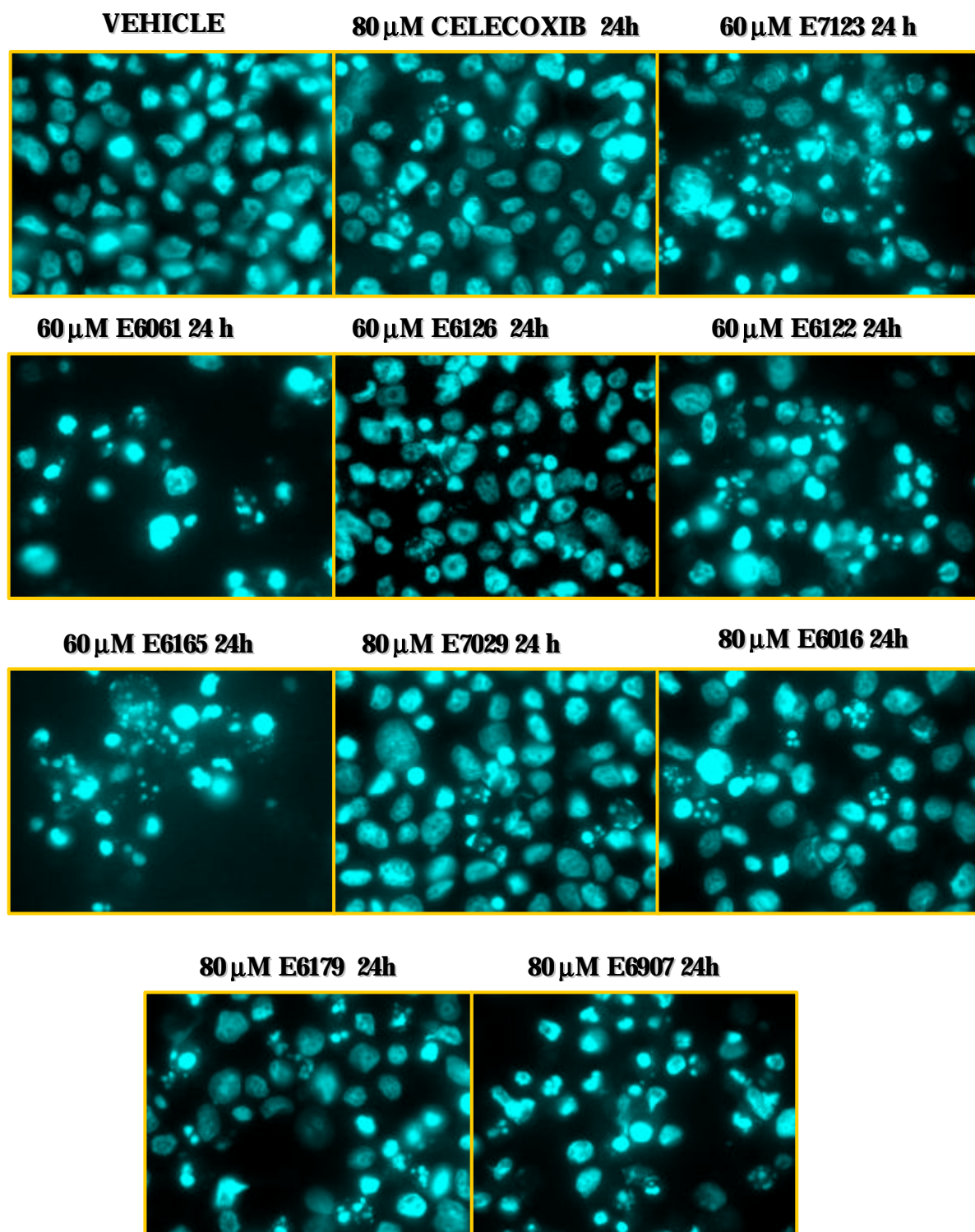


Figura 62. Inducció d'apoptosi causada pels compostos celecoxib, E7123, E6061, E6122, E6126, E6165, E7029, E6016, E6179, E6907 en les cèl·lules PC3 a les 24h d'exposició. Hem realitzat el test d'apoptosi per tinció nuclear amb Hoescht i hem observat les preparacions amb microscopi de fluorescència amb filtre DAPI (400x).

