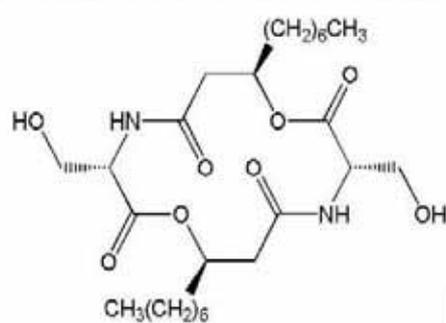
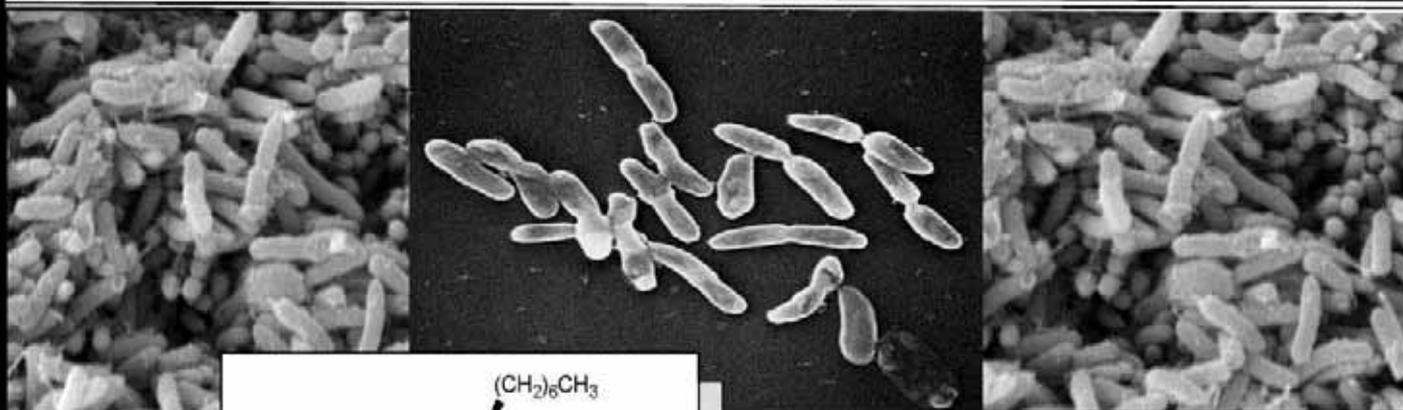
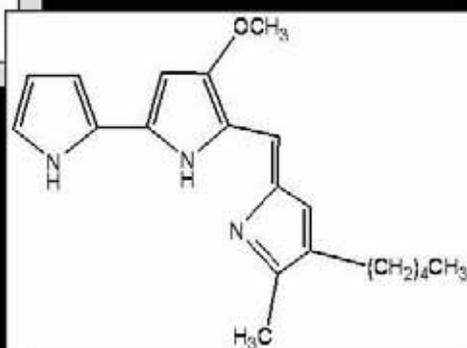

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO
ANTICANCEROSO E IDENTIFICACIÓN DE DIANAS
MOLECULARES DE PRINCIPIOS ACTIVOS
PROCEDENTES DE *Serratia marcescens***



TESIS DOCTORAL





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultat de Medicina

Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

Programa de Doctorat: Biologia i Patologia Cel·lulars

Bienni 2002-2004

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

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

Dr. Ricardo E. Pérez Tomás

Director

Vanessa Soto Cerrato

Doctoranda

2007

IV. INTRODUCCIÓN

1. EL CÁNCER

La organización celular de los tejidos del cuerpo humano posee una gran complejidad. Existe un control muy estricto respecto a la proliferación y especialización de cada tipo celular, pero a su vez las células retienen una gran capacidad plástica. Existen células que están en continua proliferación, como las células de la médula ósea, pero la mayoría de los tipos celulares no lo hacen a no ser que reciban determinados estímulos. La habilidad de proliferar en ciertas ocasiones para participar en la morfogénesis de los tejidos adultos de un organismo hace posible el mantenimiento de estos, como sucede en el caso de reparación de heridas o reposición de células atrofiadas tras largos períodos de servicio. Al mismo tiempo, esta versatilidad puede representar un grave peligro para el organismo, en tanto que las células adquieran, en el momento que no les corresponda, capacidades que les estén restringidas (Weinberg RA, 2007). Éste es el caso del cáncer, conjunto de enfermedades con diferente etiología, pronóstico y tratamiento, caracterizadas por el excesivo y descontrolado crecimiento celular que invade y daña tejidos causando la muerte del organismo. La falta de control de la proliferación celular es el resultado de múltiples alteraciones en el ADN (de ácido desoxirribonucleico) de las células, las cuales resultan en mutaciones en proteínas reguladoras de este proceso. Es por ello que el cáncer está considerado una enfermedad de origen genético.

1.1. Epidemiología del cáncer

El cáncer, como conjunto de enfermedades que es, viene determinado por una serie de factores. Estos pueden ser causas externas al paciente (radiaciones, productos químicos e infecciones víricas) o internas (hormonas, aspectos inmunitarios y mutaciones heredables). Este conjunto de factores causales pueden actuar conjuntamente o de manera secuencial para iniciar o promover el desarrollo de la enfermedad. El cáncer se puede prevenir evitando los factores de riesgo conocidos que lo producen (prevención primaria), y se puede avanzar en su diagnóstico y tratamiento mediante la detección precoz (prevención secundaria), y así mejorar su pronóstico (Borràs JM, et al., 2001).

La incidencia de la patología cancerosa sigue una clara tendencia a la alza en el mundo desarrollado. En Estados Unidos se estima que se diagnosticarán en 2007 un total de 1.444.920 nuevos casos de cáncer y que habrá un total de 559.650 muertes debidas a esta enfermedad (Jemal A, et al., 2007). Los datos de los diez tipos de cáncer más frecuentes repartidos por sexos se detallan en la tabla 1.

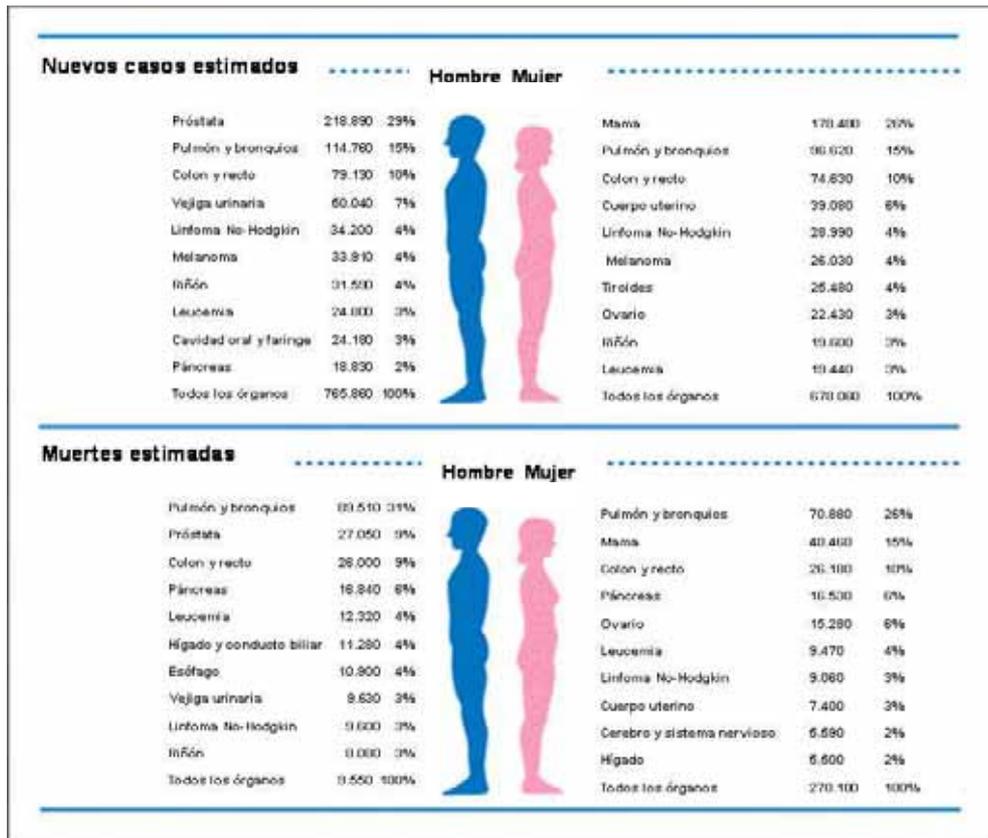


Tabla 1. Estimación de nuevos casos diagnosticados y muertes provocadas por los diez tipos de cáncer más frecuentes en Estados Unidos para el 2007 (Modificado de Jemal A, et al., 2007).

En Cataluña (Borràs JM, et al., 2001), el cáncer es una enfermedad muy frecuente y se estima que uno de cada dos hombres y una de cada tres mujeres desarrollaran un cáncer a lo largo de su vida. Las tasas de incidencia se sitúan entorno a 500 nuevos casos por 100.000 hombres y 350 nuevos casos por 100.000 mujeres. Durante el período 2004-5 se diagnosticaron en Cataluña 19.800 nuevos casos anuales de cáncer en hombres y 13.460 en mujeres.

Los datos de los dos registros poblacionales que existen en Cataluña, el de Tarragona y el de Girona, muestran que los cánceres más frecuentes son los de pulmón, próstata y colorrectal en hombres y el de mama, colorrectal y de útero en mujeres como se detalla en las tablas 2 y 3.

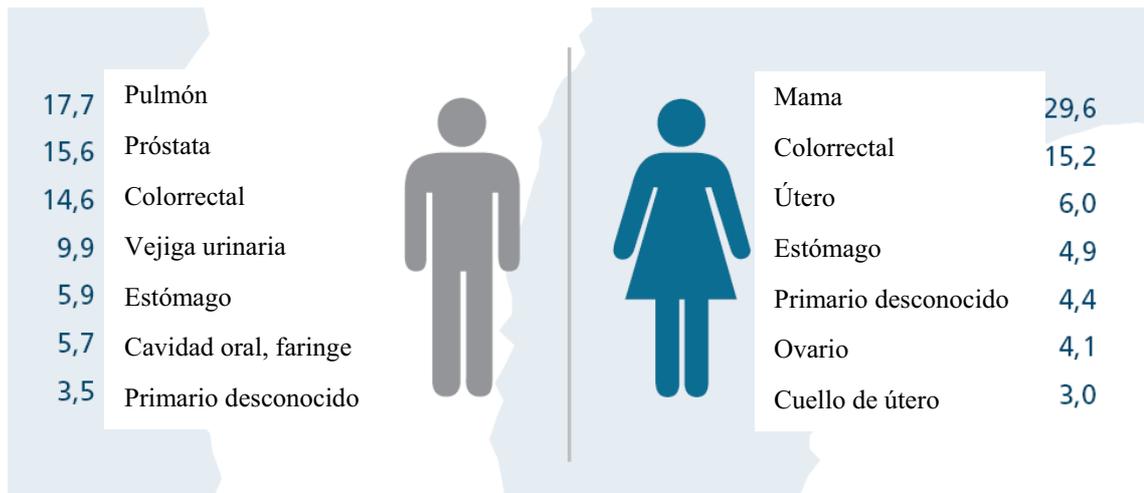


Tabla 2. Incidencia proporcional (%) de los cánceres más frecuentes por sexos en Tarragona (Modificado de Borràs JM, et al., 2001).

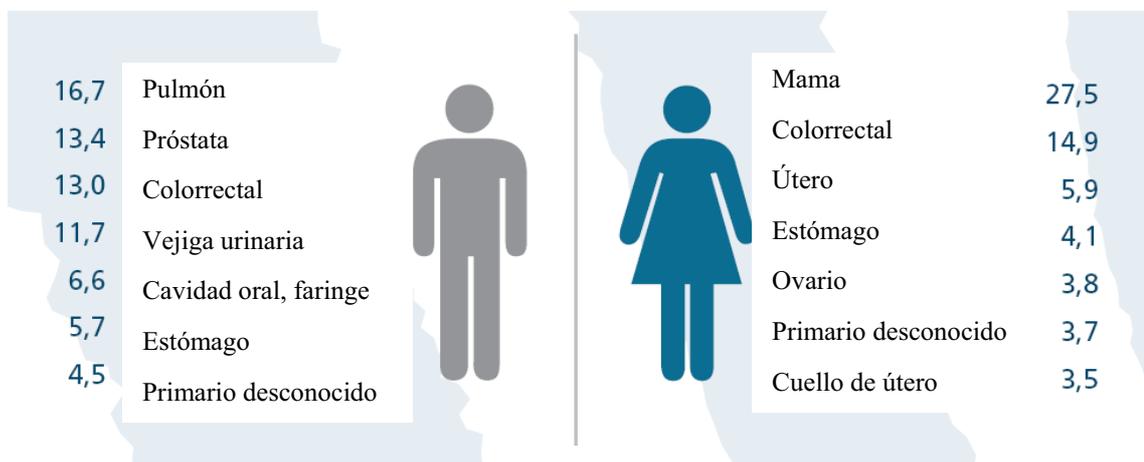


Tabla 3. Incidencia proporcional (%) de los cánceres más frecuentes por sexos en Girona (Modificado de Borràs JM, et al., 2001).

El cáncer es la segunda causa de muerte en las mujeres después de las enfermedades cardiovasculares desde el año 1991 en Cataluña. En cuanto a los hombres, el cáncer es la causa de muerte más frecuente. Las tasas de mortalidad en Cataluña por cáncer en el 2003 fueron de 179 en mujeres y 303 en hombres por 100000 habitantes. El tipo de cáncer que causó más muertes en hombres fue el cáncer de pulmón, mientras que en mujeres fue el de mama (Tabla. 4). De todas formas, se observó una tendencia de descenso global en la mortalidad en Cataluña a partir de 1991-92, la cual fue mayormente debida a la estabilización de la mortalidad por cáncer de pulmón en hombres y de cáncer de mama en mujeres (Borràs JM, et al., 2001).

