

DISCUSSIÓ

1. ELS COMPOSTOS INHIBIDORS DE COX-2 TENEN UN MECANISME D'ACCIÓ ANTITUMORAL INDEPENDENT DE LA INHIBICIÓ DE COX-2

Les primeres dades que evidenciaren el possible efecte antitumoral dels inhibidors de COX foren dades epidemiològiques que demostraven que els usuaris crònics dels AINEs disminuïen significativament (40-50%) el risc a patir càncer colorectal (Thun et al., 1991; Giovanucci et al., 1994). Més endavant, es demostrà que hi havia dues isoformes de l'enzim COX i que una d'elles, COX-1, s'expressava constitutivament en tots els teixits mentre que l'altra, COX-2, s'expressava en resposta a determinats estímuls com les citoquines inflammatòries, els factors de creixement i els promotors de tumors (Taketo MM, 1998). A més, nombrosos estudis en tumors colorectals i d'altres tipus de càncers, demostraren que un elevat percentatge de tumors sobreexpressen COX-2 (Sano et al., 1995; Hwang et al., 1998; Soslow et al., 2000) . Tots aquests estudis, van fer de COX-2 un diana terapèutica atractiva pel tractament del càncer, especialment el càncer colorectal.

La primera evidència directa del paper de COX-2 en el procés tumoral, fou demostrada pels treballs d'Oshima i col·laboradors (1996). Per determinar el paper de COX-2 en la tumorogènesi colorectal, creuaren ratolins knock outs APC^{Δ716} (model de carcinogènesi colorectal) amb knock outs del gen COX-2 demostrant que els dobles knock outs reduïen significativament el nombre i el tamany dels pòlips intestinals. D'altres estudis, demostraren que la sobreexpressió de COX-2 podia induir transformació cel·lular in vivo (Liu et al., 2001 ; Neufang et al., 2001). Totes aquestes dades, que evidenciaven el paper de COX-2 en la tumorogènesi, van fer que es donés per segur que l'efecte antitumoral dels AINEs i dels inhibidors selectius de COX-2 era causat per la inhibició de COX-2. Tot i així, nombrosos treballs han donat noves evidències tant a favor com en contra d'aquesta hipòtesi i, actualment, encara continua havent controvèrsia sobre el mecanisme d'acció d'aquests compostos.

Determinar si els compostos inhibidors de COX-2 actuen per un mecanisme dependent o independent de COX-2 és important per al futur desenvolupament de nous compostos antitumorals més efectius que els actuals ja que s'han desenvolupat compostos molt potents com inhibidors de COX-2 que després han resultat no tenir efecte antitumoral.

L'efecte antitumoral in vitro de compostos inhibidors de COX-2 no correlaciona amb la seva potència ni selectivitat d'inhibició de COX-2

El primer objectiu del nostre treball era determinar si el mecanisme d'acció antitumoral dels inhibidors de COX-2 era dependent o independent de COX-2. Per això, vam estudiar l'efecte antitumoral de compostos amb diferent capacitat d'inhibició de COX-2 en línies amb diferents nivells d'expressió de l'enzim. D'una banda, volíem determinar si hi havia correlació entre l'activitat inhibidora de COX-2 dels compostos i el seu efecte com antitumorals i, d'altra banda, analitzar també si la sensibilitat de les cèl·lules als compostos depenia dels seus nivells d'expressió de COX-2.

Els nostres resultats demostren que no hi ha correlació en cap de les dues comparacions. D'una banda, l'efecte antitumoral de tres dels compostos inhibidors selectius de COX-2 utilitzats en clínica com antiinflamatoris no correlaciona amb la seva capacitat d'inhibició de COX-2. Vam estudiar l'efecte antitumoral in vitro del valdecoxib, rofecoxib i celecoxib en quatre línies cel·lulars de carcinoma de còlon (HCA7, TD20, HT29 i NC59). Tots tres compostos són molt selectius i potents com inhibidors de COX-2 però presenten diferent efecte antitumoral. El celecoxib és el compost més efectiu com antitumoral de tots tres i té efecte en les quatre línies de carcinoma de còlon analitzades. El rofecoxib, malgrat tenir la mateixa capacitat d'inhibició de COX-2, és molt menys efectiu i gairebé no té cap efecte en les dues línies amb nivells més elevats de COX-2 (HCA7 i TD20). A més, el valdecoxib no té efecte antitumoral en cap de línies estudiades tot i que és també un inhibidor selectiu de COX-2. Aquests resultats estarien en concordança amb els d'altres autors que han demostrat que el rofecoxib no té efecte antitumoral in vitro en cèl·lules IEC18 transformades amb K-ras (Kazanov et al, 2004) ni en un panell de línies cel·lulars tumorals epitelials i hematopoètiques amb diferents nivells d'expressió de COX-2 (Waskewich et al., 2002). Tot i així, alguns treballs han demostrat que el rofecoxib podria ser efectiu com

quimiopreventiu in vivo en models animals de PCF (Apc^{Δ716}) sense alterar però els nivells de COX-2 (Oshima et al., 2001).

Per tal d'analitzar més a fons la possible relació entre la inhibició de COX-2 i l'efecte antitumoral vàrem disposar d'un nou compost inhibidor de COX-2 molt potent i selectiu sintetitzat per Laboratoris Esteve, l'E6087 i dels dos enantiòmers que el formen, l'E6232 i l'E6231. Aquest fet, fou d'especial interès perquè mentre que un dels enantiòmers, l'E6232, és un inhibidor de COX-2 molt potent, l'altre, l'E6231, no inhibeix COX-2 a concentracions molt elevades. Per tant, disposàvem de dos compostos amb la mateixa estructura química i diferent capacitat d'inhibició de COX-2. En analitzar l'efecte antitumoral dels enantiòmers, del seu racèmic, l'E6087, i del celecoxib vam veure que no presentava diferències en cap de les línies estudiades. Per tant, aquests compostos tenen efecte antitumoral independentment de la inhibició de COX-2 doncs tots ells tenen el mateix efecte antitumoral in vitro inclòs l'E6231, que no té capacitat d'inhibir COX-2 en les concentracions utilitzades. Aquests resultats concorden amb altres treballs en els que s'ha demostrat que compostos d'estructura relacionada amb els inhibidors de COX-2 però sense capacitat d'inhibició de COX-2 com sulindac sulfona (Piazza et al., 1995) , R-flurbiprofen (Wechter et al., 1997) i SC560 (Grosch et al., 2001) tenen efecte antitumoral in vitro i in vivo.

Les concentracions necessàries per inhibir la viabilitat cel·lular són molt superiors a les que inhibeixen l'activitat COX-2

Un altre fet que també evidencia la independència de COX-2 en l'efecte antitumoral dels compostos que hem estudiat és que les concentracions necessàries per inhibir la viabilitat cel·lular són molt més elevades que les que es requereixen per inhibir l'activitat enzimàtica de COX-2. En aquest treball, vam determinar les IC₅₀ d'inhibició de l'activitat COX-2 per a cadascun dels compostos estudiats en les cèl·lules HCA7 obtenint uns valors inferiors a 0.1μM pel celecoxib, E6087 i E6232, tots ells inhibidors selectius de COX-2. D'altra banda, les IC₅₀ d'inhibició de la viabilitat cel·lular en aquesta mateixa línia eren, per tots tres compostos, superiors a 20μM. Per tant, les concentracions necessàries per a produir efecte antitumoral eren més de 200 vegades superiors a les que inhibien l'activitat COX-2.