7.7 Els nous compostos indueixen l'apoptosi a través de la sobreexpressió de Bax i l'activació de les caspases 9, 3 i 7

Haviem vist fins ara que els nous compostos relacionats amb el celecoxib, tenien efecte antitumoral *in vitro* i induïen apoptosi. Anteriorment, havíem determinat que la via apoptòtica que induïa el celecoxib era la via mitocondrial a través de la sobreexpressió de Bax, alliberació de citocrom c al citosol, l'activació de la caspasa iniciadora 9 i de les executores 3 i 7. Per tal d'analitzar si la via apoptòtica implicada en l'efecte dels nous compostos era la mateixa que la del celecoxib, vàrem analitzar a nivell molecular l'expressió i/o activació de les diferents proteïnes que havíem vist que es modificaven amb el tractament amb celecoxib. Aquest estudi el vam realitzar en les cèl·lules TD20, doncs ja havíem utilitzat aquesta línia en l'estudi del celecoxib.

Vam analitzar l'activació de proteïnes implicades en la inducció d'apoptosi, determinant el nivell d'activació de les caspases 9,7 i 3 i de proteolisi de PARP així com l'expressió de les proteïnes de la família Bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bad). Per això, vam realitzar extractes de proteïna de les cèl·lules TD20 després de 24 hores d'exposició als compostos a les concentracions utilitzades en el test d'apoptosi i, per Western Blot, vam analitzar els nivells d'expressió i/o activació de les proteïnes.

Tots el compostos induïen l'activació de caspasa 9, 7 i 3 i la proteolisi de PARP (**Figura 63**). D'altra banda, tots els compostos induïen sobreexpressió de Bax mentre que no alteraven l'expressió de Bad ni de Bcl-2 (**Figura 64**). Per tant, tots els compostos induïen apoptosi a través de l'activació de caspasa-9 i de les caspases executores 3 i 7. La sobreexpressió de Bax podria ser la causa de l'activació de caspasa-9 en induir l'alliberament de citocrom c de la mitocòndria. Així doncs, tots els nous compostos estudiats activen la via apoptòtica mitocondrial, la mateixa via activada pel celecoxib.