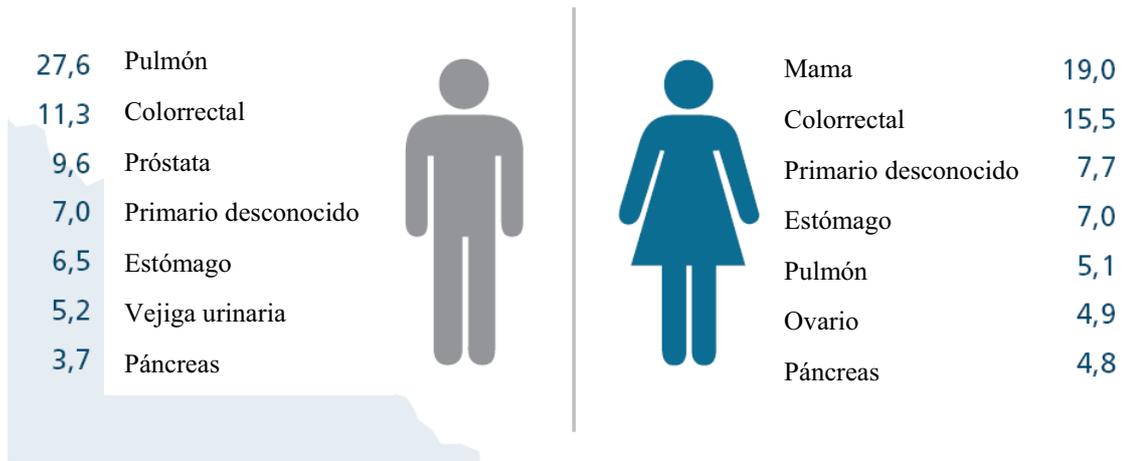


Tabla 4. Frecuencia relativa de la mortalidad por cáncer según las principales localizaciones tumorales (Modificado de Borràs JM, et al., 2001).

1.2. Carcinogénesis

El proceso tumoral consta de múltiples etapas donde cada una de ellas refleja las alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de las células normales a sus derivados celulares cada vez más malignos. Todo este conjunto de etapas es necesario para romper los múltiples sistemas de control que regulan la proliferación y la homeostasis celular. Las etapas del desarrollo de un tumor se pueden clasificar según su histología (Figura 1).

El desarrollo de un tumor comienza cuando una o varias células normales adquieren la capacidad de proliferar de una forma relativamente autónoma mediante alguna mutación genética en proto-oncogenes, genes supresores de tumores o genes de reparación del ADN. Este crecimiento excesivo se llama *hiperplasia*. A lo largo del tiempo, algunas células de su progenie presentan alteraciones caracterizadas por una variación en su tamaño, forma y organización (*displasia*), dando lugar a un cáncer *in situ*, tumor benigno o *neoplasia*. Si los cambios genéticos facilitan la invasión por parte del tumor del tejido circundante y la entrada de las células en el torrente sanguíneo y/o linfático, hablamos entonces de un tumor maligno o *cáncer invasivo*. Las células invasoras pueden iniciar nuevos tumores en otras partes del cuerpo (*metástasis*) que pueden ser letales si afectan a un órgano vital (Vogelstein B y Kinzler KW, 1993).

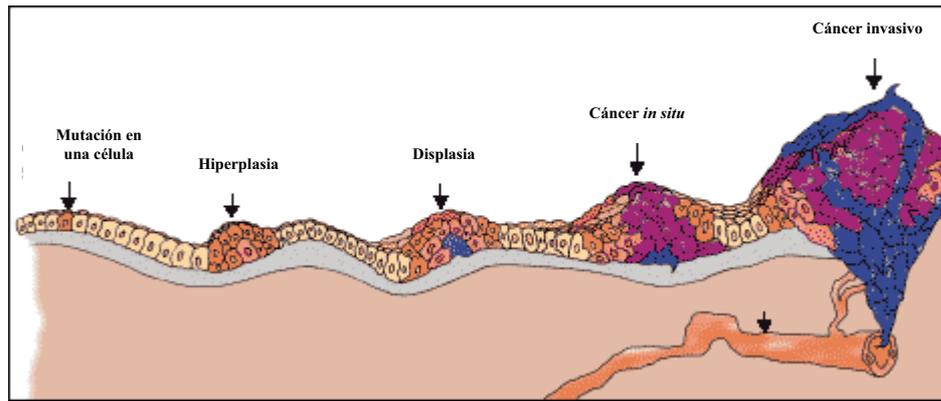


Figura 1. Etapas en el desarrollo de un tumor (Vogelstein B y Kinzler KW, 1993).

Se han postulado varias normas generales que rigen el proceso de transformación de la célula normal hacia la célula tumoral. Según Hanahan y Weinberg el cáncer se origina al alterarse seis mecanismos celulares esenciales para la regulación de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Hanahan D y Weinberg RA, 2000). Las nuevas capacidades adquiridas por las células cancerosas son la autosuficiencia para proliferar independientemente de señales de crecimiento, la insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento, la capacidad de invadir tejidos y metastatizar, la insensibilidad a la muerte celular por apoptosis, un potencial replicativo ilimitado y la habilidad de provocar el proceso de angiogénesis (Figura 2).

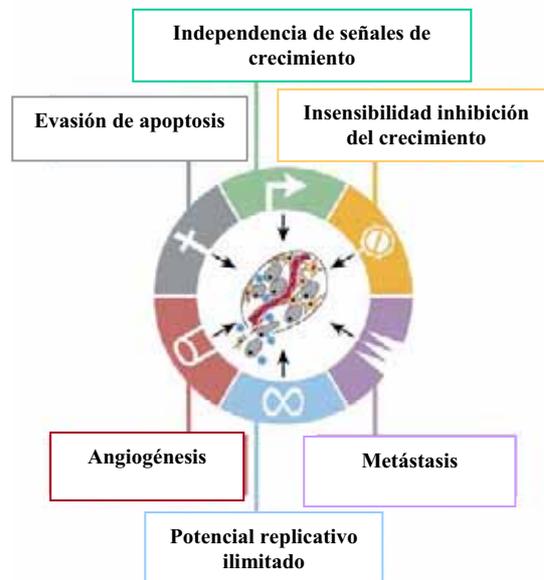


Figura 2. Capacidades adquiridas del cáncer (Modificado de Hanahan D y Weinberg RA, 2000).

1.3. Tipos de cáncer

Existen un gran número de cánceres diferentes dependiendo del tejido en el que se haya originado. Según los estándares internacionales para la clasificación y nomenclatura de tumores malignos según su histología, los cánceres se pueden agrupar en cinco grandes categorías (Fritz A, et al., 2000):

- Carcinoma. Neoplasia maligna de origen epitelial. Representa el 80-90 % de todos los casos de cánceres diagnosticados.
- Sarcoma. Tumor derivado de tejido conectivo y de sostén como huesos, tendones, cartílago, músculo y tejido adiposo.
- Mieloma. Cáncer originado en las células plasmáticas de la médula ósea.
- Leucemia. Cáncer de la médula ósea. Esta enfermedad está frecuentemente asociada con la sobreexpresión de glóbulos blancos inmaduros.
- Linfoma. Tumor desarrollado en las glándulas o nódulos del sistema linfático.

1.4. Cáncer de mama

Este tipo de cáncer es el más frecuente entre las mujeres de los países occidentales, teniendo una incidencia de casi un 30 % en la población femenina de Cataluña (Borràs JM, et al., 2001).

1.4.1. Glándula mamaria

La estructura de la glándula mamaria es importante para entender este tipo de cáncer. Las principales partes de la glándula son los lobulillos (glándulas productoras de leche), los conductos (tubos lácteos que conectan los lobulillos y el pezón) y el estroma (tejido adiposo y los ligamentos que rodean los conductos y los lobulillos, los vasos sanguíneos y los vasos linfáticos) (Figura 3).

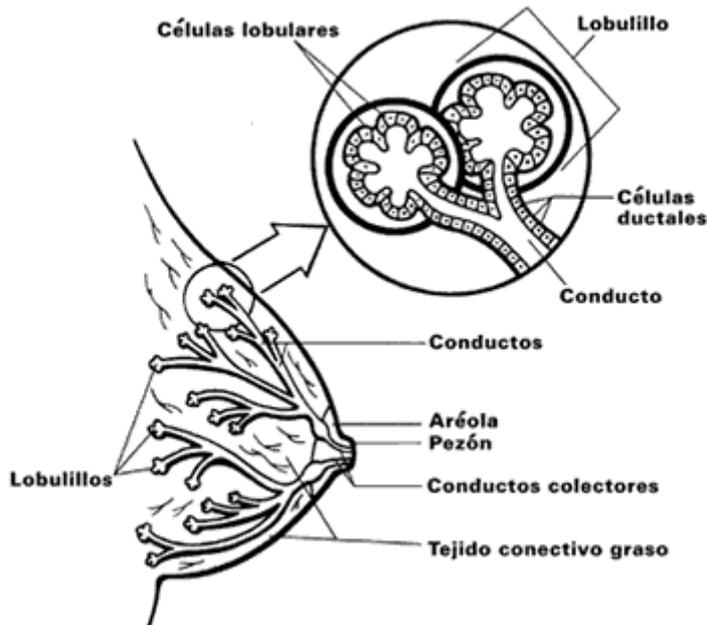


Figura 3. Esquema de la glándula mamaria (Ades T, et al., 2005).

1.4.2. Tipos de cáncer de mama

La clasificación de los tipos de cáncer de mama se basa en el lugar donde se originó, en el grado de invasividad y en la apariencia de las células cancerosas bajo el microscopio. Según estos criterios podemos encontrar (Ades T, et al., 2005):

- Carcinoma lobulillar *in situ* (LCIS, de lobular carcinoma *in situ*). Se origina en los lobulillos y no se propaga al tejido adiposo circundante.
- Carcinoma lobulillar invasivo (ILC, de invasive lobular carcinoma). Se origina en las glándulas productoras de leche y puede propagarse más allá del seno.
- Carcinoma ductal *in situ* (DCIS, de ductal carcinoma *in situ*). Se origina en los conductos y no se propaga al tejido adiposo circundante.
- Carcinoma ductal invasivo (IDC, de invasive ductal carcinoma). Se origina en el conducto lácteo pero luego las células cancerosas se propagan al tejido adiposo del seno.

- Carcinoma medular. Cáncer ductal infiltrante con límite marcado entre el tejido del tumor y el tejido del seno.
- Carcinoma coloide. Tipo de cáncer ductal invasivo formado por células cancerosas que producen mucosidad.
- Carcinoma tubular. Tipo especial de carcinoma ductal infiltrante con menos probabilidades de propagarse fuera del seno.
- Cáncer inflamatorio del seno. Las células cancerosas invaden la piel y obstruyen los vasos linfáticos.

1.4.3. Tratamientos contra el cáncer de mama

La detección temprana junto con la aplicación de algún tratamiento contra el cáncer reduce significativamente el riesgo de muerte a causa de esta enfermedad. Los más comúnmente utilizados contra el cáncer de mama son (Ades T, et al., 2005):

- Cirugía. La mayoría de las mujeres con cáncer de mama serán sometidas a cirugía. En la tumorectomía se extirpa sólo la masa del tumor, pero dependiendo del tamaño y la localización del tumor se deberá realizar una mastectomía, extirpación de la mama por completo.
- Radioterapia. La radiación se usa para destruir las células cancerosas que puedan quedar en la mama, en la pared torácica o en los ganglios linfáticos después de la cirugía.
- Tratamiento sistémico. Se usa para combatir células cancerosas que podrían haberse propagado más allá de la mama y los tejidos circundantes. Para ello se administran medicamentos en forma de pastillas o por vía intravenosa. Dependiendo del medicamento que se use tenemos la quimioterapia, la inmunoterapia y la terapia hormonal.

En quimioterapia se usan agentes citotóxicos para eliminar las células cancerosas, minimizando la toxicidad en las células sanas del organismo. Estas sustancias poseen diferentes mecanismos de acción pero los más

frecuentes pertenecen a una de estas categorías: agentes alquilantes, antibióticos, antimetabolitos, agentes diferenciadores, encimas, hormonas, alcaloides de plantas o inhibidores de topoisomerasas (Pitot HC, et al., 2002). En la mayoría de los casos es más eficaz cuando se combina más de un medicamento. Ésta es la terapia de elección para muchos cánceres de mama metastásicos, sobretodo los insensibles a hormonas (Esteva FJ, et al., 2001). Los medicamentos usados comúnmente para tratar el cáncer de mama se muestran en la tabla 5.

Nombre de marca	Genérico
Adriamicina	doxorrubicina
Cytosan	ciclofosfamida
Ellence	epirrubicina
Nabelvine	vinorelbina
Taxol	paclitaxel
Taxotere	docetaxel
Xeloda	capecitabina
Gemzar	gemcitabina

Tabla 5. Medicamentos de quimioterapia usados en cáncer de mama (Ades T, et al., 2005).

En terapia hormonal se usan medicamentos para bloquear el efecto del estrógeno, hormona que hace que algunos cánceres de mama crezcan, o bien para bajar los niveles de éste. Las hormonas más utilizadas en este tratamiento se listan en la tabla 6.