Això demostra que l'efecte antitumoral d'aquests compostos no depèn de la inhibició de COX-2 doncs a les concentracions en les que l'enzim ja està completament inhibit no s'observa cap efecte en la viabilitat de les cèl·lules. Altres autors han obtingut resultats semblants demostrant que les concentracions de NS398 necessàries per a produir efecte antitumoral són molt superiors a les que causen inhibició de COX-2 (Bae et al., 2001). Williams i col·laboradors (2000) van descriure una manca de correlació entre les concentracions de celecoxib necessàries per a produir efecte antitumoral in vitro i in vivo. Així, mentre que, in vitro, les concentracions utilitzades són molt superiors a les que inhibeixen COX-2, in vivo, es requeririen concentracions similars a les que inhibeixen COX-2. Malgrat aquests resultats, obtinguts en models animals, en clínica també s'ha vist que les concentracions necessàries de celecoxib per produir efecte antitumoral són superiors a les que inhibeixen COX-2. Steinbach i col·laboradors (2000), van analitzar l'efecte antitumoral del celecoxib, en pacients de PCF, a dosis de 100 mg i 400 mg. Malgrat que a ambdues dosis s'inhibeix COX-2, només a 400 mg s'observa reducció dels pòlips colorectals.

Una altra aproximació utilitzada per diversos autors per a estudiar el paper de COX-2 en l'efecte antitumoral dels inhibidors de COX-2 consisteix en determinar si l'addició de PGE₂, principal producte de COX-2, al medi de cultiu podia revertir l'efecte produït pels compostos. Tot i així, els resultats tampoc són concordants doncs mentre alguns treballs observen que l'addició de PGE₂ pot revertir l'efecte d'alguns inhibidors de COX-2 (Xiuyuan and Xu, 2001; Sheng et al., 1998) d'altres han obtingut resultats contraris demostrant que l'addició de PGE₂ no altera l'efecte dels compostos inhibidors selectius de COX-2 (Chan et al., 1998; Jiang XH et al., 2002; Elder et al., 2000).

Els nivells d'expressió i activitat de COX-2 de les línies cel·lulars no correlaciona amb la sensibilitat als compostos inhibidors de COX-2

Els nostres resultats indiquen que la sensibilitat de les cèl·lules als compostos inhibidors de COX-2 és independent del seu nivell d'expressió de COX-2. Les quatre línies cel·lulars amb les que hem treballat tenen diferents nivells d'expressió i activitat COX-2 però totes elles són sensibles al celecoxib, a l'E6087 i als seus dos enantiòmers, l'E6232 i l'E6231.

En comparar l'efecte de cada compost en les quatre línies hi havia poques diferències entre la seva sensibilitat als compostos i, a més, les cèl·lules HCA7 eren una mica més resistents a alguns d'ells tot i ser les que tenien major nivell d'expressió de COX-2 i de síntesi de prostaglandines. D'altra banda, les cèl·lules NC59, que no tenen nivells d'expressió de COX-2 ni síntesi de prostaglandines detectables eren, en alguns casos, més sensibles que les altres línies. Altres treballs també han demostrat la manca de correlació entre nivells d'expressió de COX-2 i sensibilitat a diferents compostos inhibidors de COX-2 (Elder et al., 1997; Molina et al., 1999; Grosh et al., 2001; Waskewich et al., 2002).

D'altra banda, també hi ha estudis que descriuen una correlació entre els nivells d'expressió de COX-2 i la sensibilitat de les cèl·lules als inhibidors de COX-2. Alguns treballs demostren que compostos inhibidors de COX-2 són efectius en línies que sobreexpressen COX-2 mentre que no tenen efecte en d'altres que no expressen l'enzim (Sheng et al., 1997; Souza et al., 2000). Tot i així, molts d'aquests estudis comparen només dues o tres línies cel·lulars de manera que les diferències de sensibilitat poden ser degudes al diferent background genètic. En un treball de Pyo i col·laboradors (2001), utilitzen una mateixa línia cel·lular transfectada amb el cDNA de COX-2 o amb l'antisense de manera que amb un mateix background genètic analitzen la influència de l'expressió de COX-2 en l'efecte d'un inhibidor de COX-2, NS-398, en combinació amb radiació. Només són sensibles a l'inhibidor de COX-2 les cèl·lules amb alts nivells de COX-2. Malgrat això, les cèl·lules resistents també expressaven COX-2 encara que en nivells més baixos. Estudis semblants però, han obtingut resultats contraris. Williams i col·laboradors (2000), analitzaren la sensibilitat de fibroblasts de ratolí COX-2 (+/+), (+/-) i (-/-) derivats de ratolins C57BL/6J que tenien, per tant, el mateix background genètic i només diferien en els nivells d'expressió de COX-2. En aquest cas, l'efecte antitumoral del celecoxib no presentava diferències entre cap de les línies, indicant que la sensibilitat de les cèl·lules era independent del nivell d'expressió de COX-2. Un treball recent (Maier et al., 2004) descriu que en línies Caco2 COX (+/+) i COX (-/-) l'efecte apoptòtic del celecoxib seria dependent de l'expressió de COX-2 mentre que l'aturada del cicle cel·lular seria independent de COX-2. En conclusió, encara que en la literatura els resultats són contradictoris i depenen molt del compost estudiat i del model cel·lular utilitzat, els treballs que argumenten la implicació de COX-2 es basen, en molts casos, només en correlacions que no acaben de demostrar la dependència de la inhibició de COX-2 en l'efecte dels compostos. D'altra

banda, el estudis amb knock outs de COX-2 sí que demostren clarament la no implicació de COX-2 en l'efecte antitumoral, recolzant així els nostres resultats.

Les cèl·lules cultivades en suspensió són més resistents a l'efecte antitumoral dels compostos inhibidors de COX-2 tot i ser igual de sensibles a la inhibició de COX-2

Un altre dels resultats que hem obtingut que ens ha permès demostrar la independència de COX-2 de l'efecte antitumoral d'aquests compostos, fou la diferència de sensibilitat de les cèl·lules HCA7 i TD20 segons si les cultivàvem adherides o en suspensió. En aquest cas, no es pot atribuir les diferències observades a backgrounds genètics diferents doncs una mateixa línia cel·lular tenia diferent sensibilitat als inhibidors de COX-2 depenent de les condicions de cultiu. Les condicions de cultiu han d'implicar diferències en l'expressió de determinats gens que expliquin la diferent sensibilitat de les cèl·lules. Per tal de verificar que no hi hagués diferències en l'expressió o en l'activitat de COX-2 pel fet de cultivar les cèl·lules en adhesió o en suspensió, vam determinar el nivell de la proteïna COX-2 i la seva activitat analitzant els productes de COX per HPLC. En ambdues línies, HCA7 i TD20, no variava cap dels dos paràmetres. A més, també vam comprovar que els compostos inhibien COX-2 amb la mateixa potència en ambdues condicions de cultiu doncs la IC_{50} d'inhibició de l'activitat de COX-2 no presentava diferències quan les cèl·lules estaven cultivades en adhesió o en suspensió. Per tant, hem demostrat que l'efecte dels compostos estudiats és independent de la inhibició de COX-2 ja que aquests inhibeixen amb la mateixa potència l'activitat de l'enzim, independentment de les condicions de cultiu, però inhibeixen molt menys la viabilitat cel·lular de les cèl·lules en suspensió que en adhesió.

Nous compostos químicament relacionats amb el celecoxib tenen major efecte antitumoral i menor capacitat d'inhibir COX-2

En un projecte de col·laboració amb Laboratoris Esteve, havíem avaluat l'efecte antitumoral de diversos compostos amb elevada potència com a inhibidors COX-2 que originalment s'estaven desenvolupant com antiinflamatoris. En aquests estudis, tampoc havíem trobat correlació entre el seu efecte antitumoral i la capacitat d'inhibició de COX-2

(resultats no inclosos en la tesi). Per tant, el criteri de selecció de nous compostos potents com antitumorals no havia de ser la seva capacitat d'inhibició de COX-2, doncs era possible que compostos que no fossin bons inhibidors de COX-2 tinguessin efecte antitumoral. La publicació del treball de Song i col·laboradors (2002) va servir com a premissa per a sintetitzar una sèrie de possibles nous compostos antitumorals. En aquest treball, dissocien l'activitat inductora d'apoptosi de la inhibidora de COX-2. Partint de l'estructura bàsica del celecoxib, sintetitzen nous compostos amb diferents substituents en l'anell fenil terminal determinant que els substituents que aporten major polaritat o volum a l'anell fenil redueixen l'activitat inhibidora de COX-2 dels compostos, mentre que un cert nivell de volum i hidrofobicitat, és essencial per la inducció d'apoptosi. Aquesta separació d'activitats, ens va servir de base per a seleccionar els nous compostos a analitzar.