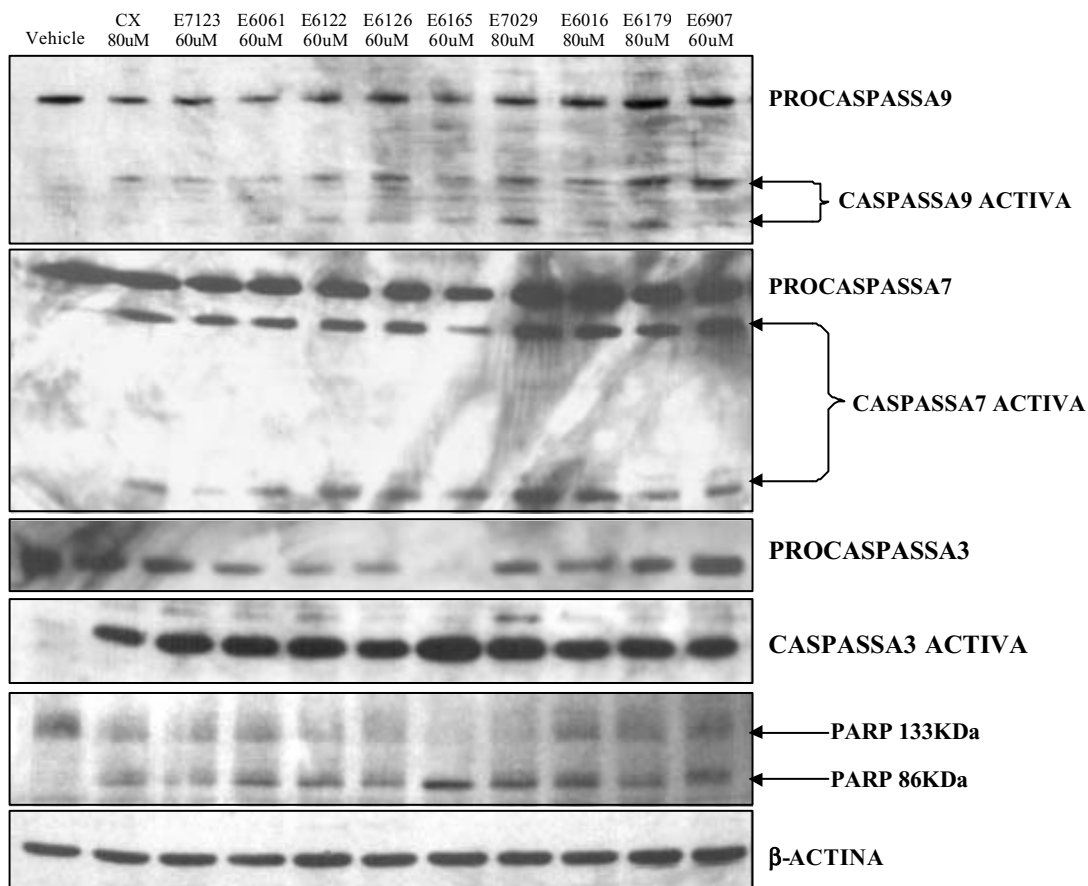


Figura 63. Anàlisi per Western Blot del nivell d'expressió i activació de capasses i proteolisi de PARP en cèl·lules TD20 després de 24 hores de tractament amb els nous compostos. En tots ells s'observa una activació de Caspasa 9,7 i 3 i proteolisi de PARP. El nivells d'expressió d'actina s'han determinat com a control de la càrrega proteica. (CX: Celecoxib)

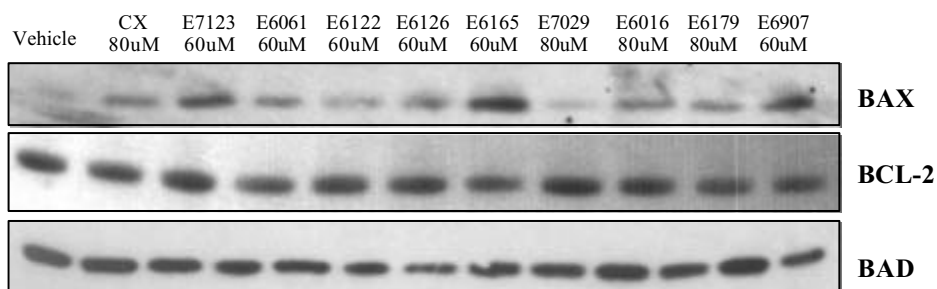


Figura 64. Anàlisi per Western Blot del nivell d'expressió de proteïnes de la família Bcl-2 (Bax, Bcl-2 i Bad) en cèl·lules TD20 després de 24 hores de tractament amb els nous compostos. (CX: Celecoxib).

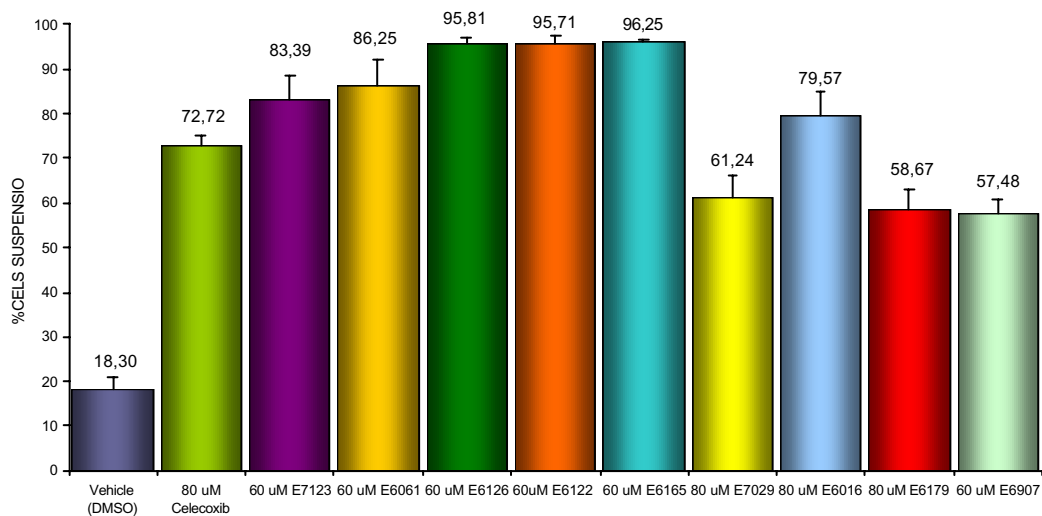
7.8 Els nous compostos indueixen una ràpida pèrdua d'ancoratge en les cèl·lules TD20 i PC3