Nombre de marca	Genérico
Arimidex	anastrozol
Aromasin	exemestano
Fareston	toremifeno
Faslodex	fulvestrant
Femara	letrozol
Lupron	luprolide
Megace	megestrol
Novaldex	tamoxifeno

Tabla 6. Hormonas más utilizadas contra el cáncer de mama (Ades T, et al., 2005).

En la terapia con anticuerpos monoclonales se usan estos para bloquear receptores de membrana de las células cancerosas y así inhibir la proliferación de éstas. El más usado contra el cáncer de mama es el trastuzumab (Herceptin) que es un anticuerpo dirigido directamente contra el receptor HER-2/neu/erbB2 (Yeong CH y Pegram MD, 2005).

1.5. Resistencia a múltiples fármacos

El efecto de la quimioterapia suele ser muy variable de un paciente a otro debido a la heterogeneidad genética de los tumores. Además, uno de los mayores impedimentos para el éxito de dicho tratamiento es el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos, el cual suelen desarrollar las células de un tumor tras la exposición reiterada a uno o varios fármacos. Existen dos clases generales de resistencia a drogas anticancerosas: aquellos mecanismos que impiden la entrega del fármaco en el interior de la célula y los que disminuyen la sensibilidad de la propia célula a la droga debido a alteraciones genéticas o epigenéticas (Gottesman MM, et al., 2002) (Figura 4).

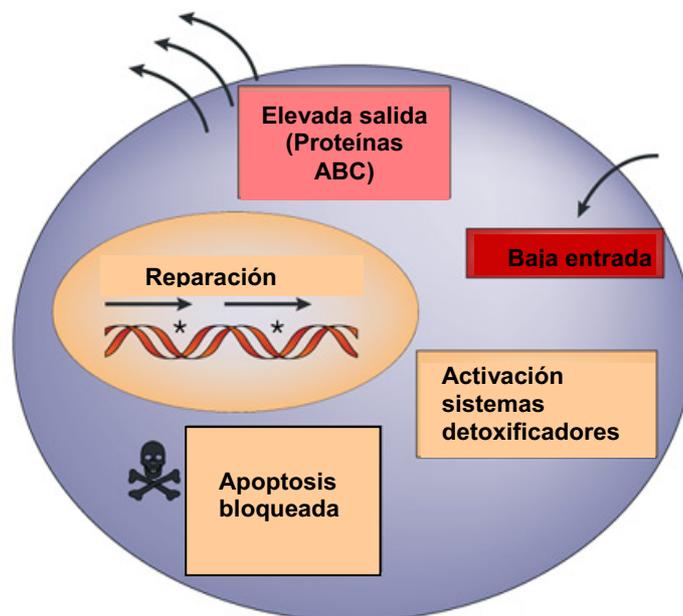


Figura 4. Factores celulares que causan resistencia a drogas (Modificado de Gottesman MM, et al., 2002).

Entre los primeros encontramos una pobre absorción del fármaco por parte de la célula o una elevada expulsión o metabolismo de ésta. Por otro lado, la célula cancerosa se podría hacer resistente a un medicamento o a varios con similar mecanismo de acción, debido a alteraciones en la diana celular que bloqueasen la muerte de la célula, a un incremento en la reparación del daño al ADN o a una elevada actividad de sistemas detoxificadores.

Entre todos ellos, uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a fármacos es la elevada expulsión de éste hacia el exterior de la célula gracias a unas proteínas que son canales de membrana dependientes de ATP (de adenosine triphosphate; adenosín trifosfato) llamadas transportadores ABC (de ATP-binding cassette; casete de unión a ATP). Estas proteínas son canales de membrana, dependientes de energía, involucrados en el tráfico de moléculas biológicas a través de las membranas contra gradiente de concentración. Se sobreexpresan sobretodo en tejidos cancerosos previamente expuestos a fármacos. Las tres subfamilias de transportadores ABC que han sido relacionadas con la propiedad de conferir resistencia a múltiples drogas son (Litman T, et al., 2001; Pérez-Tomás R, 2006):

- ABC B (o MDR, de Multidrug resistance; resistencia a múltiples drogas). El miembro más relevante de esta familia es la glicoproteína P, producto del gen MDR1 o ABC B1 (Chinn LW y Kroetz DL., 2007). Es una proteína de 170 kDa con 12 dominios transmembrana y dos sitios de unión al ATP expresada especialmente en la corteza adrenal (Figura 5). Fue la primera proteína ABC descrita, ya en 1976 (Juliano y Ling, 1976), y es altamente efectiva en el transporte de cationes hidrofóbicos. También extrusiona fuera de la célula fármacos anticancerosos como las antraciclinas (doxorrubicina, daunorrubicina, epirubicina); los vinka alcaloides (vincristina, vinblastina, vinorelbina), etoposide y topotecan entre otros.
- ABC C (o MRP, de multidrug-resistance-associated protein, proteína asociada a resistencia a múltiples drogas). Familia de proteínas compuesta de nueve miembros que tienen su mayor afinidad por el transporte de aniones orgánicos. Recibieron su nombre al ser caracterizada, en 1987, MRP-1 (Figura 5), una proteína asociada a resistencia a múltiples drogas diferente a la glicoproteína P (McGrath T y Center MS, 1987). Se sabe que su sobreexpresión confiere resistencia a drogas anticancerosas como la doxorrubicina, vincristina y etoposide.

- **ABC G.** El miembro más relevante de este grupo, relacionado con resistencia a múltiples drogas, se llama ABC G2 (Figura 5), también conocido como MXR (de mitoxantrone resistance protein; proteína de resistencia a mitoxantrona), BCRP (de breast cancer resistance protein; proteína de resistencia en cáncer de mama) o ABCP (de placental ABC; ABC de placenta) (Doyle LA, et al., 1998). Es una proteína de 72 kDa con un sólo sitio de unión a ATP y 6 dominios transmembrana, la mitad del tamaño de las otras proteínas ABC. Se ha propuesto que tiene que homodimerizar para poder ser activa. Esta proteína puede expulsar moléculas hidrofóbicas de gran tamaño cargadas tanto negativa como positivamente. Entre los fármacos anticancerosos por los que tiene mayor afinidad se encuentran la mitoxantrona, el topotecan y el flavopiridol.

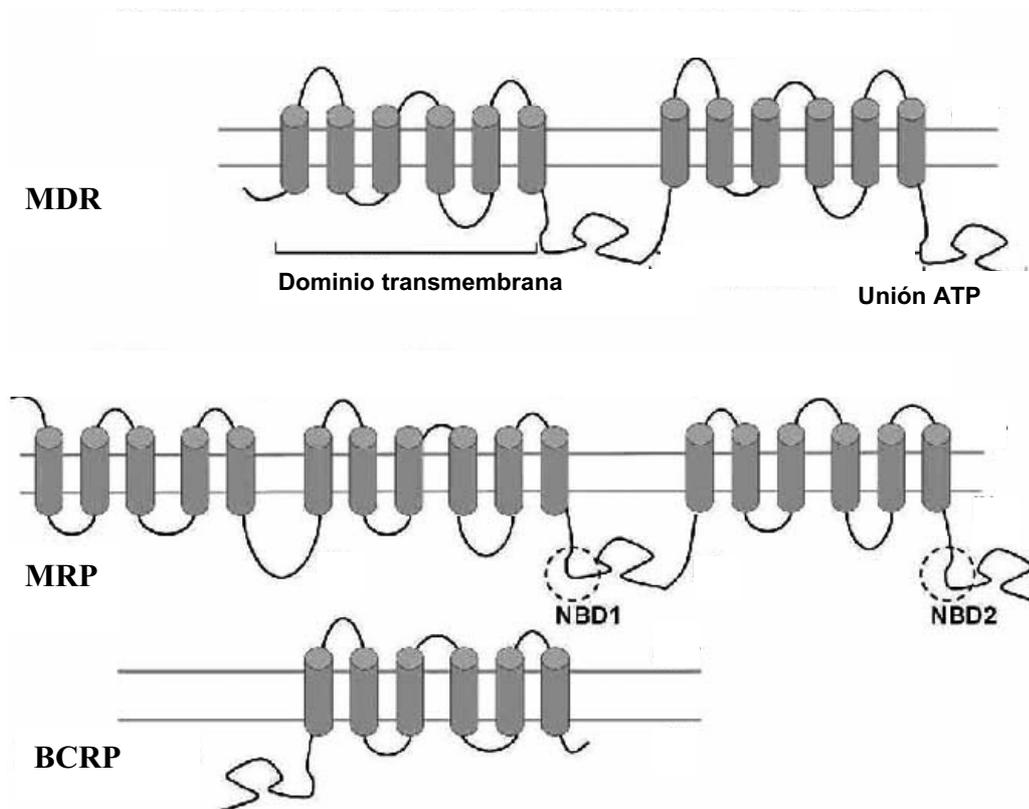


Figura 5. Estructura de los transportadores ABC que confieren resistencia a múltiples fármacos (NBD: dominio unión al nucleótido) (Modificado de Pérez-Tomás R, 2006).

Muchas de estas proteínas pueden conferir lo que se denomina “fenotipo de resistencia a múltiples drogas”, es decir, resistencia cruzada a muchos fármacos anticancerosos no relacionados ni funcional ni estructuralmente. En la actualidad hay muchos medicamentos anticancerosos cuyo mecanismo de acción es la inhibición de estos transportadores, aumentando así la concentración de la droga citotóxica en el interior de la célula cancerosa,

pero muchos no son suficientemente eficaces (Pérez-Tomás R, 2006). Es por ello que el conocimiento de las causas y los mecanismos de resistencia a drogas, así como el descubrimiento de nuevos inhibidores podrían hacer posible evitar este fenómeno y así realizar una mejor terapia del cáncer.

1.6. Desarrollo de nuevas drogas quimioterapéuticas

El ciclo de investigación y desarrollo (I+D) de los nuevos medicamentos abarca desde los primeros estudios orientados a la obtención de una estructura química potencialmente terapéutica hasta más allá de la comercialización del medicamento (Figura 6). La selección de los compuestos que serán evaluados para su uso como posibles agentes quimioterapéuticos se puede hacer mediante un muestreo al azar de productos naturales, la síntesis química racional de nuevos compuestos con dianas moleculares concretas o la síntesis de análogos de compuestos previamente testados para la utilidad en estudio. El nuevo compuesto tendrá que superar una fase de investigación preclínica donde se evaluará su eficacia en el tratamiento de neoplasias en animales mirando su toxicidad y efectos farmacológicos. Posteriormente, tras el desarrollo clínico realizado en pacientes y su registro podrá ser comercializado. En la actualidad, se calcula que tan sólo uno de cada 10.000 compuestos supera todas las fases y el período de tiempo estimado para la comercialización de un nuevo medicamento es de 10 a 15 años (Bosch F, 2007).

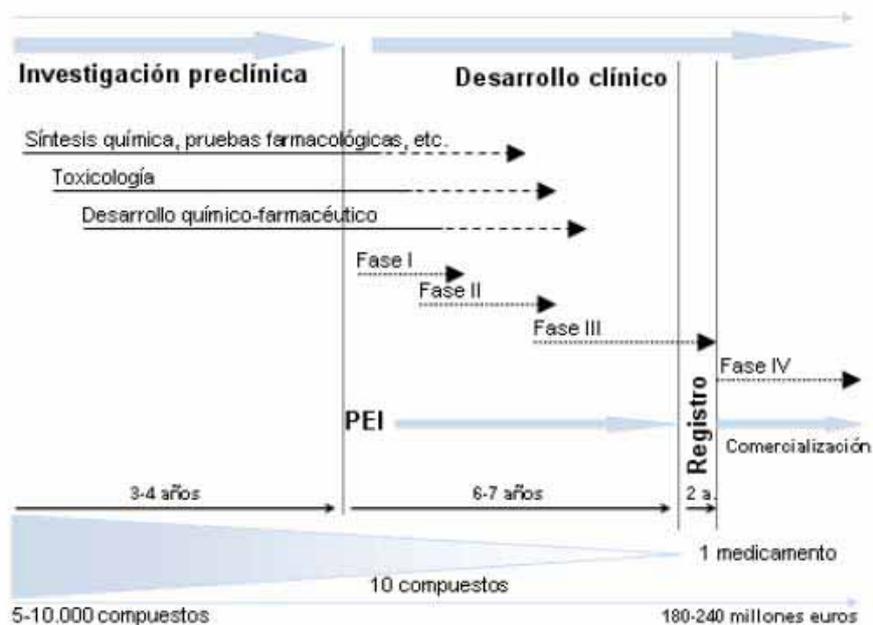


Figura 6. Ciclo general de I + D de un nuevo medicamento (Bosch F, 2007).

1.7. Modelos experimentales de cáncer *in vitro*

A partir de un tejido (humano, animal o vegetal) se pueden aislar células de un único tipo celular y, tras adaptarlas para crecer continuamente en condiciones *in vitro* en el laboratorio, se pueden usar en investigación. Estas células reciben el nombre de líneas celulares establecidas. Con ellas dispondremos de modelos experimentales *in vitro* a partir de los cuales extrapolar los resultados obtenidos a lo que le sucedería al material del que provienen. En nuestro estudio hemos usado líneas celulares establecidas obtenidas de tumores primarios o metástasis de pacientes de cáncer de mama o de ovario a las cuales se les han realizado diversos tratamientos con varias drogas en evaluación. A continuación se detallan las características propias de cada una de ellas.

MCF-7 son células humanas aisladas de una efusión pleural realizada en una paciente de raza caucásica con adenocarcinoma mamario. Tiene morfología epitelial, son células adherentes y el tiempo estimado de división es de 29 h. Expresan receptores de estrógeno, tienen p53 funcional y en cambio no expresan caspasa-3. Esta línea celular ha sido adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC) (referencia N°: HTB-22).