El compost E6087 té una estructura bàsica semblant a la del celecoxib però amb un doble enllaç menys entre els carbonis 4 i 5 de l'anell pirazol (**Figura 13**). En conseqüència, l'E6087 té un centre quiral en el carboni 5 de la pirazolina que li confereix més mobilitat conformacional. Vam partir de l'estructura bàsica de l'E6087 i vàrem seleccionar nou compostos amb diferents substituents en l'anell fenil terminal. Per a fer la selecció vam basar-nos en els treballs de Song i col·laboradors (Song et al., 2002; Zhu et al., 2002) escollint compostos amb substituents que els conferissin un cert nivell de volum i hidrofobicitat. En avaluar l'efecte antitumoral dels nous compostos, vam veure que tots ells tenien efecte antitumoral in vitro en una línia cel·lular de carcinoma de còlon (TD20) i una de pròstata (PC3), essent cinc d'ells més potents que el celecoxib. D'altra banda, també vam avaluar la capacitat d'inhibició de COX-2 d'alguns d'ells per tal d'avaluar la hipòtesi de treball. Els cinc compostos analitzats tenien menor capacitat d'inhibició de COX-2 que el celecoxib malgrat que tres d'ells eren més potents com antitumorals. El compost E6165 era el més citotòxic in vitro en totes les línies estudiades i tenia una capacitat d'inhibir COX-2 molt baixa. D'altra banda, el compost E7123 no inhibia COX-2 a les concentracions utilitzades en els assajos in vitro però era més efectiu com antitumoral que el celecoxib. Per tant, els nostres resultats recolzen les observacions de Song i col·laboradors (2002) ja que hem vist que la capacitat inductora d'apoptosi i la inhibidora de COX-2 dels compostos estudiats són independents.

2. MECANISME D'ACCIÓ IN VITRO DEL CELECOXIB

El celecoxib indueix apoptosi, caspasa dependent, a través de la via mitocondrial

L'efecte antitumoral del celecoxib en cèl·lules en adhesió és causat, al menys en part, per la inducció d'apoptosi tant en les cèl·lules TD20 com en les HCA7. Aquesta conclusió està recolzada per l'observació de condensació i fragmentació nuclear i l'activació de caspases per exposició al fàrmac. Aquest compost activa primer la caspasa 9 (iniciadora) i després les caspases executores 3 i 7 que generen, seguidament, la proteolisi del seu substrat PARP. A més, la reversió parcial dosi-dependent de l'efecte antitumoral del celecoxib, causada per l'inhibidor de pancaspases zVADfmk, indica que la inducció d'apoptosi per celecoxib es dependent de l'activació de caspases.

La manca d'activació de la caspasa 8 i l'activació per proteolisi de la caspasa 9, associada a l'alliberació de citocrom c al citosol, indica que la inducció de l'apoptosi es dona, fonamentalment, activant la via mitocondrial. L'activació de la procaspasa-9 té lloc en l'apoptosoma, complex format per Apaf-1, citocrom c i dATP/ATP, quan s'allibera el citocrom c de la mitocòndria (Zou et al., 1999). L'augment en l'expressió de la proteïna proapoptòtica Bax, a temps curts, suggereix la seva possible implicació en la sortida de citocrom c de la mitocòndria en el nostre model. Les proteïnes de la família de Bcl-2 regulen la formació de porus en la membrana mitocondrial inhibint o induint la sortida de citocrom c (Cory et al., 2002). Contràriament, els canvis d'expressió en les proteïnes proapoptòtica Bad i antiapoptòtica Bcl-2 es donen a temps més llargs, després de la inducció d'apoptosi, motiu pel qual, en el nostre sistema, no semblen estar implicades en aquest procés. Malgrat aquestes observacions, cal encara caracteritzar més estretament tot el procés, determinant la formació d'heterodímers o homodímers de proteïnes de la família Bcl-2, els canvis de localització de Bax i els nivells de fosforilació de Bad, tots ells processos importants en la regulació de l'alliberament de citocrom c de la mitocòndria (Burlacu A, 2003).

Contràriament a l'efecte del celecoxib en la inducció de mort cel·lular programada, no hem pogut demostrar un efecte clar sobre el cicle cel·lular per part del celecoxib. Així, malgrat que el nivell d'expressió d'algunes ciclines (D3, A i B1) reduïa significativament, aquest efecte es donava generalment a temps llargs (48-72 h). D'altra banda, els nivells de l'inhibidor dels complexos CDK/ciclina, p21 disminueixen a les 24h en una de les línies cel·lulars. Mentre la reducció de ciclines podria indicar una aturada del cicle, la reducció concomitant de p21 (en TD20) argumenta en contra d'aquest efecte. D'altra banda, l'observació de que la major part de l'efecte antitumoral del celecoxib passa ja a les 4h (quan es compara amb l'efecte a les 16 o 60 h), abans de que pugui aturar-se el cicle, argumenta a favor de la inducció d'apoptosi, independent d'aturada de cicle, com el principal component del mecanisme d'acció del celecoxib.

El mecanisme d'acció antitumoral *in vitro* del celecoxib, així com el d'altres inhibidors de COX, ha estat àmpliament estudiat en diferents models cel·lulars. Els nostres resultats coincideixen amb d'altres estudis que demostren que el celecoxib indueix apoptosi en cèl·lules de carcinoma de còlon (Arico et al., 2002; Yamazaki et al., 2002) i també en cèl·lules derivades d'altres tipus tumorals com el carcinoma de pròstata (Johnson et al., 2002), colangiocarcinoma (Wu et al., 2003; Zhang et al., 2004) o carcinoma hepatocel·lular (Leng et al., 2003).

En molts d'aquests treballs també conclouen que el celecoxib activa la via mitocondrial dependent de l'activació de la caspasa-9 i l'alliberament de citocrom c de la mitocòndria (Lai et al., 2003; Jendrossek et al., 2003; Wu et al., 2004). La importància de la regulació de Bax pels fàrmacs inhibidors de COX es va inferir de l'observació que cèl·lules de carcinoma de còlon *bax*^{-/-} perden la sensibilitat a l'efecte apoptòtic de la Indometacina i el Sulindac (Zhang et al., 2000). Així, s'ha associat l'efecte del celecoxib a la sobreexpressió de Bax (Zhang et al., 2004), però també a d'altres vies independents de Bax (Wu et al., 2003; Han et al., 2004).

També hi ha d'altres autors que han descrit que el celecoxib no indueix apoptosi sinó una aturada del cicle cel·lular en G0/G1 (Kundu et al., 2002) amb sobreexpressió de p21 i p27 i disminució de ciclina A i B1 (Grosch et al., 2001) en cèl·lules de carcinoma de mama i còlon.

El celecoxib indueix la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules i la desregulació de les adhesions focals

En estudiar la inducció d'apoptosi pel celecoxib vam observar, especialment en la línia TD20, que les cèl·lules es desenganxaven de la placa molt abans d'entrar en apoptosi, mantenint-se viables encara durant unes hores. Aquest fet, juntament amb la desregulació que es produeix de les principals proteïnes que formen les adhesions focals, ens suggereix que l'efecte del celecoxib podria ser degut a la inducció d'anoikis, és a dir, a una apoptosi produïda per la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules. Malgrat aquesta observació, cal distingir l'anoikis de la desregulació de les adhesions focals, que es dona en les darreres fases de l'apoptosi i que, per proteolisi de les proteïnes dels contactes focals, també provoca la pèrdua d'ancoratge (Chan et al., 1999). El fet que la sobreexpressió de p130Cas, en el nostre model, reverteixi en part l'efecte del celecoxib i que la pèrdua d'ancoratge es doni abans de que les cèl·lules adquireixin la morfologia típica de l'apoptosi, recolza la hipòtesi de que la pèrdua d'ancoratge seria la causa, més que una conseqüència de l'efecte apoptòtic del celecoxib.