En estudiar el mecanisme d'acció del celecoxib, havíem observat que induïa una ràpida pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules, que vam quantificar a les 15 hores de tractament. Per tal de seguir caracteritzant si els nous compostos actuaven a través del mateix mecanisme d'acció que el celecoxib, vam analitzar si induïen també una ràpida pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules. Per això, vam tractar les cèl·lules TD20 i PC3 amb els diferents compostos i vam quantificar el percentatge de cèl·lules en suspensió a les 15 hores de tractament. Les concentracions de cada compost utilitzades foren les mateixes que vam fer servir en el test d'apoptosi.

En les cèl·lules TD20, tots els compostos induïen una pèrdua d'ancoratge major al 50%. D'altra banda, en tractar les cèl·lules PC3 amb celecoxib, E7029 i E6016 observàvem un percentatge de cèl·lules en suspensió menor al 50% però la resta de compostos induïen una pèrdua d'adhesió superior al 50% (**Figura 65**)

En general, els compostos que tenien major efecte antitumoral eren els que induïen major pèrdua d'ancoratge en ambdues línies cel·lulars (E6061, E6126, E6122 i E6165) mentre que l'E7029, compost amb menor efecte antitumoral, induïa una menor pèrdua d'ancoratge.

A. TD20



B. PC3

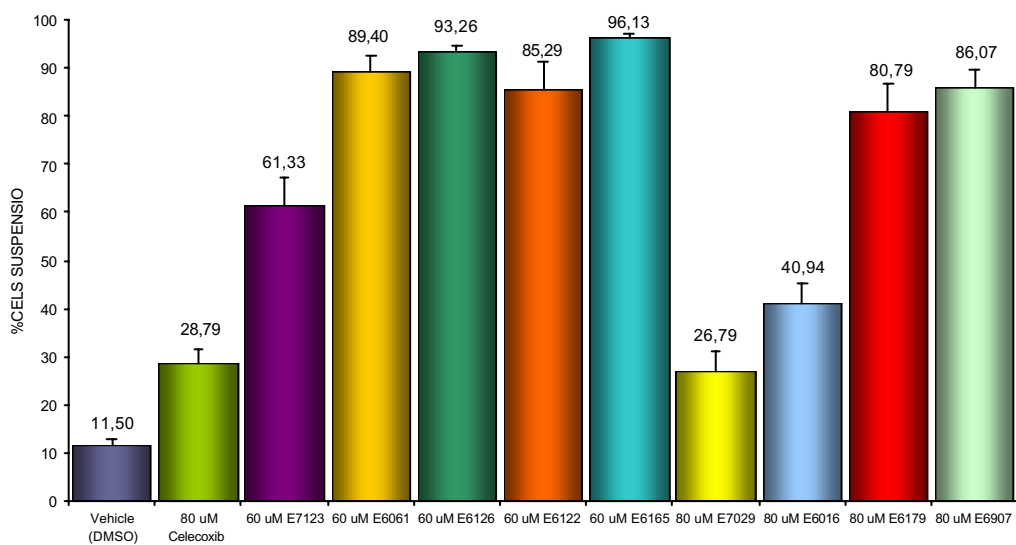


Figura 65. Percentatge de cèl·lules en suspensió a les 15 hores de tractament amb el celecoxib i compostos relacionats en les cèl·lules TD20 (A) i PC3 (B).

7.9 Efecte dels nous compostos en proteïnes de les adhesions focals

En estudiar el mecanisme d'acció del celecoxib, havíem vist que la pèrdua d'ancoratge podia ser explicada pel seu efecte en proteïnes de les adhesions focals. El tractament amb celecoxib alterava l'expressió i/o l'activació d'algunes de les proteïnes implicades en la formació dels contactes focals (Fak, Src i p130Cas). Per a determinar si els nous compostos sintetitzats podien produir aquest mateix efecte, vam analitzar, mitjançant western blot, les mateixes proteïnes que havíem estudiat anteriorment pel celecoxib.