MCF-7 MR son células derivadas de las MCF-7, por tanto mantienen las características básicas de esa línea. Han sido seleccionadas tras la exposición a mitoxantrona, fármaco quimioterapéutico, durante un largo período de tiempo. Son resistentes a esta droga y sobreexpresan el transportador de membrana ABC G2, el cual les confiere fenotipo de resistencia a múltiples fármacos (Taylor CW, et al., 1991). Esta línea nos fue cedida por el Dr. Scheffer (Departamento de Patología, VUmc, Ámsterdam, The Netherlands) con el cual colaboramos en un estudio.

MDA-MB-231, son células de un adenocarcinoma de glándula mamaria de una mujer de raza caucásica aisladas de una efusión pleural. Morfología epitelial, adherentes, no expresan receptores de estrógenos y tienen mutada p53. Ha sido adquirida de la European Collection of Animal Cell Culture (ECACC) con referencia N°: 92020424 y consta que han sufrido 35 pases.

MDA-MB-468 son células que provienen de un adenocarcinoma de glándula mamaria de una mujer de raza negra aisladas de una efusión pleural. Morfología epitelial, células adherentes y muy tumorigénicas en ratones atímicos (100% efectividad a los 21 días de inoculación de 10^7 células de forma subcutánea). Adquirida de la ATCC con N° de lote: 2462428.

A2780 son células establecidas de tejido tumoral de una paciente de cáncer de ovario no tratada. Pueden crecer formando una monocapa o en suspensión y tienen morfología epitelial. Las sublíneas A2780 SC1 p53+ y A2780 SC1 p53- tienen las mismas características que A2780, ya que derivan de ella, pero en la segunda se ha insertado un vector que sobreexpresa la proteína p53 mutada (Aquilina G, et al., 2000). Ambas fueron amablemente cedidas por Dr. Karran (Cancer Research, London, UK).

2. PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN NATURAL

Desde siempre, la mayor fuente de nuevos productos químicos con actividades biológicas interesantes para aplicaciones médicas ha sido la naturaleza. En el área de la oncología, desde los años 40, de las 155 moléculas aprobadas para el tratamiento del cáncer, el 73 % de ellas no son sintéticas, y de éstas el 47 % son productos naturales o compuestos directamente derivados de ellos (Newman DJ y Cragg GM, 2007). Es por ello y por la necesidad de encontrar nuevos compuestos anticancerosos activos, que hemos centrado esta investigación en identificar y caracterizar dos sustancias anticancerosas de origen natural pertenecientes a dos familias diferentes de sustancias químicas: los depsipéptidos y las prodigininas.

2.1. Depsipéptidos

2.1.1. Estructura química y organismos productores

Los depsipéptidos son compuestos naturales con estructura polimérica y análogos a los péptidos. Su estructura química se basa en hidroxiacidos y aminoácidos unidos por enlaces éster y amida. Las estructuras pueden ser muy variadas a la vez que muy complejas. Se ha descrito una enorme cantidad de depsipéptidos que se agrupan por familias, generalmente con estructuras similares u organismo productor compartido. La mayoría de los depsipéptidos están producidos por organismos marinos o microorganismos terrestres. A continuación se muestra una clasificación de las principales familias según el organismo del cual han sido aislados (Hamada Y y Shioiri T, 2005; Sarabia F, et al., 2004; Ballard CE, et al., 2002).

- Depsipéptidos obtenidos de esponjas:
 - Familia (Fam.) Geodiamólidos; (A, B, C, D, E, F, TA) (*Geodia* sp.(de specie; especie), *Pseudaxinyssa* sp., *Hemiasterella minor*).
 - Neosifoniamólido A; (*Neosiphonia superstes*).
 - Fam. Papuamidas (A, B, C, D); (*Theonella* spp. (de species; especies)).
 - Arenastatina A; (*Dysidea arenaria*).
 - Fam. Halicilindramidas (A, B, C); (*Halichondria cylindrata*).
 - Fam. Teonelapeptólidos; (*Theonella* sp.).
 - Fam. Calipeltinas (A, B, C); (*Callipelta* sp.).
 - Fam. Jaspámidos o Jasplaquinólidos (A, B, C); (*Jaspis* sp.).
 - Ciclotitistida A; (*Theonella swinhoei*).

– Depsipéptidos obtenidos de bacterias:

- Fam. Serrawettins (W1 o serratamolide o AT514, W2, W3); (*Serratia* sp.).
- FR901228 o FK228; (*Chromobacterium violaceum*).
- Fam. Korkormicinas (A, B, C, D, E, F, G); (*Micromonospora* sp. C39500).
- Fam. Quinoxapeptinas (A, B, C); (*Actinomycetales* sp. MA7095).
- Vancomicina; (*Streptomyces orientalis*) (Figura 7).

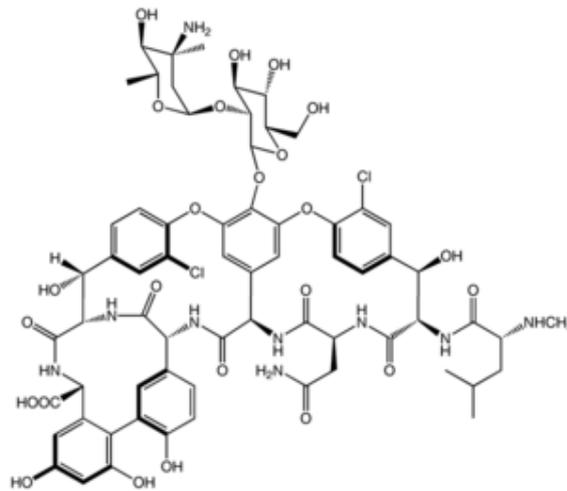


Figura 7. Vancomicina

- Tiocoralina; (*Micromonospora* sp. L-13-ACM2-092).
- Montanastatina; (*Streptomyces anulatus*).
- Fam. Kailuinas (A, B, C, D); (Bacteria Gram-negativa BH-107).
- Himastatina; (*Streptomyces hygrosopicus*).
- Fam. Cereulido (Cereulido, Homocereulido); (*Bacillus cereus*).
- Fam. Polioxipeptinas (A, B); (*Streptomyces* sp.).
- Fam. Criptoficinas (1, 16, 21, 23, 31, 176, A, B...); (*Nostoc* sp.).
- Fam. Lingbiabelinas (A, B); (*Lyngbya majuscula*).
- GE3; (*Streptomyces* sp. GE3).
- Fam. Fusaricidinas (B, C, D); (*Bacillus polymyxa*).
- Vinilamicina; (*Streptomyces* sp.).
- WAP-8294A₂; (*Lysobacter* sp.).
- Fam. LI-F; (*Bacillus polymyxa*).
- Viscosinamida; (*Pseudomonas fluorescens*).
- Fam. Nostopeptinas (A, B); (*Nostoc minutum*).

- Fam. Micropeptinas 478 (A, B); (*Microcystis aeruginosa*).
- A90720A; (*Microcystis aeruginosa*).
- Valinomicina; (*Streptomyces tsusimaensis*) (Figura 8).

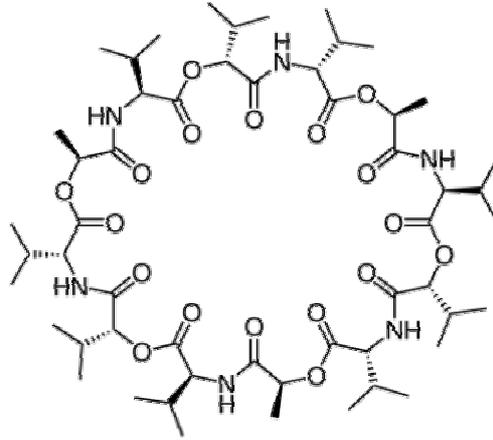


Figura 8. Valinomicina.

- YM-47141, YM-47142; (*Flexibacter* sp.).
- Fam. Malevamidas (A, B, C); (*Symploca laete-viridis*).
- Cianopeptolina S; (*Microcystis* sp.).
- Oscilapeptina G; (*Oscillatoria agardhii*).
- Fam. Acinomicinas; (*Streptomyces* sp.) (Figura 9).

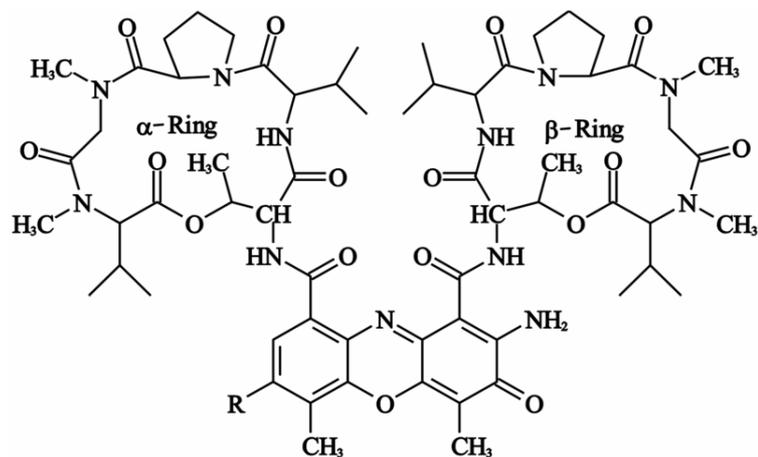


Figura 9. Actinomicina.

– Depsipeptidos obtenidos de hongos:

- Petriolina A; (*Petriella sordida*).
- Fam. Aureobasidinas; (*Aureobasidium pullulans*).
- Sansalvamida; (*Haoldule wrightii*).

- Glomosporina; (*Glomospora* sp.).
 - SCH217048; (cultivo de hongos no identificado).
 - Beauveriolido III; (*Beauveria* sp.).
 - SCH58149; (*Acremonium* sp.).
 - Fam. Exumoides (A, B); (*Scytalidium* sp.).
- Depsipéptidos obtenidos de moluscos:
- Fam. Kahalalido (A, B, C, D, E, F, G); (*Elysia rufescens*) (Figura 10).

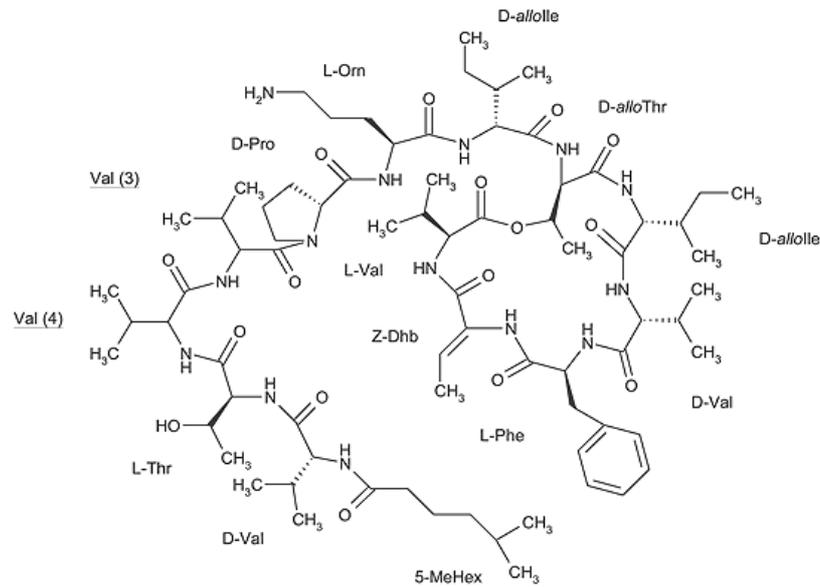


Figura 10. Kahalalido F.

- Fam. Onquidinas (Onquidina, B); (*Onchidium* sp.).
 - Kulólido; (*Philinopsis speciosa*).
 - Fam. Dolastatinas; (*Dolabella auricularia*).
- Depsipéptidos obtenidos de ascidios:
- Fam. Tamandarinas (A, B); (Fam. *Didemnidae*).
 - Fam. Didemnas; (*Trididemnum solidum*).
 - Fam. Ecteinascidinas (ETs); (*Ecteinascidia turbinata*).

2.1.2. Efectos farmacológicos

Los depsipéptidos recientemente han despertado un gran interés debido a su amplia variedad de actividades biológicas. A continuación se muestra una clasificación de

algunos depsipéptidos según su principal actividad, aunque la mayoría de ellos presentan más de un tipo de efecto biológico (Ballard CE, et al., 2002, Sarabia F, et al., 2004).

El potencial terapéutico más amplio de los depsipéptidos lo muestran como agentes **anticancerosos**. Son muchas las familias de depsipéptidos a las que se les atribuye esta capacidad (Ballard CE, et al., 2002). Varios depsipéptidos están en ensayos clínicos. Éste es el caso de didemnina B, el cual llegó a estudios de fase II donde demostró su capacidad anticancerosa pero resultó eliminado del estudio al mostrar cardiotoxicidad (Geldof AA, et al., 1999). Por el contrario dihidrodidemnina (Aplidin®), que es estructuralmente similar a didemnina B, se encuentra actualmente en ensayos clínicos avanzados ya que ha mostrado una mayor eficacia a la vez que no causa la toxicidad del otro compuesto (Faivre S, et al., 2005). Kahalalido F y FK228 (“depsipéptido” o FR901228) son otros ejemplos de depsipéptidos en ensayos clínicos de fase II con demostrada capacidad antitumoral (Hamann MT, 2004; Stadler WM, et al., 2006).