En aquest sentit, l'alteració observada en Fak, Src i p130Cas podria explicar la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules i la inducció d'apoptosi produïda pel tractament amb celecoxib. La disminució de la fosforilació d'aquestes proteïnes en tirosina, observada en les dues línies cel·lulars exposades al fàrmac, és consistent amb la dissociació de les adhesions focals ja que la seva fosforilació és necessària pel manteniment del complexe Src/FAK/p130Cas i la senyalització downstream (Schaller MD, 1994; Sattler et al., 1997). Així, el celecoxib indueix una disminució de la senyalització a través de FAK alhora que citotoxicitat. Per observar la possible implicació causal d'aquesta proteïna en l'efecte del fàrmac vam fer transfectants amb Fak (FAK-myr) constitutivament activat. L'activació de FAK no alterava la citotoxicitat del celecoxib quan s'exposaven al fàrmac, ni alterava la regulació de les vies de transducció de senyal "downstream" dels contactes focals (Erk1, Erk2, Akt, Rac-1 i p130Cas), quan no estaven exposats al fàrmac, suggerint que Fak no estava directament implicada en el mecanisme d'acció del celecoxib.

En induir citotoxicitat, el celecoxib no alterava els nivells d'expressió de Src, però sí que disminuïa la seva fosforilació, a temps curts, en les cèl·lules TD20, suggerint una possible

implicació d'aquesta proteïna en l'efecte del fàrmac, al menys en aquesta línia. Aquesta possibilitat però, tampoc va ser constatada en els experiments amb transfecció del gen. Així, els transfectants amb Src constitutivament activat (Src 531) no alteraven la citotoxicitat del celecoxib quan s'exposaven al fàrmac ni alteraven la regulació de les vies implicades de transducció de senyal downstream dels contactes focals (Erk, Akt, Fak, Rac-1), excepte per un augment de la fosforilació de p130Cas, quan no eren exposats al fàrmac. Per tant, l'activació de Src no és suficient per revertir la citotoxicitat induïda pel celecoxib, indicant que no és fonamental en l'efecte citotòxic del celecoxib, malgrat que pot ser regulada indirectament com a conseqüència de l'efecte del fàrmac.

Malgrat això, la inhibició de la via de Src té un efecte cooperatiu amb el celecoxib en la inducció d'efecte antitumoral. Així, l'exposició de les cèl·lules a l'inhibidor específic de Src, PP2, conjuntament amb celecoxib dóna un efecte sinèrgic en el cas de TD20, al produir una reducció de la viabilitat superior a l'efecte d'ambdós compostos per separat. D'altra banda, en les cèl·lules HCA7, l'inhibidor de Src, PP2, redueix la viabilitat cel·lular a menys del 50% indicant que aquestes cèl·lules requereixen l'activació de Src per a sobreviure. Tot i així, la combinació amb el celecoxib té un efecte additiu reduint encara més la viabilitat de les cèl·lules. Aquestes observacions suggereixen que el celecoxib indueix l'efecte antitumoral inhibint un altra via relacionada amb els contactes focals addicional a la via de Src. Aquesta via i la que activa Src podrien cooperar en la senyalització necessària pel creixement en adhesió, ja que la inhibició d'ambdues vies inhibeix la viabilitat cel·lular de forma sinèrgica (en TD20).

D'altra banda, el fet que l'activació i l'expressió d'Akt disminuïssin a temps llargs (72h) d'exposició a celecoxib en ambdues línies cel·lulars i que l'inhibidor de la via PI3K/Akt, Wortmannin, no variava la sensibilitat al celecoxib, indica que el mecanisme d'acció del celecoxib no implica aquesta via, en el nostre model. La inactivació d'aquesta via (PI3K/Akt) ha estat relacionada amb la inducció d'apoptosi per nombrosos fàrmacs antitumorals inclòs el celecoxib (Wu et al., 2003; Zhang et al., 2004). Alguns treballs però, també descriuen la inducció d'apoptosi pel celecoxib independent de la defosforilació d'Akt (Kern et al., 2002) i la manca de reversió de l'efecte d'aquest fàrmac per reactivació d'aquesta via (Arico et al., 2002). La determinació de la implicació o no de la via d'Erk1, que es defosforilava pel tractament amb celecoxib en ambdues línies cel·lulars, necessita

estudis addicionals.

Un altre dels efectors de les adhesions focals que vam estudiar fou Rac-1, veient que la seva expressió disminuïa amb el tractament amb celecoxib. Rac-1 és una proteïna de la família de les Rho GTPases implicada en la reorganització del citoesquelet i la formació de lamelopòdies (Nobes and Hall, 1995). L'activació constitutiva de Rac-1, en fibroblasts, induïx el creixement independent d'ancoratge i tumorigènesi en ratolins atímics (Qiu et al., 1995). A més, també s'ha relacionat l'activitat de Rac-1 amb anoikis ja que la seva activació constitutiva protegeix les cèl·lules (MDCK) de l'anoikis mentre que la seva inhibició, amb dominants negatius, induïx anoikis (Coniglio et al., 2001). Per tant, malgrat que no hem determinat l'activació de Rac-1 sinó només la seva expressió, el fet de que disminueixi a temps curts (24h) suggereix que podria ser important en la inducció d'anoikis pel celecoxib.

L'efecte citotòxic del celecoxib comporta la proteolisi i translocació al nucli de p130Cas

El celecoxib induïa alteracions intenses i tempranes en la proteïna p130Cas, implicada en les adhesions focals, a diferència del seu efecte sobre les proteïnes Fak i Src que era més suau i a temps llargs. La disminució dels nivells d'expressió de p130Cas era ràpida, essent ja 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, potser a causa de que els nivells de fosforilació eren més baixos i l'anticòs utilitzat era de baixa afinitat.

La disminució en els nivells de p130Cas era causada, com a mínim en part, per la seva proteolisi doncs alhora que disminuïa l'expressió de p130Cas augmentaven els nivells d'un fragment de 31KDa, producte de la seva degradació. La fragmentació de p130Cas s'ha associat prèviament a la inducció d'apoptosi per diferents agents (Kook et al., 2000; Law et al., 2000; Shim et al., 2001; Weng et al., 1999). Aquesta proteolisi pot ser causada per l'activitat de les caspases (Kook et al., 2000) i de les calpaines (Shim et al., 2001). D'altra banda, Wei i col·laboradors (2004) han descrit que la proteolisi de p130Cas en l'anoikis, es

donaria abans de l'activació de les caspases i les calpaines, essent causada per l'acció d'altres proteases que iniciarien l'anoikis. En el nostre treball no hem determinat quines proteases són responsables de la proteolisi de p130Cas tot i que la reversió de l'efecte del celecoxib per l'inhibidor de caspases, zVADfmk, suggereix una possible implicació d'aquestes proteases. Tot i així, calen nous estudis per a determinar si la proteolisi de p130Cas es dona abans o després de l'activació de les caspases i si podria haver d'altres proteases implicades en aquest procés.

La disminució de l'expressió i activació de p130Cas pot tenir efecte apoptòtic a través de dos mecanismes (**Figura 70**). D'una banda, causa la desorganització dels contactes focals inhibint així la senyalització a través de vies de supervivència i antiapoptòtiques (Almeida et al., 2000; Bouton et al., 2001; Cho and Klemke 2000). D'altra banda, el fragment de 31KDa, producte de la seva degradació, pot contribuir al desensamblatge de les adhesions focals actuant com a dominant negatiu, en interaccionar directament amb p130Cas, inhibint la unió als substrats, o bé en unir-se directament als substrats, bloquejant la seva activació (O'Neill and Golemis 2001; Harte et al., 2000; Nakamoto et al., 1997).