Vam observar que tots els compostos induïen una ràpida i forta disminució de l'expressió de p130Cas fet que ja havíem vist en el tractament amb celecoxib. La majoria dels nous compostos estudiats, induïen la defosforilació de FAK ja a les 24h de tractament, essent aquesta disminució especialment marcada en el compost E6165, que era el més efectiu de tots ells. La fosforilació de Src també disminuïa en tots els compostos especialment en els més efectius. D'altra banda, els nivells d'expressió d'ILK no variaven significativament, observant-se només una lleugera disminució d'ILK en els compostos més potents (E6016, E6122, E6126 i E6165) (**Figura 66**).

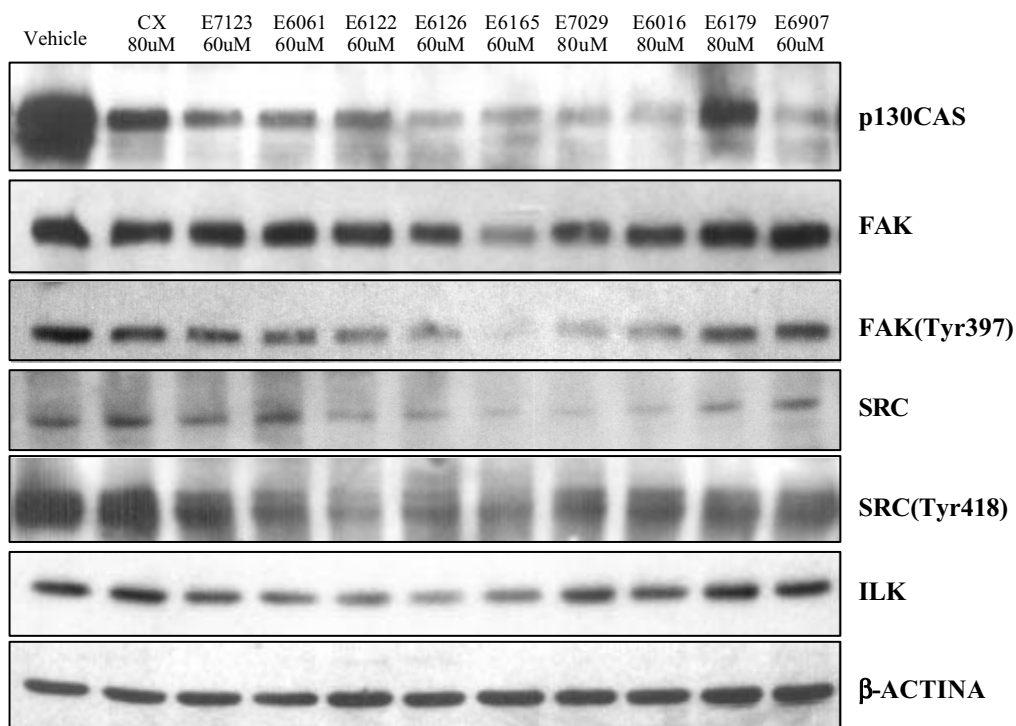


Figura 66. Anàlisi per Western Blot del nivell d'expressió de proteïnes de les adhesions focals en cèl·lules TD20 després de 24 hores de tractament amb els nous compostos antitumorals. (CX: Celecoxib). L'expressió de β -actina s'ha determinat com a control de la càrrega proteica.

En resum, els nous compostos sintetitzats per Laboratoris Esteve amb estructura química relacionada amb el celecoxib tenen efecte antitumoral in vitro, essent alguns d'ells més potents que el celecoxib. El mecanisme d'acció d'aquests compostos és similar al del celecoxib produint una inducció d'apoptosi acompanyada per una sobreexpressió de Bax i activació de Caspasa-9, fet que indica que es tracta d'apoptosi per via mitocondrial.

D'altra banda, aquests compostos també indueixen una ràpida pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules acompanyada d'una desregulació de les proteïnes dels contactes focals, especialment d'una disminució de l'expressió de p130Cas i defosforilació de Fak i Src.