Algunos depsipéptidos son agentes **antibacterianos**, ya que inhiben el crecimiento de varias bacterias. Valinomicina y Vancomicina son dos potentes antibióticos (Duax W, et al., 1996; Nicolaou KC, et al., 1999). WAP-8294A₂ muestra una gran actividad contra bacterias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y *Enterococci* resistentes a vancomicina *in vitro* e *in vivo* (Kato A, et al., 1998). Dos teonelapeptólidos también han mostrado actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* o *Bacillus subtilis* entre otras (Tsuda M, et al., 1999).

Podemos encontrar depsipéptidos con actividad **antiviral**. Las calipeltinas han mostrado actividad contra el virus del sida (D’Auria MV, et al., 1996), así como la sansalvamida A muestra actividad inhibidora de la topoisomerasa de un poxivirus llamado MCV (de *Molluscum Contagiosum Virus*; virus contagioso del mejillón) (Hwang Y, et al., 1999).

Compuestos **antifúngicos** inhibidores del crecimiento de hongos que causan muchas de las infecciones oportunistas asociadas al sida también se encuentran entre los depsipéptidos. Éste es el caso de la glomosporina, la cual es eficaz contra *Aspergillus fumigatus* y algunas levaduras (Sato T, 2000).

Algunos depsipéptidos actúan inhibiendo la elastasa, una proteasa asociada con la rotura del tejido conectivo, y con ello funcionan como agentes **anti-inflamatorios**. Miembros de esta clase incluyen SCH217048, YM-47141, YM-47142, salinamidas y nostopeptinas (Ballard CE, et al., 2002).

Por último, se han descrito depsipéptidos con efectos positivos sobre el sistema **cardiovascular**. Beauveriólido III (Namatame I, et al., 1999) y SCH58149 (Hedge VR, et al., 1998) afectan, respectivamente, al número de gotas lipídicas y al ratio de lipoproteínas, dos factores que contribuyen a la aterosclerosis.

2.1.3. Mecanismos de acción

Se han descrito diferentes mecanismos de acción y diversas dianas moleculares entre los compuestos depsipeptídicos. Algunos de los más estudiados se citan a continuación.

Podemos encontrar ionóforos, como la valinomicina, antibiótico que transporta iones potasio de forma selectiva a través de la bicapa lipídica de la membrana celular (Duax WL, et al., 1996). Kahalalido F, por otro lado, altera la función de las membranas lisosomales (García-Rocha M, et al., 1996) provocando muerte celular por oncosis. Existen los que se unen al ADN como ET-743, concretamente entra en el surco menor del ADN, a la vez que provoca desorganización del ensamblaje de los microtúbulos (Rinehart KL, 2000). Por último, uno de los depsipéptidos con el que se han realizado más estudios es FK228, el cual ha sido descrito como un potente inhibidor de las histonas deacetilasas, regulando así numerosos procesos críticos para la célula (Konstantinopoulos PA, et al., 2006).

2.2. Prodigininas

2.2.1. Estructura química

Las prodigininas son una familia de pigmentos rojizos que se caracterizan por compartir una estructura química básica tripirrólica, conocida como **prodigioseno** (Figura 11).

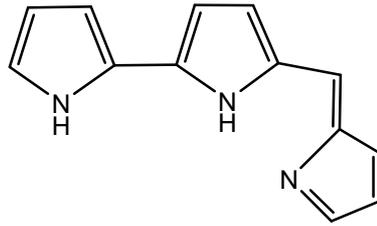


Figura 11. Prodigioseno.

A partir de este núcleo molecular, y según los sustituyentes y su estructura, podemos clasificar las prodigininas en cuatro grandes grupos (Bennett JW y Bentley R, 2000):

- tripirroles con cadenas lineales. Entre los que cabe destacar prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno) y undecilprodigiosina (cadena lateral undecil en carbono 2).
- derivados cíclicos con un anillo formado entre las posiciones 2 y 4 del anillo C del pirrol, como butil-meta-cicloheptilprodiginina y etil-meta-ciclononilprodiginina (metacicloprodigiosina).
- derivados cíclicos con un anillo entre las posiciones 3 y 4 del anillo C del pirrol y un grupo metil en el carbono 2, como cicloprodigiosina hidrocloreto.
- prodigininas macrocíclicas o derivados cíclicos con un anillo formado entre la posición 2 del pirrol C y la posición 10 del pirrol A, como ciclononilprodiginina y ciclometildecilprodiginina.

2.2.2. Organismos productores

Estos metabolitos secundarios son producidos por bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas (Tabla 7). Los organismos más relevantes son *Serratia* spp, *Streptomyces* spp y varias bacterias marinas incluyendo *Hahella chejuensis* y *Pseudoalteromonas denitrificans* (Figura 12).

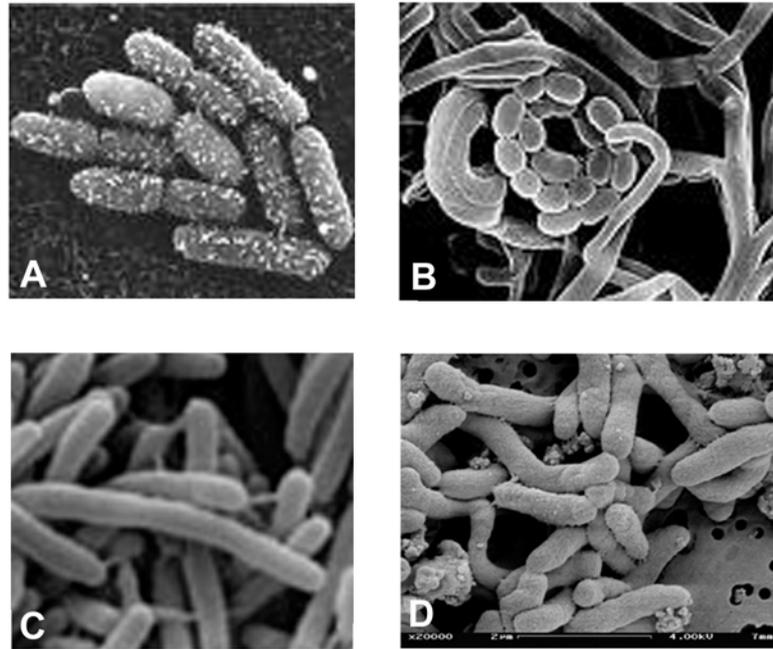


Figura 12. Fotografías de microscopía electrónica de algunas bacterias productoras de prodigininas (20000 X). **A.** *Serratia*; **B.** *Streptomyces*; **C.** *Hahella*; **D.** *Pseudoalteromonas*.

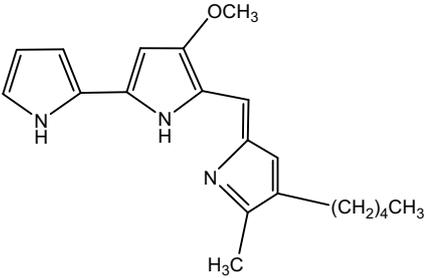
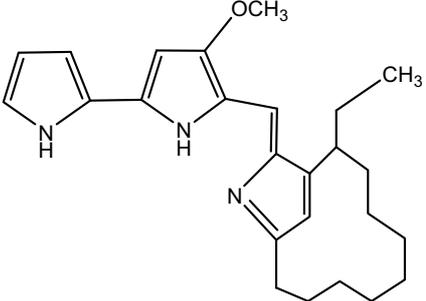
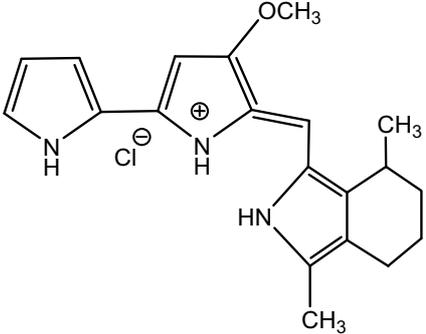
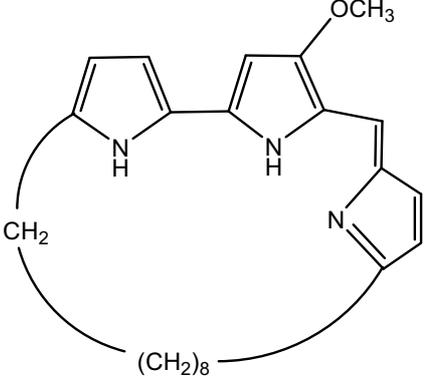
Prodigininas	Organismos productores	Referencias
<p>prodigiosina</p> 	<p><i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia 390006</i> <i>Serratia plymuthica</i> <i>Hahella chejuensis</i> <i>Pseudomonas magnesorubra</i> <i>Vibrio psychroerythreus</i></p>	<p>Hubbard R, 1950 Williams RP, 1980 ” Jeong H, 2005 Gerber NN, 1975a ”</p>
<p>etil-meta-ciclononilprodiginina</p> 	<p><i>Streptomyces longisporus ruber</i></p>	<p>Gerber NN, 1975a</p>
<p>cicloprodigiosina</p> 	<p><i>Alteromonas rubra</i> <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i></p>	<p>Gerber NN, 1979 Kawauchi K, 1997</p>
<p>ciclononilprodiginina</p> 	<p><i>Actinomadura pelletieri</i> <i>Actinomadura madurae</i></p>	<p>Gerber NN, 1975a</p>

Tabla 7. Ejemplos de prodigininas, cada una perteneciente a un grupo estructural diferente, y bacterias productoras (Modificado de Williamson NR, et al., 2006).

2.2.3. Actividad biológica

Las prodigininas son una familia de compuestos químicos con propiedades muy diversas. Muchas han sido descritas como potentes agentes **antimaláricos**, como es el caso de cicloprodigosina hidrocloreto (Kim HS, et al., 1999), ciclonoilprodiginina y ciclometildecilprodiginina (Gerber NN, 1975b).

También se han caracterizado propiedades **antifúngicas** y **antibacterianas** atribuidas a prodigininas de cepas del género *Serratia* (Gerber NN, 1975a, Bennett JW y Bentley R, 2000), así como propiedades **algucidas** a algunas prodigininas como PG-L-1, un pigmento de la familia producido por una bacteria marina (Nakashima T, et al., 2006).

Más recientemente, las prodigininas han despertado un creciente interés por sus propiedades como **inmunosupresores** y agentes anticancerosos (Montaner y Pérez-Tomás, 2003). La capacidad de inhibir específicamente la proliferación de linfocitos T ha sido descrita ampliamente en estudios con undecilprodigosina tanto *in vitro* (Tsuji RF, et al., 1990; Songia S, et al., 1997) como *in vivo* (Nakamura A, et al., 1989, Tsuji RF, et al., 1992). Cicloprodigosina hidrocloreto (Kawauchi K, et al., 1997) y metacicloprodigosina (Magae J, et al., 1996) también poseen propiedades inmunosupresoras. Por último, PNU156804, un análogo de undecilprodigosina, inhibe de forma eficaz la proliferación de linfocitos T y B evitando rechazo de trasplantes humanos (Stepkowski SM, et al., 2002).

Respecto a las propiedades **anticancerosas** de las prodigininas, muchas de ellas tienen la capacidad de inducir muerte celular en diversos tipos de células cancerosas. Éste es el caso de cicloprodigosina hidrocloreto, la cual ha demostrado esta propiedad *in vitro* e *in vivo*, especialmente en cáncer de mama (Yamamoto D, et al., 2000; Yamamoto D, et al., 2002). Más recientemente se ha descrito la propiedad anticancerosa *in vitro* de metacicloprodigosina y undecilprodigosina (Liu R, et al., 2005). También cabe destacar la eficacia anticancerosa de dos derivados de prodigosina llamados Obatoclax mesylate (GX15-070MS) (Trudel S, et al., 2007) y 2-(1H-pirrol-2-il)-5[(2H-pirrol-2-ilideno)metil]-1H-pirrol.

2.2.4. Mecanismos de acción

A partir de algunos indicios experimentales se ha especulado acerca de cuatro posibles mecanismos de acción que podrían tener las prodigininas a la hora de provocar sus efectos farmacológicos (Pérez-Tomás R, 2003).

Rotura del ADN

Las prodigininas son moléculas muy hidrófobas que podrían difundir libremente a través de las membranas e interactuar con el ADN provocando roturas en la doble cadena de ADN. Tras el daño en el ADN, la célula desencadena un programa de parada de ciclo para iniciar su reparación, y si el daño es muy grave y no es posible repararlo, la célula podría activar el programa apoptótico.

Variación del pH intracelular

La molécula podría ser incorporada en la bicapa lipídica de la membrana plasmática, donde por endocitosis podría alcanzar el endosoma o algún otro compartimento ácido, desacoplar la bombas ATPasas ejerciendo su función de H⁺/Cl⁻ simporte e inducir la neutralización de este compartimento, provocando a su vez la acidificación del citoplasma y, en algunos casos, la muerte por apoptosis.

Activación o inhibición de receptores de membrana

La molécula podría inhibir/activar, de forma directa (no se ha descrito ningún receptor específico de estas moléculas hasta el momento) o de forma indirecta, receptores de membrana clave en la regulación del ciclo celular o la apoptosis de las células.

Interacción con la membrana externa mitocondria

Las prodigininas podrían difundir libremente a través de las membranas plasmáticas, interactuar con la membrana externa mitocondrial desacoplando la F₀-F₁-ATPasa y provocar la salida de moléculas apoptogénicas, como por ejemplo el citocromo c, lo cual desencadenaría el proceso apoptótico.