D'altra banda, hem vist que el tractament amb el celecoxib altera la localització de p130Cas. Aquesta proteïna es troba normalment localitzada en la membrana plasmàtica, formant els contactes focals, i al citosol. El tractament amb celecoxib produeix que p130Cas es localitzi també al nucli. Aquest canvi de localització pot ser degut a l'entrada del fragment de 31KDa al nucli on s'ha vist que pot tenir un paper actiu en la inducció d'apoptosi. Kim i col·laboradors (2004) han demostrat que el fragment de 31KDa, en ser translocat al nucli, s'uneix als factors de transcripció E2A bloquejant la seva activitat. La regulació de la transcripció mediada per E2A està implicada en la regulació de la supervivència cel·lular i l'apoptosi. Les proteïnes E2A inhibeixen l'activació de caspasa-3 bloquejant la inducció d'apoptosi (Kee et al., 2002) i activen la transcripció de p21 (Prabhu et al., 1997). En els nostres estudis hem vist una disminució de p21 al mateix temps que augmenta el fragment de 31KDa que, per tant, podria ser causada per la inhibició de la transcripció per E2A. A part del seu paper com a inhibidor dels complexos ciclina/CDK, l'expressió de p21 protegeix les cèl·lules de l'apoptosi (Asada et al., 1999; Glaser et al., 2001; Gorospe et al., 1997; Levkau et al., 1998) i la seva inhibició contribueix a l'apoptosi induïda per diversos agents (adriamicina, camptotecina, etoposide...) tant in vitro (Gorospe

et al., 1996; Polyak et al., 1996; Waldman et al., 1996) com in vivo (Tian et al., 2000; Waldmand et al., 1997).

Aquesta funció inductora de l'apoptosi del fragment producte de la proteolisi de p130Cas podria també explicar l'observació que els transfectants que sobreexpressen p130Cas només reverteixen en part l'efecte del celecoxib. La sobreexpressió del p130Cas podria inhibir el desensamblatge dels contactes focals així com l'efecte de dominant negatiu del fragment de 31KDa. Tot i així, no podria inhibir la translocació del fragment de 31KDa i la posterior repressió de la transcripció que faria que el celecoxib continués tenint cert efecte citotòxic malgrat la sobreexpressió de p130Cas.

A més, la sobreexpressió de p130Cas silvestre (CAS-FL), que s'acompanya d'un augment significatiu de la fosforilació d'aquesta proteïna, disminueix significativament l'efecte del celecoxib sense induir canvis ni en els nivells de expressió ni els d'activació de les proteïnes Fak, Src, Akt, Erk1 o Erk2. Per tant, aquestes vies no estarien implicades en la disminució de l'efecte del celecoxib causada per la sobreexpressió de p130Cas. Aquest fet recolzaria els nostres resultats que indiquen que aquestes vies no són importants per l'efecte inductor d'apoptosi del celecoxib. D'altra banda, tampoc vam observar canvis en l'expressió de Rac-1 en els transfectants de p130Cas, malgrat que aquesta proteïna és regulada pels complexos p130Cas-Crk (Cho and Klemke, 2002). Caldria avaluar però si l'activació de Rac-1 (per unió a GTP) està modificada per la sobreexpressió de p130Cas per a poder determinar el seu paper en la reversió de l'efecte del celecoxib. En conseqüència, p130Cas reverteix l'efecte del celecoxib, en part, bloquejant l'acció del fragment de 31KDa producte de la seva degradació i, probablement també, activant d'altres vies de supervivència que seran objecte de futurs estudis.

La inducció d'anoikis pel celecoxib en les cèl.lules de carcinoma de còlon, és similar a l'efecte observat per la sobreexpressió de la fosfatasa LAR, que defosforila i desestabilitza p130Cas (Weng LP, 1999) i contrari al causat per la inactivació de la fosfatasa PTP-PEST que activa constitutivament la fosforilació de p130Cas augmentant el nombre i tamany dels contactes focals (Angers-Llostau A, 1999). Per aquest motiu, ens plantejem explorar en el futur la possible connexió entre l'efecte del celecoxib i aquestes fosfatasses.

D'altra banda, encara no podem definir si la proteïna ILK, també localitzada en les adhesions focals (Li et al., 1999) i relacionada amb la regulació dels contactes focals i amb el creixement independent d'ancoratge (Hannigan et al., 1996), juga o no un paper en l'acció del celecoxib. Fins ara només hem pogut estudiar la seva expressió que disminueix a les 48 h per efecte del fàrmac. Caldria però estudiar també la seva activació que és causada per la unió del producte de PI3K fosfatidilinositol (Dedhar et al., 2000).

Les proteïnes β -catenina i E-cadherina, que formen els contactes cèl.lula-cèl.lula en les unions adherents, no semblen participar en el mecanisme d'acció del celecoxib, ja que la seva expressió només disminueix a temps llargs (72-96h) després de produir-se l'apoptosi, i és probablement conseqüència de la proteolisi generalitzada que es dona en la fase final d'aquest procés. Aquestes proteïnes formen les unions adherents i, a través de la seva interacció amb el citosquelet d'actina, participen en la determinació de l'arquitectura del teixit, alhora que la seva desregulació ha estat relacionada amb anoikis (Kanak and Kramer, 1998; Frisch and Francis, 1994).

Hi ha diverses evidències que indiquen que els fàrmacs antitumorals podrien actuar modulant la senyalització a través dels contactes focals. D'una banda, la pèrdua de l'ancoratge de les cèl.lules a la matriu extracel.lular (ECM) induïx anoikis (Frisch and Ruoslahti, 1997). A més, estudis en el model de ratolí Min/+ indiquen que alguns fàrmacs antitumorals alteren la migració cel.lular, procés també regulat pels contactes focals (Mahmoud et al., 1999). També s'ha vist que cèl.lules epitelials intestinals que sobreexpressen COX-2 són menys sensibles a l'apoptosi i tenen major ancoratge a l'ECM, característiques que són revertides per un fàrmac inhibidor de COX no selectiu, el sulindac sulfide (Tsuiji and Dubois, 1995; Tsuiji et al., 1997). Fins al moment, l'únic treball que relaciona l'efecte dels inhibidors de COX amb la inhibició de la senyalització dels contactes focals és un treball de Weyant i col.laboradors (2000) en el que demostren que el sulindac sulfide induïx, en cèl.lules de carcinoma de còlon, el reordenament del citoesquelet d'actina i la pèrdua de les adhesions focals amb defosforilació de FAK i p130Cas. D'altra banda, també s'ha demostrat que ILK i Src poden ser bones dianes terapèutiques pel tractament del càncer i, actualment, l'empresa Kinetek Pharmaceuticals Inc (Vancouver, Canadà), està desenvolupant inhibidors selectius d'ILK pel seu ús com

antitumorals (Yoganathan et al., 2002), mentre que, AstraZeneca està desenvolupant inhibidors selectius de Src també pel seu ús com antitumorals (Ple et al., 2004).