7.10 Els nous compostos indueixen la proteolisi de p130Cas generant un fragment de 31KDa

Tots els nous compostos induïen una disminució de l'expressió de p130Cas. Per a determinar si aquesta disminució era causada per proteolisi, tal i com havíem vist amb el celecoxib, vam determinar per western blot si augmentaven els nivells del fragment de 31KDa, producte de la proteolisi de p130Cas.

Tots els compostos induïen l'augment del fragment de 31KDa fet que indicaria que la baixada de p130Cas és, com a mínim en part, causada per la proteolisi (**Figura 67**).

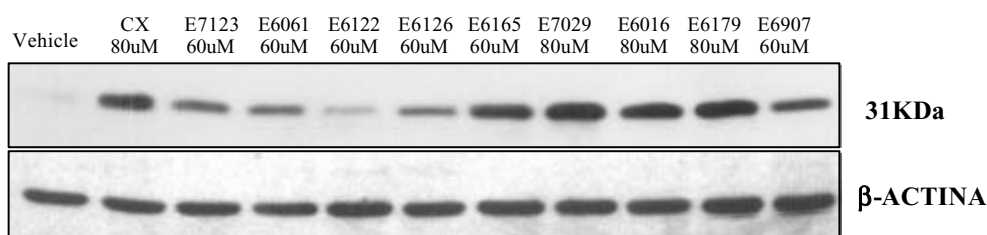


Figura 67. Proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en les cèl·lules TD20 després de 24 hores de tractament amb els nous compostos antitumorals. (CX: Celecoxib). L'expressió de β-actina s'ha determinat com a control de la càrrega proteica.

7.11 p130Cas canvia de localització en les cèl·lules TD20 tractades amb els compostos E6122 i E6165

En estudiar el mecanisme d'acció del celecoxib, vàrem veure que produïa un canvi de localització de p130Cas induint la seva localització nuclear mentre que en les cèl·lules control aquesta proteïna es localitzava en la membrana plasmàtica i en el citosol. Vàrem estudiar doncs si dos dels compostos més efectius, l'E6122 i l'E6165, també tenien aquest mateix efecte en les cèl·lules TD20.

Per això, vam determinar la localització de p130Cas per immunofluorescència en cèl·lules TD20 tractades amb vehicle o 60µM d'E6122 i E6165 durant 24h. En les cèl·lules tractades amb vehicle, com ja havíem vist anteriorment, p130Cas es localitzava principalment en la membrana plasmàtica i en el citosol. En tractar amb el compost E6122 o E6165, observàvem una entrada de p130Cas al nucli probablement degut a l'entrada del fragment de 31KDa (**Figura 68**).