2.3. La bacteria *Serratia marcescens* (*S.marcescens*)

2.3.1. Historia

Es imposible saber con exactitud cuándo fue la primera vez que alguien vio, aparentemente, un alimento “ensangrentado”. El primer relato del que tenemos constancia referente a este hecho data del 332 a.C., cuando Alejandro Magno y sus tropas estaban sitiando la ciudad de Tiro, en plena conquista de Asia. Ésta es probablemente la primera referencia a una contaminación debida a *S.marcescens*. Las colonias de esta bacteria, al llegar a su madurez, adquieren un aspecto rojizo y viscoso que se puede confundir con el de la sangre. Este hecho debió suceder en muchos lugares del mundo, pero es en la sociedad occidental donde se encuentra el mayor testimonio escrito debido a la gran controversia religiosa que causó (Gaughran ER, 1969). Durante la edad media, se sucedieron en Europa diversos casos de “milagros” consistentes en la aparición de sangre en el pan consagrado utilizado en la ceremonia cristiana de la Eucaristía. No sería hasta mucho más tarde que se atribuyera este hecho al crecimiento de la bacteria *S.marcescens*. El más famoso de estos sucesos ocurrió en 1263 durante la celebración de una misa en una pequeña iglesia cerca del lago Bolsena, en Italia. Éste quedó inmortalizado por el artista italiano Rafael, el cual realizó un fresco en el Vaticano (Figura 13).



Figura 13. “El Milagro de Bolsena” de Rafael.

El sacerdote que oficiaba la misa sufría una crisis de fe y al ir a bendecir los elementos de la comunión, vio cómo desde el pan consagrado “goteaba sangre” hasta manchar su hábito. Este suceso fue llamado “El Milagro de Bolsena” (Cullen JC, 1994) y a raíz de él se instituyó la celebración religiosa del Corpus Cristi.

Muchas fueron las apariciones de sangre posiblemente atribuibles a *S.marcescens* durante el curso de la historia, pero no fue hasta 1819 que una serie de sucesos fueron clave para desvelar dicho misterio. En un pequeño pueblo llamado Pione di Sacco cundió la alarma al aparecer, en muy poco tiempo, numerosos casos de alimentos sanguinolentos en las casas de muchos aldeanos. Fue entonces cuando, por primera vez, se llevó a cabo una investigación oficial bajo la dirección del Dr. Vincenzo Sette para descubrir qué era el causante de dichas manchas rojizas en la comida. Sette concluyó que un hongo era el causante de dicho fenómeno y llamó al organismo *Zaogalactina imetropha*, del griego “limo/baba viviente situado en la comida” (Bennett JW y Bentley R, 2000).

Al mismo tiempo, y de forma independiente, un farmacéutico llamado Bartolomeo Bizio, que luego sería profesor de la Universidad de Pádua, examinó unas manchas rojizas sobre polenta, una sémola de maíz muy conocida en Italia. Bizio también clasificó al organismo como un hongo y acuñó el nombre que se usa en la actualidad de *S.marcescens* (Bizio B, 1823). Usó el nombre de *Serratia* en honor al físico italiano Serafino Serrati, inventor de la máquina de vapor y *marcescens*, del latín “macerado, marchitado” por el aspecto mucilaginoso de la sustancia.

Ambos cometieron el error de catalogarlo como hongo pero fueron los primeros en dar explicación a los llamados “milagros” al evidenciar que el material rojizo que aparecía en la comida era debido a un organismo vivo y que se podía transmitir por inoculación como si fueran semillas. Asimismo, contribuyeron en gran medida a la microbiología moderna al ser los primeros en usar un medio sólido, la polenta, para cultivar microorganismos.

2.3.2. El género *Serratia*

El género *Serratia* está clasificado dentro de la familia de las *Enterobacteriaceae*. Son bacilos de 0.5-0.8 μm de diámetro y 0.9-2.0 μm de longitud, gram-negativos, anaerobios facultativos, quimiorganotróficos y generalmente móviles gracias a flagelos peritricos. Crecen bien de 30-37 °C y se puede encontrar en ambientes muy diversos, desde muestras clínicas, tierra, agua, superficie de plantas, tracto digestivo de roedores e insectos, etc. Algunas especies pueden estar involucradas en bacteriemias o pueden ser aisladas de esputos sin ninguna importancia clínica. Algunas causan mastitis en vacas y otras infecciones animales (Holt JG, et al., 1994). En la actualidad, dentro del género

Serratia podemos encontrar diez especies diferentes: *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans* y *S. rubidaea* (Holt JG, et al., 1994).

Algunas especies y biotipos de *Serratia* producen un pigmento rojizo, llamado prodigiosina, que puede variar de tonalidad, dependiendo de la edad de la colonia. La producción del pigmento depende de unas condiciones específicas del medio de crecimiento (Williams RP y Quadri SM, 1980). De todas las especies del género, tan sólo *S.marcescens* (Figura 14), *S.plymuthica* y *S.rubidaea* son productoras de prodigiosina (Grimont F y Grimont PAD, 1991).

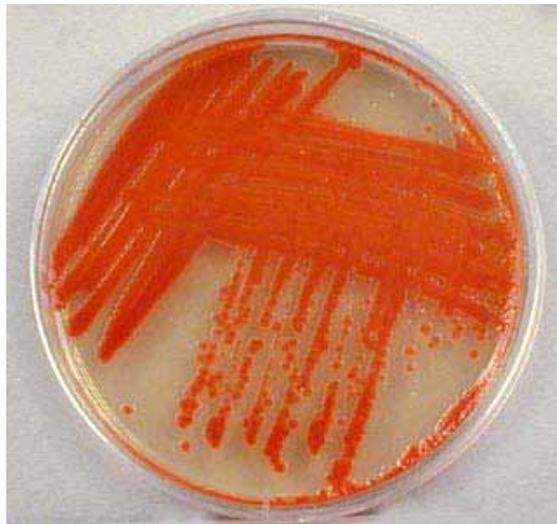


Figura 14. Placa de cultivo con colonias de la bacteria cromogénica *S.marcescens*.

S.marcescens es una bacteria saprófita que se encuentra en nichos ecológicos muy diversos, siendo frecuente en alimentos ricos en almidón, y además crece en condiciones extremas, incluso en presencia de desinfectantes, antisépticos y agua destilada (Grimont F y Grimont PAD, 1991). Es una bacteria patógena oportunista que provoca infecciones nosocomiales en pacientes hospitalizados, causando septicemia, meningitis, infecciones del tracto respiratorio y urinario, endocarditis e infección de heridas (Holt JG, et al., 1994). Existe una elevada tendencia entre las cepas hospitalarias a ser no pigmentadas, y difícilmente diferenciables de otros organismos coliformes, mientras que los biotipos pigmentados son ubicuos (Hejazi A y Falkiner FR, 1997).

2.3.3. La toxina de Coley

A finales del siglo XIX, un cirujano del Memorial Sloan Kattering Cancer Center de Nueva York llamado William B. Coley, se dio cuenta de que, desde el uso de la asepsia en las operaciones quirúrgicas, los cirujanos tenían menos éxito operando cánceres que sus predecesores del siglo anterior. También observó que, en ocasiones, se habían dado casos de pacientes que se curaban espontáneamente de los tumores y quiso averiguar su causa. La coincidencia que halló entre dichos pacientes fue que, tras la operación, todos habían sufrido infecciones agudas más o menos graves. Fue por ello que intentó inducir infecciones en sus pacientes para provocar el retroceso del tumor. Eligió cultivos de *Streptococcus* spp, causantes de la erisipela (infección con síntomas dolorosos pero raramente peligrosa para el individuo) y obtuvo algunos resultados prometedores. En algunos pacientes la infección se le descontrolaba, mientras que en otras ocasiones ni siquiera aparecía fiebre. Esta falta de control sobre la infección le llevó a usar *Streptococcus* muertos para ver si el causante de la desaparición del tumor no era la bacteria viva en sí, sino alguna “toxina” que ésta tuviera. Posteriormente pasó a utilizar una mezcla de *Streptococcus* junto con otra bacteria llamada *S.marcescens*, entonces *Bacillus prodigiosus*, para aumentar la virulencia de la toxina. La combinación de estas dos bacterias inactivadas por calor pasó a conocerse como la toxina de Coley (Coley WB, 1906). Coley trató con buenos resultados a cientos de enfermos, aunque su éxito dependía en gran medida del tipo de tumor a tratar. Por ejemplo, de 104 pacientes con sarcoma no operable, casi la mitad mostraron una regresión total del tumor con una supervivencia mayor a 5 años y un 20 % no mostraron signos de recaída en los 20 años posteriores a la terapia. En cambio, cuando otros tumores eran tratados, sobretodo carcinomas, los resultados no eran tan buenos (Starnes CO, 1992).

Después de su muerte en 1936, desapareció el interés por la terapia con la toxina de Coley. La causa fue que se generalizó el tratamiento con radioterapia y quimioterapia y, comparados con estas técnicas, los resultados de la toxina de Coley no eran regulares y además se demoraban mucho en el tiempo. Por otro lado, las dosis tenían que ser diseñadas para cada paciente e incrementadas gradualmente para obtener la respuesta inmune adecuada.

La explicación del éxito de la terapia con la toxina de Coley de tumores de origen mesodérmico (sarcomas y linfosarcomas) ha sido atribuida al carácter inmunogénico de dichos tumores, capacidad de causar repuesta en el sistema inmune y remitir como consecuencia de ella (Rook G, 1992). El mecanismo molecular concreto responsable del

retroceso de los tumores es aún hoy tema de debate. La presencia del lipopolisacárido (LPS, de *lipopolysaccharide*; lipopolisacárido) de membrana, una endotoxina de la bacteria gram-negativa *S.marcescens*, provoca la inducción de la citoquina llamada TNF (de *tumor necrosis factor*; factor de necrosis tumoral), la cual se cree responsable, al menos en parte, de la acción antitumoral de la toxina. Durante mucho tiempo se le atribuyó a esta molécula la capacidad de disminuir el tamaño de los tumores, aunque estudios posteriores con TNF recombinante apuntaron a que no debía ser el responsable, ya que no igualó los resultados antitumorales (Wiemann B y Starnes CO, 1994). Otras citoquinas se han evaluado como las posibles causantes de la recesión tumoral en modelos animales y tan sólo interleuquina 12 ha mostrado un fuerte efecto antitumoral comparable a aquel provocado por la toxina de Coley (Tsung K y Norton JA, 2006).

En la misma línea de terapia del cáncer con sustancias de origen bacteriano, en nuestro laboratorio hemos identificado la presencia de dos sustancias biológicamente activas en la cepa bacteriana de *S.marcescens* 2170, llamadas serratomolide y prodigiosina, que hemos caracterizado y las cuales poseen un amplio poder antitumoral. Ambas moléculas también debían hallarse en la toxina de Coley, además de la endotoxina LPS, y podrían haber contribuido a la capacidad antitumoral de ésta.

2.3.4. Serratomolide [Serrawettin W1, AT514 (de antitumoral 514 kDa)]

Serratomolide (Figura 15) fue aislada en 1961 durante un estudio acerca de los pigmentos producidos por *S.marcescens*. Es un tetradepsipéptido cíclico también llamado ciclo[(3R)-hidroxidecanoil-L-seril-(3R)-3-hidroxidecanoil-L-serilo] y su fórmula molecular es $C_{26}H_{46}O_8N_2$. El compuesto se definió como un metabolito neutro incoloro con una estructura depsipeptídica que difería de compuestos de dicha familia, como la valinomicina, por contener residuos β -hidroxiácidos en vez de α -hidroxiácidos. (Wasserman HH, et al., 1961).

El nombre de serratomolide se lo asignó Wasserman y colaboradores en 1961, pero también se le han dado otros como serrawettin W1 (Matsuyama T, et al., 1989) o AT514, término recientemente acuñado por nuestro grupo de investigación y con el que nos referiremos a ella de ahora en adelante.

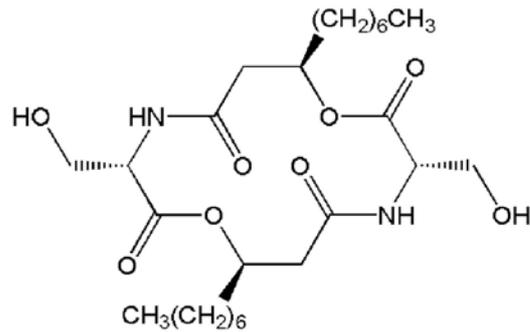


Figura 15. Estructura de AT514.

2.3.4.1. Biosíntesis

La biosíntesis de metabolitos compuestos por varios componentes conectados en una secuencia definida, como es el caso de Serrawettin W2, se ha visto que está llevada a cabo por el sistema de las sintasas peptídicas no ribosómicas. En el caso de la biosíntesis de AT514, una dilactona simétrica compuesta de dos moléculas de ácido serratámico, también se ha sugerido este proceso (Marahiel MA, et al., 1997).

Además se ha visto que la producción de AT514 es dependiente de la temperatura, al igual que prodigiosina, el otro metabolito secundario de *S.marcescens* centro de este estudio, y que ambos comparten parte de la ruta biosintética, ya que mutantes en el gen pswP son deficientes en la producción de ambos metabolitos secundarios (Sunaga S, et al., 2004).

Recientemente se ha publicado un estudio con diferentes métodos de síntesis química para obtener AT514 y se apunta a la síntesis del precursor lineal en fase sólida y a la posterior ciclación del producto en solución como el método más robusto y eficaz para obtener dicho depsipéptido (Teixidó M, et al., 2007).

2.3.4.2. Localización celular

La localización celular de AT514 no ha sido estudiada en profundidad, pero hay un artículo donde indirectamente se discute acerca de que se encuentra en la superficie celular, sin concretar el lugar exacto (Bar-Ness R, et al., 1988).