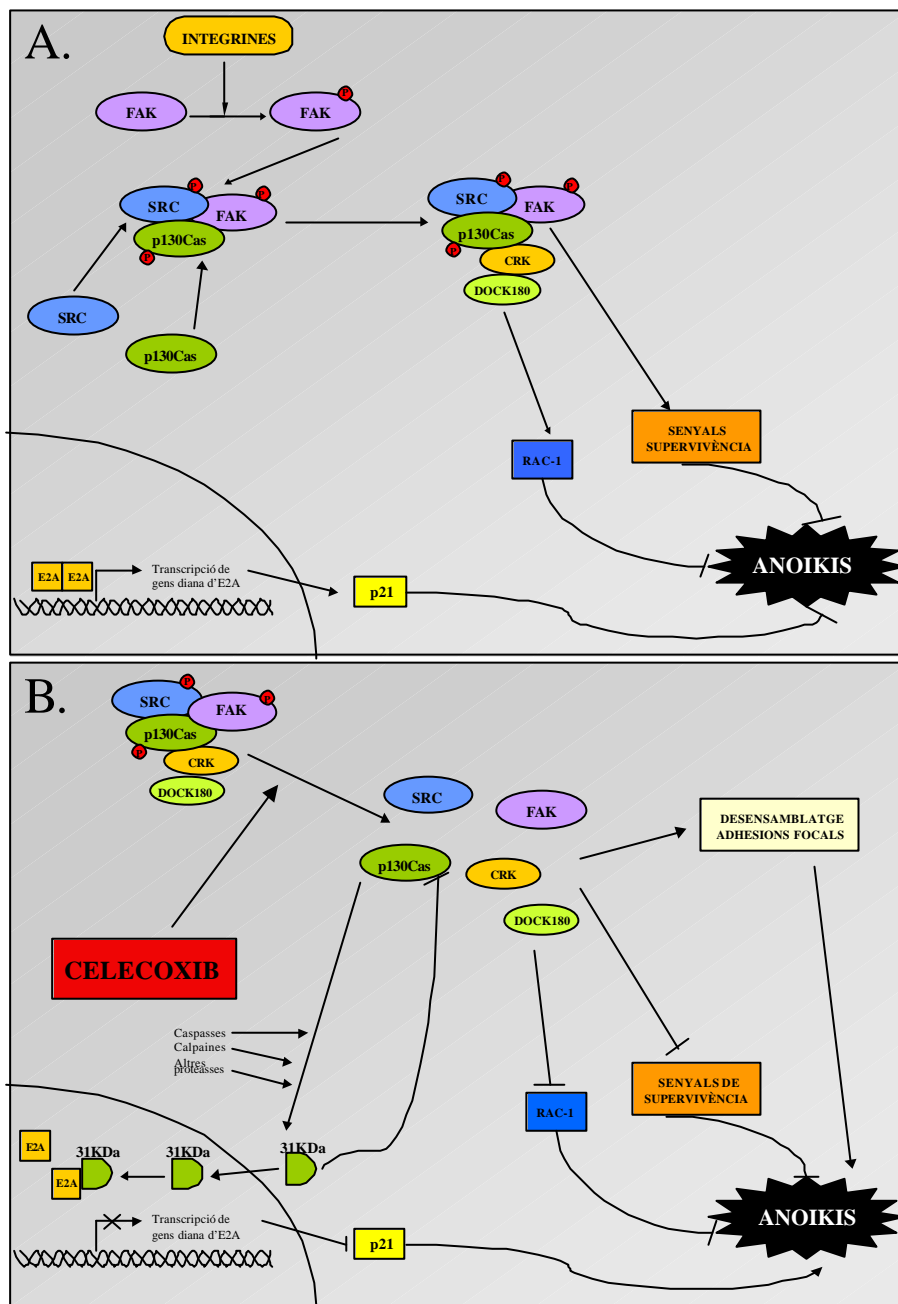


Figura 70. Model molecular de l'efecte del Celecoxib. **A.** Senyalització a través de les adhesions focals en absència de fàrmac. La unió de les integrines a la ECM indueix la fosforilació de FAK i la unió i activació de les altres proteïnes de les adhesions focals que transmeten senyals de supervivència que inhibeixen l'apoptosi. **B.** El Celecoxib indueix el desensamblatge i la defosforilació de les proteïnes de les adhesions focals i, en conseqüència, la inhibició dels senyals de supervivència i de la senyalització a través de Rac-1 que induirà la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules i anoikis. La proteolisi de p130Cas genera un fragment de 31KDa que és translocat al nucli on bloqueja la dimerització d'E2A i la transcripció dels seus gens diana, com p21. La disminució de p21 també contribuirà a l'anoikis. El fragment de 31KDa actua també com a dominant negatiu en unir-se a p130Cas (o als seus substrats) i inhibir la seva senyalització.

Les cèl·lules en suspensió adquireixen resistència al celecoxib

Totes les línies cel·lulars estudiades, adquirien resistència al celecoxib quan creixien en suspensió malgrat que eren sensibles a d'altres fàrmacs amb diferent mecanisme d'acció, com la gemcitabina, que actua aturant el cicle cel·lular en la fase G1 (Tolis et al., 1999). En realitzar el test d'apoptosi vam veure que la línia HCA7 era més sensible a l'anoikis que la TD20 doncs en créixer en suspensió augmentava el percentatge de cèl·lules apoptòtiques tot i que la majoria de cèl·lules continuaven sent viables. Tot i així, el celecoxib no induïa un augment d'apoptosi en cap de les línies en comparar amb els controls. Recolzant aquest resultat, vam observar que hi havia activació de caspasa-7 en les cèl·lules HCA7, i en les TD20 en menor nivell, tant en les control com en les tractades amb celecoxib. Aquesta activació era causada per la pèrdua d'ancoratge però no pel celecoxib. No vam observar però activació de caspasa-9, inductora de la via mitocondrial, que havíem determinat com a via d'apoptosi regulada pel celecoxib en adhesió.

Quan les cèl·lules creixen en suspensió formen una agregats que augmenten de tamany al llarg del temps, en conseqüència, les unions intercel·lulars poden ser importants per al manteniment de la supervivència independent de l'ancoratge. D'altra banda, les cèl·lules que entren en apoptosi, en la línia HCA7, no formaven part d'aquests agregats, per tant, les unions cèl·lula -cèl·lula podrien conferir resistència a l'anoikis. A nivell molecular, vam observar pocs canvis d'expressió entre les cèl·lules cultivades en suspensió i en adhesió, i, a més, el celecoxib no produïa cap de les alteracions que havíem observat en adhesió.

Els contactes cèl·lula-cèl·lula de les cèl·lules epitelials estan mediat per les unions entre molècules d'E-cadherina de les cèl·lules adjacents (Takeichi et al., 1991). Aquestes unions podrien transmetre els senyals de supervivència necessaris per a que les cèl·lules poguessin sobreviure independents de l'ancoratge i de la senyalització per les integrines i que els conferís resistència a l'efecte del celecoxib. Molts estudis demostren que les unions cèl·lula-cèl·lula no només serveixen com ancoratge entre cèl·lules veïnes sinó que també tenen un paper important en la transducció de senyals de supervivència. La disrupció de la funció de l'E-cadherina in vivo augmenta la prevalència d'apoptosi en cèl·lules epitelials (Hermiston and Gordon, 1995). A més, cèl·lules epitelials immortalitzades poden superar l'anoikis malgrat haver perdut l'ancoratge a l'ECM si es mantenen les unions cèl·lula-

cèl·lula, mentre que la inhibició d'E-cadherina indueix anoikis (Bergin et al., 2000; Kantak and Kramer, 1998). L'anoikis també és inhibida si es preserven les unions cèl·lula-cèl·lula malgrat que no hi hagi ancoratge a l'ECM en cèl·lules epitelials de ratolí (Pullan et al., 1996). Per tant, hi ha prou evidències que demostren que les unions d'E-cadherina confereixen resistència a l'anoikis. Això, concordaria amb la nostra hipòtesi sobre el mecanisme d'acció del celecoxib. Si el celecoxib actua produint la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules i, en conseqüència, induint anoikis, el fet que les cèl·lules que creixen en suspensió adquireixin mecanismes alternatius de supervivència que els confereixen resistència a l'anoikis, les tornaria resistents a l'efecte del celecoxib.

Les vies a través de les quals E-cadherina transmet senyals de supervivència no estan ben establertes tot i que se'n coneixen algunes. La senyalització per E-cadherina està lligada a la via de PI3K. En cèl·lules epitelials, la unió d'E-cadherina promou la supervivència a través de la via de PI3K/Akt (Lavin et al., 1996; Peluso et al., 2001) i, en cèl·lules de melanoma, la unió d'N-cadherina activa també Akt, inactivant Bad i estabilitzant β -catenina (Tran et al., 2002). En el nostre model però, no hem vist un augment de l'activació d'Akt causat per les unions d'E-cadherina i, a més, les cèl·lules en suspensió no eren sensibles a l'inhibidor de PI3K, Wortmannin, de manera que la capacitat de supervivència no vindria donada a través de l'activació d'aquesta via. Una altra via que és activada per E-cadherina és la via de MAPK a través del EGFR (Provost and Rimm, 1999; Pece et al., 1999). En els nostres experiments no hem vist que augmentés l'activació d'Erks en les cèl·lules en suspensió però tampoc es defosforilaven al llarg del temps malgrat la pèrdua de senyalització per integrines, aquesta activació podria ser causada per les unions d'E-cadherina. D'altra banda, les unions d'N-cadherina produeixen una sobreexpressió de Bcl-2 que inhibeix l'apoptosi (Tran et al., 2002). Per tant, diverses vies regulades per les cadherines promouen la supervivència i inhibeixen l'apoptosi. Amb els nostres resultats no podem concloure a través de quina via esdevenen resistents les cèl·lules en suspensió però sí que probablement és una via regulada pels contactes d'E-cadherina.