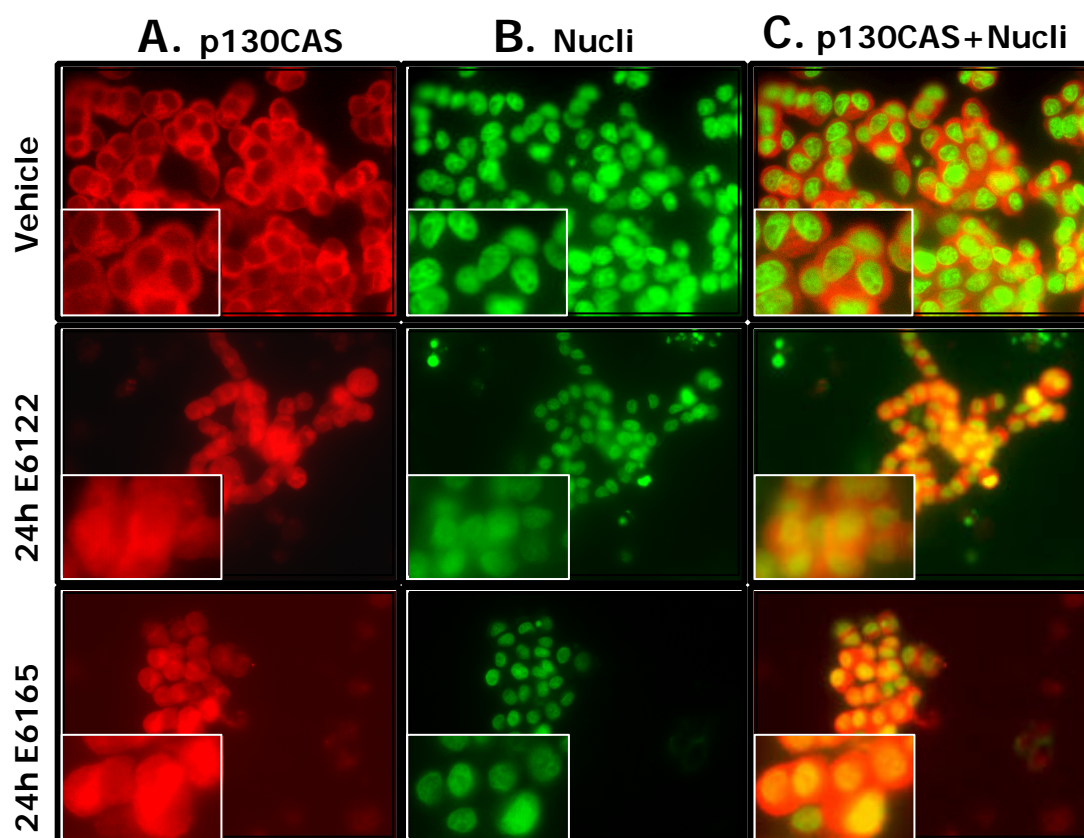


Figura 68. A. Immunofluorescència de p130Cas en cèl·lules TD20 control i tractades durant 24h amb 60µM E6122 o 60µM E6165. B. Tinció amb colorant nuclear Hoescht. C. Combinació de la localització de p130Cas amb tinció de Hoescht.

7.12 La sobreexpressió de p130Cas redueix l'efecte antitumoral in vitro dels compostos E6122 i E6165

En estudiar el mecanisme d'acció del celecoxib, vam comprovar que la sobreexpressió de p130Cas silvestre revertia, en part, l'efecte del celecoxib indicant que p130Cas tindria un paper important en l'efecte d'aquest fàrmac. Per aquest motiu, vàrem analitzar si la sobreexpressió de p130Cas conferia resistència també als nous compostos desenvolupats. Per això, vàrem transfectar les cèl·lules TD20 amb el plàsmid de p130Cas i vàrem realitzar assajos de citotoxicitat amb dos dels compostos estudiats: l'E6122 i l'E6165.

Els transfectants de p130Cas eren més resistents a ambdós compostos que els controls, havent diferències estadísticament significatives entre els valors d'IC₅₀ obtinguts (**Taula 21, Figura 69**). Per tant, la sobreexpressió de p130Cas també reverteix, en part, l'efecte dels compostos E6122 i E6165.

Taula 21. Efecte de la sobreexpressió de p130Cas en la sensibilitat als compostos E6122 i E6165

	pcDNA3	CAS-FL	<i>p</i> *
E6122	24.53 ± 2.19	34.01 ± 1.86	0.032
E6165	20.86 ± 3.55	34.86 ± 3.40	0.045

Valors expressats com mitjana de la IC₅₀ ± Error estàndard (μM)

* Test U de Mann-Whitney comparant la IC₅₀ de cada compost en els dos transfectants

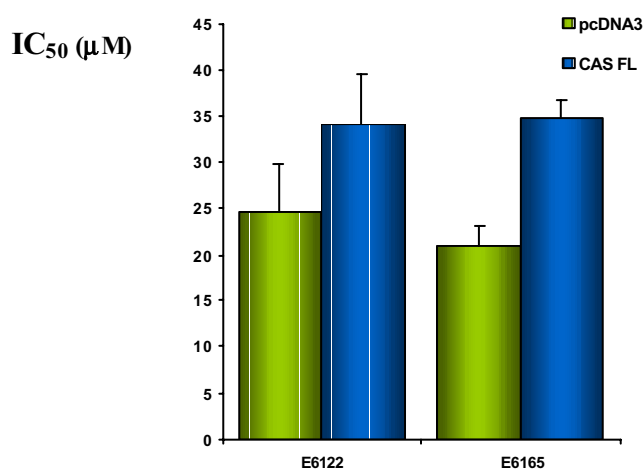


Figura 69. Valors d'IC₅₀ dels compostos E6122 i E6165 en cèl·lules TD20 transfectades amb pcDNA3 (control) o p130Cas (CAS-FL).