2.3.4.3. Función en *S.marcescens*

Se han realizado estudios donde se demuestra *in vitro* que la presencia de AT514 en cepas de *S.marcescens* hace que la bacteria sea más resistente a ser fagocitada por leucocitos polimorfonucleares, mientras que cepas mutantes, deficientes en la producción de AT514, son constantemente fagocitadas por estos (Miyazaki Y, et al., 1993). Dichos resultados sugieren que AT514 podría contribuir a la virulencia de la bacteria *S.marcescens*.

AT514 también ha sido descrita como agente humectante, ya que bloquea los lugares hidrófobos de la superficie celular reduciendo presuntamente así la hidrofobicidad de la bacteria (Bar-Ness R, et al., 1988).

2.3.4.4. Actividades farmacológicas

Las actividades farmacológicas que se han testado de AT514 han sido como agente **antifúngico** y **antibacteriano** (Wasserman HH, et al., 1962). Para evaluar su actividad antibiótica se utilizó un amplio panel de organismos, de los cuales a continuación se muestran bacterias, levaduras y hongos que fueron los que resultaron inhibidos a las concentraciones indicadas (Tabla 8).

Organismo	µg/ml 48 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	50
<i>Bacillus subtilis</i>	50
<i>Sarcina lutea</i>	6.25
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
<i>Mycobacterium avium</i>	25
<i>Brucella bronchiseptica</i>	>100
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	>100
<i>Trichophyton rubrum</i>	50
<i>Trichophyton interdigitale</i>	50

Tabla 8. Listado de los organismos inhibidos por AT514 (Modificado de Wasserman HH, et al., 1962).

Aunque las actividades antifúngicas y antibacterianas mostradas son débiles en comparación con los antibióticos comúnmente utilizados en la clínica, están en el mismo rango de actividad antibiótica que otros depsipéptidos, como los aislados del género *Fusarium*.

2.3.5. Prodigiosina

Prodigiosina, 2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno ($C_{20}H_{25}N_3O$), es un pigmento rojo con estructura de tripirrol lineal y con un peso molecular de 323.44 dalton (Figura 16). Es sensible a la luz, insoluble en agua, moderadamente soluble en alcohol y éter y soluble en cloroformo, bromoformo y benceno (Index Merck).

Prodigiosina tiene la capacidad de protonarse, existiendo dos conformaciones diferentes, la α y la β , dependiendo de si se encuentra protonada o no, respectivamente (Manderville RA, 2001). Funciona como indicador de pH (Hearn WR, et al., 1968), siendo roja en soluciones ácidas con una absorbancia máxima de 537 nm y naranja-amarillenta en solución alcalina, con un máximo a 470 nm.

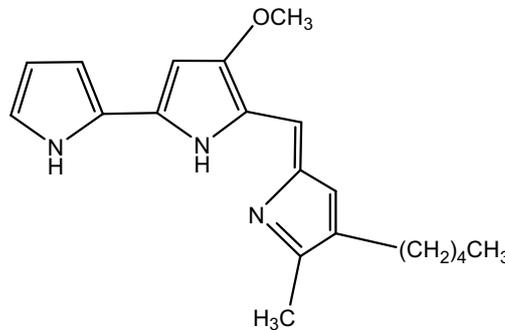


Figura 16. Estructura química de la prodigiosina.

El nombre prodigiosina se debe a Kraft, el cual extrajo “prodigiosine” de *Bacillus prodigiosus*, un antiguo sinónimo de *S.marcescens* (Kraft E, 1902). Posteriormente, Gerber propuso “prodiginina” como nombre trivial para la porción aromática tripirrólica que contiene el grupo metoxi de la estructura de la prodigiosina al identificar nuevos compuestos de la familia en actinomicetes (Gerber NN, 1969). Un año más tarde, Hearn usó el nombre de “prodigioseno” para designar el esqueleto tripirrólico de estos pigmentos (Hearn WR, et al., 1970). Los diferentes compuestos de la familia de la prodigiosina tendrán una nomenclatura u otra según se considere como esqueleto el

prodigioseno o la prodiginina, predominando como nombre general de la familia prodigininas.

2.3.5.1. Biosíntesis

La producción de prodigiosina ha sido un campo de interés en microbiología durante muchos años. En principio se consideró un modelo apropiado para el estudio del metabolismo secundario de las bacterias. *S.marcescens* es un microbio facultativo, por lo tanto puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno, pero la síntesis de prodigiosina se ve completamente inhibida en condiciones anaeróbicas. Cuanto más oxígeno hay en el aire, mayor cantidad de prodigiosina produce la bacteria (Nakajima M, 1965).

El pH también parece afectar la síntesis de prodigiosina, teniendo que situarse entre valores de 7.2 y 8.0 para que ésta se realice de forma óptima (Williams RP y Quadri SMH, 1980).

De igual modo, la temperatura es otro factor crítico para la producción del pigmento. Se ha visto que prodigiosina se forma en un rango relativamente estrecho de temperatura, de 12 a 36°, comparado con el amplio rango de crecimiento de la bacteria, de 4 a 42°. La temperatura óptima para obtener una buena pigmentación se sitúa en 27-30° (Williams RP, et al., 1971).

Las condiciones mínimas del medio de crecimiento de *S.marcescens* para favorecer la síntesis de prodigiosina son sales inorgánicas, glicerol como fuente de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno (Bunting MI, 1940). Existen algunos sustratos que inhiben la producción de prodigiosina, como es el caso de la glucosa (Lorén JG y Guinea J, 1978).

Por último, la luz condiciona la velocidad de síntesis y la cantidad de pigmento producida por la bacteria. En presencia de luz se obtiene el pico de producción de prodigiosina a los 2-3 días. En cambio en ausencia se necesitan 3-4 días, aunque se obtiene mayor rendimiento (Rjazantseva IN, et al., 1994).

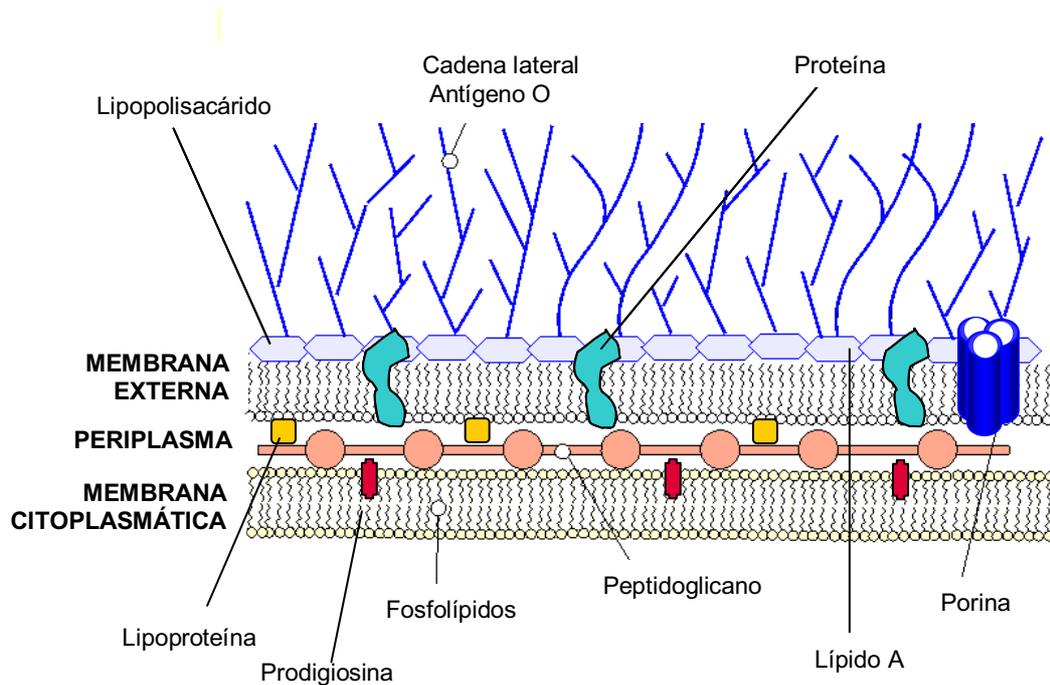


Figura 18. Pared celular de una bacteria Gram negativa (Modificado de Madigan MT, et al., 2004).

2.3.5.3. Función en *S.marcescens*

Como ocurre con muchos metabolitos secundarios, el papel fisiológico real de prodigiosina en el organismo que la produce es aún hoy tema de debate. Una de las hipótesis al respecto surgió a raíz de observar que prodigiosina cambiaba de color según el pH de las soluciones. Observaron que ello era debido a que prodigiosina era un aceptor de electrones autooxidable y especularon que podría estar participando en la respiración de *S.marcescens*, dada su similitud con moléculas de la cadena respiratoria como los citocromos (Allen EG, 1967). De todos modos, posteriormente se llevaron a cabo experimentos infructuosos intentando encontrar diferencias significativas respecto a respirometría, eficiencia metabólica, motilidad, medidas del catabolismo, etc..., entre cepas de *Serratia* pigmentadas y no pigmentadas (Viñas M, et al. 2007).

También se ha sugerido que los metabolitos secundarios puedan tener algún papel en neutralizar productos finales del metabolismo primario de la bacteria que pudieran tener un efecto nocivo para ella, haciendo de desagüe metabólico (Hood DW, et al., 1992). Hasta la actualidad no hay ninguna evidencia que indique que la

acumulación de los sustratos que se usan para la síntesis de prodigiosina (prolina, alanina y acetato) sea tóxica para la bacteria.

Por último, se ha especulado acerca de la posibilidad de que rutas biosintéticas con una baja especificidad por sus sustratos, como es el caso, puedan constituir una ventaja evolutiva a la hora de tener una rápida adaptación a medios cambiantes (Williamson NR, et al., 2006).

2.3.5.4. Actividades farmacológicas

A prodigiosina se le han atribuido todas las propiedades farmacológicas descritas en la familia de las prodigininas. Es un potente agente **antimalárico**, ya que muestra elevada toxicidad contra *Plasmodium falciparum*, el protozoo causante de dicha enfermedad (Castro AJ, 1967). Asimismo, prodigiosina ha sido descrita en otras ocasiones como agente **antiprotozoico**, concretamente contra *Entamoeba histolytica* (Balamuth W y Brent MM, 1950). También se le han atribuido propiedades **antifúngicas** a diversas cepas productoras de prodigiosina obtenidas de rizosferas (Kalbe C et al., 1996), así como propiedades **alguicidas** al pigmento producido por la bacteria marina *Hahella chejuensis*, el cual posee actividad lítica contra dinoflagelados y ha sido identificado como prodigiosina (Jeong H, et al., 2005). Es igualmente remarcable el efecto **antibacteriano** que prodigiosina posee contra un amplio grupo de bacterias Gram-positivas (Williams RP y Hearn WP, 1967). Prodigiosina es un **inmunosupresor** selectivo de linfocitos T (Han SB, 1998), acción que desarrolla principalmente inhibiendo la expresión de interleukina-2R α sin provocar toxicidad *in vivo* (Han SB, et al., 2001). Por último, sus propiedades **anticancerosas** han sido probadas en varias ocasiones, tanto en células cancerosas hematopoyéticas (Montaner B, et al., 2000), como en células de cáncer de estómago y cáncer de colon (Díaz-Ruiz C, et al., 2001; Montaner B, et al., 2001). También hay datos que demuestran su capacidad antimetastática *in vivo* ya que inhibe la capacidad invasiva de las células tumorales (Zang J, et al., 2005).

2.3.5.5. Posibles funciones ecológicas

Durante mucho tiempo se ha discutido acerca de las posibles ventajas, sobretodo respecto a una mayor capacidad de dispersión ecológica, que

prodigiosina podía proporcionar a su organismo productor. En la década de los 80, se realizaron unos estudios en los que se demostraba que las cepas de bacterias pigmentadas tenían un hidrofobicidad más elevada que las no pigmentadas (Burger SR y Bennett JW, 1985). Esto fue rebatido unos años más tarde, ya que otros investigadores demostraron que cepas clínicas de *S.marcescens* tenían propiedades hidrofóbicas en ausencia de prodigiosina y que la hidrofobicidad sólo se mostraba al crecer la bacteria a 30°, temperatura poco favorable para la síntesis de prodigiosina (Rosenberg M, et al., 1986). La hidrofobicidad de la superficie celular de *S.marcescens* quedó demostrada unos años más tarde que no era debida por completo a prodigiosina. Se identificó una proteína la cual se responsabilizó de la elevada hidrofobicidad de la superficie de algunas cepas no pigmentadas de *Serratia marcescens* (Mallick SA, 1996).

Algunas de las propiedades farmacológicas de prodigiosina, como la antibacteriana, la antifúngica y la alguicida también le puede conferir ventajas a la hora de colonizar el medio. Se ha visto que prodigiosina puede producir la muerte de otras bacterias funcionando como fotosensibilizador, permitiendo así que *S.marcescens* colonice con mayor facilidad nuevos nichos (Roth MM, 1967).

3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS: CITOTOXICIDAD Y CITOSTASIS

Los tumores están constituidos por células que, o bien no paran de dividirse porque tienen descontrolado el ciclo celular, o bien son resistentes a estímulos fisiológicos que inducen muerte, con lo cual también se acumulan células formando una masa tumoral. A la hora de combatir un cáncer mediante tratamiento sistémico se puede utilizar dos estrategias terapéuticas diferentes. Una es provocar citotoxicidad, o inducción de la muerte de las células de la masa tumoral, mientras que la otra es provocar citostasis, proceso que provoca la diferenciación celular y con ello la parada de ciclo de las células cancerosas. Ambas estrategias terapéuticas provocan efectos deseados sobre el tumor, ya sea su recesión o su estabilización evitando así su crecimiento.