3. MECANISME D'ACCIÓ DEL CELECOXIB EN TUMORS XENOTRASPLANTATS DE CARCINOMA DE CÒLON

El celecoxib indueix apoptosi en els tumors ortotòpics i necrosi en els subcutanis

Els experiments en ratolins xenotrasplantats van demostrar que el celecoxib té un efecte antitumoral significatiu sobre el carcinoma de còlon humà TD20 tant en implantació ortotòpica com en subcutània, sense induir toxicitat en els animals. Malgrat això, el mecanisme d'acció variava completament amb la localització. Així, la inducció d'apoptosi pot explicar l'efecte sobre els tumors ortotòpics. La reducció significativa tant en el volum com en el pes dels tumors en aquesta localització causada pel celecoxib, va acompanyada d'un augment significatiu de nuclis apoptòtics en les àrees microscòpicament viables que, a nivell molecular, s'acompanya d'activació de caspasa 9 i proteolisi del substrat de caspases PARP. Aquests resultats concorden amb les troballes fetes en l'estudi en cultiu de les mateixes cèl·lules.

En contraposició, quan les mateixes cèl·lules TD20 són implantades subcutàniament, el celecoxib, en lloc d'induir apoptosi, produeix un elevat nivell de necrosi. Aquesta conclusió es basa en les següents troballes:

1. La reducció del volum dels tumors induïda pel celecoxib va acompanyada d'una significativament major inducció de necrosi líquida macroscòpica en els tumors subcutanis que en el tumors ortotòpics.
2. L'anàlisi histopatològic demostra que el celecoxib indueix un augment significatiu de necrosi microscòpica en els tumors subcutanis, a diferència dels tumors ortotòpics als que induïa apoptosi.
3. Hi ha una manca d'activació de la caspasa 9 i de proteolisi de la proteïna PARP en els tumors subcutanis tractats amb celecoxib.

Per tant, la localització tumoral determina el mecanisme d'acció antitumoral del celecoxib, en un cas produint mort cel·lular programada, en l'altre necrosi.

El celecoxib indueix la desregulació dels contactes focals només en els tumors ortotòpics

La diferència en el mecanisme de mort cel·lular induïda pel celecoxib en funció del lloc d'implantació tumoral es traduïa també en un conjunt d'alteracions moleculars diferents. A part de les proteïnes reguladores de l'apoptosi, s'alteraven també les que regulen els contactes focals que vàrem decidir estudiar donat que la seva alteració formava part del mecanisme d'acció del fàrmac observat *in vitro*.

D'aquesta manera, l'apoptosi induïda pel celecoxib en els tumors ortotòpics podia ser conseqüència de la inhibició del complexos focals que transdueixen senyals antiapoptòtics a partir de la matriu extracel·lular. Això es basa en la disminució de l'activació, mesurada per fosforilació en Tyr397, de la quinassa FAK, alhora que de l'expressió i fosforilació en Tyr418 de la quinassa Src, seguit d'un increment del fragment de 31 KDa generat per proteolisi de la proteïna p130Cas. Totes aquestes observacions indiquen que el celecoxib indueix una disrupció dels complexos focals i un augment de la senyalització proapoptòtica a partir del fragment de 31 KDa en els tumors ortotòpics tal i com havíem observat en els experiments en cultiu cel·lular.

En contrast, el model d'implantació subcutània diferia significativament de les observacions fenotípiques i moleculars registrades en els tumors ortotòpics o en cultiu cel·lular. Així, el celecoxib no alterava l'expressió ni la fosforilació de FAK ni de Src, ni canviava el nivell d'expressió o de proteolisi de la proteïna p130Cas. Per tant, els resultats del cultiu cel·lular són més consistents amb les observacions en els tumors ortotòpics que amb els subcutanis, tant en el que fa a la inducció d'apoptosi com en la desregulació dels contactes focals que acompanya aquest efecte.

Les diferències mecanístiques entre els tumors ortotòpics i subcutanis en la resposta al celecoxib podrien ser degudes al diferent entorn amb el que interaccionen les cèl·lules

tumorals. Així, la diferent composició de la matriu extracel·lular entre el còlon i el subcutis podria determinar un nivell diferent de formació de complexes focals i de regulació de les vies antiapoptòtiques “downstream” que, en el cas dels tumors ortotòpics, podrien ser inhibides pel celecoxib induint apoptosi. En canvi, en els tumors subcutanis, d’altres vies haurien d’estar activades. La inhibició d’aquestes altres vies pel celecoxib induiria necrosi.

Aquests experiments demostren la importància del model animal emprat per l’anàlisi del mecanisme d’acció de fàrmacs antitumorals que s’utilitzen en la fase preclínica per tal de seleccionar els compostos que passaran a ser avaluats clínicament abans de ser comercialitzats com a fàrmacs antitumorals. Aquestes troballes són consistents amb altres estudis que demostren diferent resposta a fàrmacs antitumorals d’un mateix tumor implantat ortotòpicament i heterotòpicament (Pocard et al., 1996; Wilmanns et al., 1993; Starosellsky et al., 1990; Dong et al., 1994) i amb resultats obtinguts en el nostre laboratori que indiquen que aquesta diferent resposta és causada per l’activació de vies de transducció de senyal diferents. A més, en clínica també s’ha descrit que les metàstasi responen de manera diferent a la quimioteràpia que el tumor primari (Slack and Bross, 1975).

L’activitat antitumoral *in vivo* dels inhibidors de COX ha esta àmpliament demostrada en diferents models animals. La majoria de treballs analitzen l’efecte d’aquests fàrmacs com a quimiopreventius en models de carcinogènesi colorectal induïda químicament amb azoximetà. Així, en aquest model, s’ha demostrat l’efecte quimiopreventiu de diversos AINEs (Reddy et al., 1992; Reddy et al., 1993; Rao et al., 1995) i d’inhibidors selectius de COX-2 com l’SC58635 (Reddy et al., 1996) i el celecoxib (Kawamori et al., 1998; Reddy et al., 2000). També s’han utilitzat altres models de carcinogènesi colorectal com el ratolí *Apc^{MIN}* (Jacoby et al., 1996). Hi ha però pocs treballs que demostrin l’efecte antitumoral dels inhibidors de COX-2 en tumors establerts.

S’ha demostrat l’efecte antitumoral del celecoxib en tumors de còlon xenotrasplantats heterotòpicament en teixit muscular en ratolins atímics (Masferrer et al., 2000), i també en implantació subcutània (Grösch et al., 2001) tot i que, en aquest cas, el tractament amb el celecoxib es començava alhora que s’injectaven les cèl·lules al subcutis no tractant-se doncs de tumors establerts. D’altra banda, que nosaltres coneixem, no s’ha determinat fins

ara l'efecte antitumoral del celecoxib en càncer de còlon en ratolins atímics implantats ortotòpicament ni s'ha comparat la resposta a aquest fàrmac entre models heterotòpics i ortotòpics.

A més, pocs treballs analitzen els mecanismes d'acció d'aquests compostos *in vivo* ja que molts d'ells pressuposen que el seu efecte és causat per la inhibició de l'enzim COX-2 i, conseqüentment, de la síntesi de PGE₂ (Masferrer et al., 2000; Reddy et al., 1996) tot i que s'ha descrit la inducció d'apoptosi independent de COX-2 per al celecoxib en un model de carcinogènesi química colorectal en rata (Brown et al., 2001).

4. DESENVOLUPAMENT DE NOUS COMPOSTOS ANTITUMORALS MÉS POTENTS QUE EL CELECOXIB

Desenvolupament de nous compostos antitumorals més potents que el celecoxib

Un dels objectius d'aquest treball fou el desenvolupament de nous compostos d'estructura relacionada amb el celecoxib que fossin més potents com antitumorals i que tinguessin el mateix mecanisme d'acció. El coneixement del mecanisme d'acció del celecoxib ens va servir de base per establir els criteris de selecció dels nous compostos. Per això, fou essencial la demostració que el mecanisme d'acció del celecoxib i d'altres compostos relacionats és independent de la seva capacitat d'inhibició de COX-2. Per tant, partint d'aquesta premissa, la selecció de nous compostos amb efecte antitumoral no havia d'estar condicionada a la seva capacitat d'inhibició de COX-2. D'altra banda, també havíem determinat que el mecanisme d'acció del celecoxib era a través de la inducció d'apoptosi amb una ràpida pèrdua d'ancoratge i desregulació de les proteïnes de les adhesions focals. Això va permetre establir un mètode de selecció de compostos que consistia en l'avaluació de la citotoxicitat a temps curts (4h), la inducció d'apoptosi, la pèrdua d'ancoratge i la desregulació de les proteïnes de les adhesions focals. Aquest mètode de criatge tenia com objectiu seleccionar aquells compostos amb mecanisme d'acció similar al celecoxib. Per tant, un cop sintetitzats els compostos a avaluar (seguint els criteris comentats en el primer punt de la discussió) vam analitzar si tots ells actuaven de manera similar al celecoxib. Determinant el seu efecte antitumoral, mitjançant assajos de citotoxicitat, vam poder identificar cinc compostos més efectius que el celecoxib en les dues línies cel·lulars utilitzades.

Els nous compostos seleccionats actuen pel mateix mecanisme que el celecoxib

A continuació, vam analitzar el mecanisme d'acció dels compostos seleccionats. Tots els compostos avaluats induïen un alt percentatge d'apoptosi que correlacionava amb el seu

efecte antitumoral, és a dir, que els fàrmacs més efectius induïen major percentatge de cèl·lules apoptòtiques. Aquesta apoptosi, estava associada en tots els compostos a l'activació de les caspases 3, 7 i 9 i a la sobreexpressió de Bax, suggerint que es produiria a través de la via mitocondrial com en el cas el celecoxib. Tots els compostos induïen la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules, essent també els compostos més efectius els que induïen major pèrdua d'ancoratge. A nivell molecular, hi havia també una desregulació dels contactes focals amb una forta disminució dels nivells d'expressió de p130Cas i defosforilació de Fak i Src en els compostos més efectius.

En avaluar el mecanisme d'acció del celecoxib, vam veure que p130Cas era la proteïna dels contactes focals amb un paper més important en el seu efecte, produint-se la seva proteolisi i generant-se un fragment de 31KDa que era translocat al nucli. Tots els compostos avaluats induïen també la proteolisi de p130Cas donant lloc al fragment de 31KDa. Vam comprovar que aquest fragment era també translocat al nucli en tractar les cèl·lules TD20 amb dos dels compostos més efectius (E6122 i E6165). Finalment, vam demostrar el paper causal de p130Cas en el mecanisme d'acció d'aquests compostos en determinar, mitjançant els transfectants de CAS-FL (p130Cas silvestre), que la sobreexpressió de p130Cas reverteix en part l'efecte de l'E6122 i l'E6165. Per tant, tots els resultats obtinguts recolzen que el mecanisme d'acció dels nous compostos desenvolupats és el mateix que el del celecoxib.

En conclusió, hem desenvolupat nous compostos amb major efecte antitumoral que el celecoxib però amb el seu mateix mecanisme d'acció, per tant, si el celecoxib ha demostrat tenir efecte antitumoral *in vivo*, en models animals (Grösch et al., 2001; Kawamori et al., 1998; Reddy et al., 2000), i en la clínica amb pacients de CCR (Steinbach et al., 2000; Phillips et al., 2002), és d'esperar que aquests nous compostos puguin al menys reproduir, i potser millorar, els resultats obtinguts amb el celecoxib pel que fa a l'efecte antitumoral. Malgrat això, som conscients que tenir més efecte antitumoral no implica que siguin millors fàrmacs en la clínica ja que el seu desenvolupament està també influenciat pel seu comportament farmacocinètic, per la possibilitat de fer una forma farmacèutica adequada per la seva administració i per la manca de toxicitat. Caldrà doncs esperar aquests estudis futurs per a poder determinar si aquests compostos podrien ser bons fàrmacs antitumorals pel seu ús en clínica.

Com a conseqüència d'aquests treballs, s'han sol·licitat dues patents internacionals que inclouen l'ús d'aquests compostos com antitumorals, la primera ja ha estat concedida en alguns països i la segona està sol·licitada:

1. TÍTOL: Empleo de derivados de pirazolinas en la elaboración de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades proliferativas celulares

SOLICITANT : Laboratoris del Dr. Esteve, S.A.

Nº DE PUBLICACIÓ INTERNACIONAL : WO 02/080909 A1

DATA : 21/03/2002

2. TÍTOL : Nuevos derivados pirazolínicos sustituidos

SOLICITANT: Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.

Nº SOLICITUD : P200400362

DATA : 16/02/2004

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. L'efecte antitumoral dels compostos inhibidors de COX-2 no és dependent de la seva capacitat inhibidora de l'enzim. Compostos amb la mateixa activitat inhibidora de COX-2 presenten diferent efecte antitumoral en cèl·lules de carcinoma de còlon humà mentre que compostos d'estructura química relacionada, que no inhibeixen COX-2, tenen activitat antitumoral.
2. El nivell d'expressió i activitat de COX-2 de cèl·lules de carcinoma de còlon humà no influeix la seva sensibilitat als compostos inhibidors de COX-2.
3. El celecoxib indueix apoptosi dependent de caspases a través de la via mitocondrial amb sobreexpressió de Bax, sortida de citocrom c de la mitocòndria i activació de les caspases 9, 3 i 7 *in vitro* en cèl·lules de carcinoma de còlon humà.
4. El celecoxib indueix una ràpida pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules causada per la desregulació de les proteïnes dels contactes focals i de la seva senyalització.
5. El celecoxib indueix la proteolisi de p130Cas generant un fragment de 31KDa que és translocat al nucli.
6. La sobreexpressió de p130Cas, però no la de Src i Fak, reverteix en part l'efecte del celecoxib *in vitro*.
7. Les cèl·lules de carcinoma de còlon adquireixen resistència a l'efecte dels inhibidors de COX-2 quan creixen en suspensió, malgrat la inhibició de COX-2, mentre que són sensibles a d'altres compostos que actuen per un mecanisme d'acció diferent.
8. Les cèl·lules cultivades en suspensió adquireixen resistència al celecoxib a causa de la reorganització dels contactes focals i de l'augment de les unions cèl·lula-cèl·lula.

- 9.** El celecoxib té efecte antitumoral in vivo en un model de xenotrasplantament de carcinoma de còlon en ratolins atímics. El lloc d'implantació del tumor no influeix la resposta al fàrmac però sí el seu mecanisme d'acció. En la implantació subcutània, el celecoxib actua augmentant la necrosi mentre que en la implantació ortotòpica indueix apoptosi.

- 10.** En el model in vivo d'implantació ortotòpica, el celecoxib indueix alteracions a nivell molecular semblants a les observades en els cultius cel·lulars, produint l'activació de procaspasa-9, proteolisi de PARP i p130Cas i defosforilació de Fak i Src.

- 11.** Els nous compostos d'estructura química relacionada amb el celecoxib són efectius com antitumorals essent alguns d'ells més potents que el celecoxib.

- 12.** Els compostos relacionats amb el celecoxib actuen a través d'un mecanisme d'acció semblant al celecoxib. La seva capacitat d'inhibir COX-2 no correlaciona amb el seu efecte com antitumorals.