3.1. Tipos de muerte celular

Se han descrito muchos procesos celulares dinámicos que llevan a la muerte de la célula, pero los cuatro más estudiados son: apoptosis, autofagia, necrosis y catástrofe mitótica. La clasificación de estos diferentes tipos de muerte celular se basa en características bioquímicas y morfológicas distintivas presentes en las células que los sufren. En la tabla 9 se encuentran detallados los cambios más relevantes y característicos de cada uno de ellos, así como métodos para su detección y discriminación (Ricci MS y Zong WX., 2006). Muchos agentes quimioterapéuticos convencionales inducen uno de estos tipos de muerte celular.

Dos de estos procesos, apoptosis y autofagia, se consideran procesos celulares “programados”, ya que están genéticamente controlados de forma muy estricta. La muerte celular programada lleva a la desintegración de los componentes celulares y a que la célula que la sufre sea engullida por células fagocitárias vecinas (Danial NN y Korsmeyer SJ, 2004). Los eventos de remodelación de tejidos durante el desarrollo normal de los organismos eucariotas pluricelulares dependen de la muerte celular programada para poder formar al organismo adulto. También opera en organismos adultos para mantener la homeostasis en el tejido celular normal. Por el contrario, la necrosis y la catástrofe mitótica son consideradas respuestas pasivas a agresiones masivas a la célula.

Cambios morfológicos	Apoptosis	Autofagia	Necrosis	Catástrofe mitótica
Membrana celular	-íntegra -invaginación	-invaginación	-pérdida integridad	
Núcleo	-fragmentación -condensación cromatina -escalera de ADN	-condensación de la cromatina parcial	-degradación ADN al azar	-mala segregación cromosómica durante la citocinesis -micronúcleos
Citoplasma	-fragmentos membranosos condensados -despolimerización citoesqueleto	-vesículas autofágicas -degradación de Golgi -polirribosomas	-hinchamiento de orgánulos	
Métodos de detección	-tinción para anexina V -ensayos de fragmentación ADN -activación de caspasas	-localización LC3	-permeabilidad a tintes vitales -expulsión contenido intracelular	-visualización células multinucleadas

Tabla 9. Características de los diferentes tipos de muerte celular (Adaptado de Ricci MS y Zong WX., 2006).

3.1.1. Apoptosis

El fenómeno de muerte celular programada o apoptosis fue descrito en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie (Kerr JF, et al., 1972), para diferenciar la muerte necrótica tras un daño inducido en el tejido de la muerte que ocurría de forma natural durante el desarrollo. También se describió que la apoptosis era la encargada de un correcto desarrollo embrionario y de mantener la homeostasis de los tejidos en organismos pluricelulares, mediando el equilibrio entre proliferación y muerte celular. Si este equilibrio se rompe se producen un conjunto de patologías que van desde infarto o enfermedades neurodegenerativas en el caso de exceso de apoptosis, hasta cáncer o enfermedades autoinmunes en el supuesto de defectos en el proceso apoptótico (Thompson CB, 1995).

Los cambios morfológicos más relevantes que sufren las células apoptóticas son la condensación del citoplasma, la invaginación de la membrana celular, la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo (Tabla 9). Las células forman pequeños cuerpos redondeados, llamados cuerpos apoptóticos, envueltos por membranas celulares los cuales llevan en su interior orgánulos intracelulares intactos o partes del núcleo. Éstos son reconocidos por células fagocíticas vecinas las cuales los eliminan sin provocar ninguna reacción inflamatoria del tejido (Figura 19) (Kroemer G, et al., 2005).

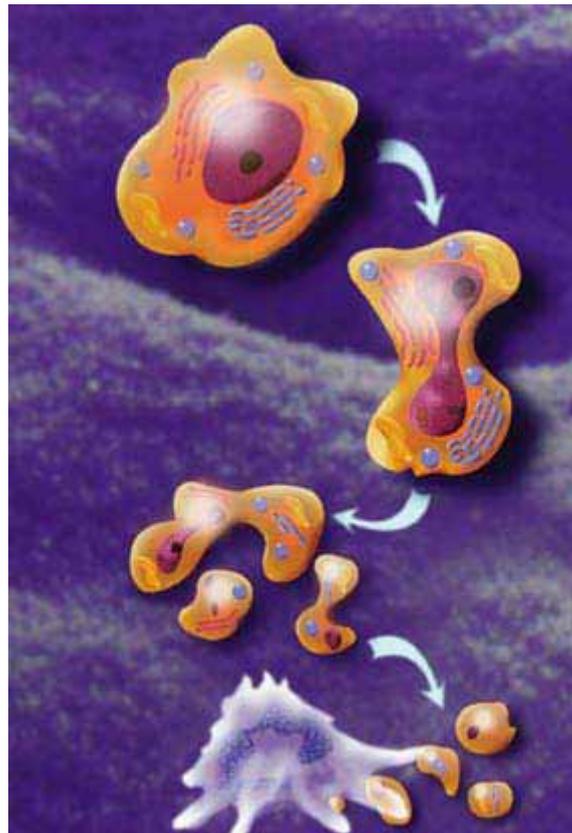


Figura 19. Cambios morfológicos durante la apoptosis. Disminuye el volumen celular, aparecen pliegues en la membrana y se condensa la cromatina (2). Fragmentación de núcleo y de la célula manteniendo la integridad de la membrana celular (3). Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células vecinas (4).

También existen cambios bioquímicos propios de la apoptosis entre los que cabe destacar la externalización de los residuos de fosfatidilserina a la cara externa para favorecer su fagocitosis, la rotura del ADN genómico por los espacios internucleosomales, generando fragmentos de 180 pares de bases o múltiplos así como la activación de unas proteasas llamadas caspasas (caspases, de cysteine aspartate-proteases; proteasas de aspartato y cisteína). La apoptosis ha sido considerada el

mecanismo principal de inducción de muerte celular por agentes quimioterapéuticos y es por ello que las rutas que regulan este proceso son objeto de muchos estudios en investigaciones preclínicas de nuevos fármacos.

El proceso de la apoptosis está altamente regulado y se puede estructurar en tres fases (Kroemer G, et al., 1997). La fase iniciadora, en la cual los factores inductores de apoptosis, ya sean fisiológicos o inducidos por estímulos externos, entran en contacto con la célula y desencadenan diversas respuestas intracelulares que transmiten la señal a la maquinaria apoptótica mediante cambios en su expresión o estado de activación. La naturaleza de la señal inductora de la apoptosis puede ser muy heterogénea, pudiendo ser desde factores externos como un ligando de un receptor de membrana, hasta factores internos que pueden afectar diferentes orgánulos celulares como retículo endoplasmático, núcleo, lisosomas o mitocondria. Posteriormente se produce la fase integradora/decisiva, momento en el que la célula decide morir y a partir del cual el proceso es irreversible. Esto sucede cuando se activan las caspasas, proteasas encargadas de llevar a cabo la muerte celular mediante la degradación de diferentes sustratos celulares. En esta fase es donde convergen las diferentes vías iniciadas por diferentes estímulos apoptóticos. Por último, la fase ejecutora/degradadora es cuando la célula pierde toda su integridad y presenta los cambios morfológicos y bioquímicos propios de la apoptosis, siendo fagocitada por macrófagos o células vecinas.

La apoptosis es un mecanismo predeterminado de forma genética que se puede llevar a cabo por varias rutas moleculares. Las más destacadas y mejor caracterizadas son las llamadas vía intrínseca y vía extrínseca, las cuales convergen en la activación de las caspasas.

3.1.1.1. Las caspasas

Las caspasas son una familia de proteínas que contienen un residuo de cisteína en el centro activo que participa en la rotura de otras proteínas que contienen motivos de ácido aspártico (Thornberry NA y Lazebnik Y, 1998). La primera que se caracterizó fue la caspasa-1, inicialmente conocida como ICE (de interleukin-1 β -converting enzyme; encima convertidor de la interleuquina 1 β), la cual no está implicada en procesos de apoptosis sino en procesos inflamatorios (Black RA, et al., 1989). Posteriormente se identificaron diversos miembros de la familia hasta llegar a un total de once caspasas descritas en humanos en la actualidad.

Entre las caspasas que inducen muerte celular (Kumar S, 2007) podemos diferenciar dos grupos: las iniciadoras, como son la caspasa-2, -8, -9 y -10, y las efectoras, donde encontramos la caspasa-3, -6 y -7. Las caspasas se expresan como precursores inactivos, llamados zimógenos, y su activación por proteólisis está muy bien regulada, sobretodo por las IAPs (de inhibitor of apoptosis protein; proteína inhibidora de la apoptosis), para evitar que la célula entre en apoptosis en un momento inadecuado. Además de las dos subunidades que se generan cuando se activa la caspasa, las caspasas iniciadoras poseen un largo prodominio en la parte amino terminal mientras que las efectoras no (Figura 20). En éste podemos encontrar dominios DED (de death effector domain; dominio efector de muerte) o CARD (de caspase recruitment domain; dominio de reclutamiento de caspasa).



Figura 20. Clasificación de las caspasas que participan en muerte celular según sus dominios (Modificado de Kumar S, 2007).

Estos largos prodominios de las caspasas iniciadoras juegan un papel muy importante en su activación, ya que les permite interactuar con proteínas adaptadoras y así ser reclutadas hacia complejos proteicos de señalización de muerte, donde se activarán gracias a su actividad autocatalítica. Existen tres modelos para explicar la activación de las caspasas iniciadoras (Bao Q y Shi Y, 2007) (Figura 21). El primero es la activación por proximidad el cual dice que las caspasas se autoprocenan cuando se encuentran una próxima a la otra (a). El segundo es el modelo de la proximidad gracias a la dimerización (b). En éste se dice que las proteínas adaptadoras aumentan la concentración local de la caspasa favoreciendo con ello su dimerización, proceso que provoca la activación de las caspasas. Por último, el modelo inducido por la conformación (c). Este modelo afirma que la interacción con el complejo proteico adaptador o la homooligomerización facilitada por la interacción con dicho complejo facilita un cambio conformacional en el sitio activo de la caspasa que es lo que produce su activación. Las caspasas efectoras, al no poseer los largos dominios amino terminales, no

poseen la propiedad de activarse por sí solas y necesitan de la rotura por parte de una caspasa iniciadora activa.

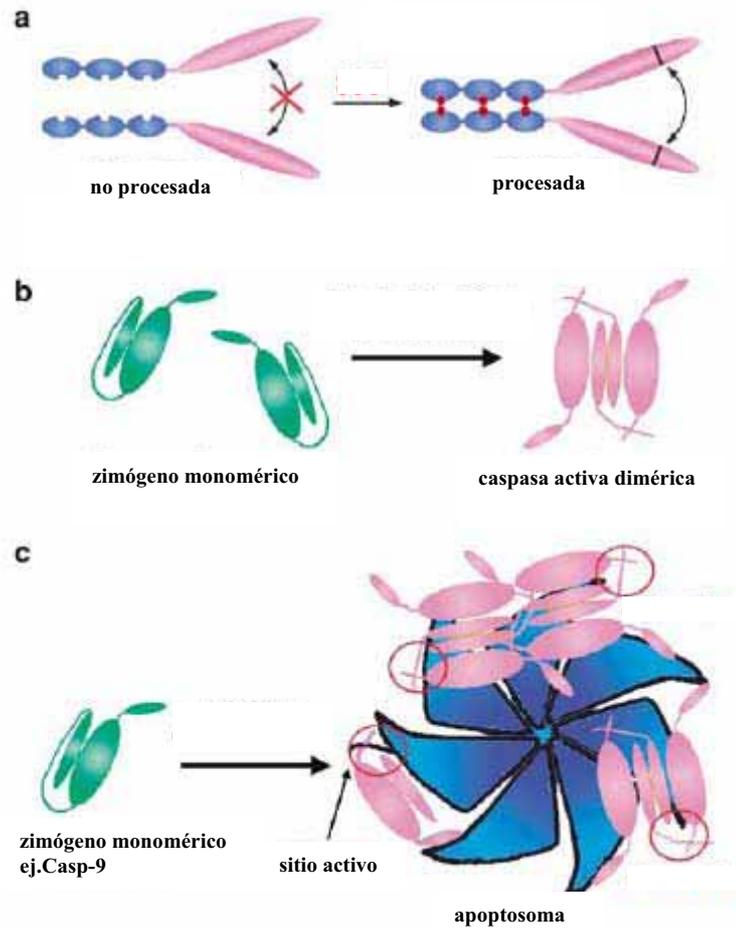


Figura 21. Modelos de activación de la caspasa iniciadora 9 (Modificado de Bao Q y Shi Y, 2007).

Las caspasas iniciadoras, tienen principalmente la capacidad de proteolizar a las caspasas efectoras, pero también tienen especificidad por algún otro sustrato, como la proteína proapoptótica Bid. Por otro lado, entre los muchos y diversos sustratos de las caspasas efectoras encontramos proteínas esenciales para la integridad de la célula, como la proteína inhibidora de la apoptosis ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase; inhibidor de la ADNasa activada por caspasa), la proteína inhibidora de ciclo celular llamada retinoblastoma (pRb, de retinoblastoma protein; proteína retinoblastoma), o la proteína encargada de la reparación del ADN PARP

(de poly(ADP-ribose) polymerase; polimerasa poli(ribosa adenosina difosfato)), entre otras (Timmer JC y Salvesen GS, 2007).

3.1.1.2. La vía intrínseca

La vía intrínseca, también conocida como vía mitocondrial, se activa en respuesta a señales de estrés intracelulares, como puede ser el daño en el ADN, acumulación de altos niveles de especies reactivas de oxígeno, así como infecciones víricas o la activación de oncogenes y también como consecuencia de señales extracelulares, como la retirada de ciertos factores del medio extracelular. Dichos estímulos convergen en la mitocondria y provocan unos eventos clave para la muerte celular. Entre ellos encontramos la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, de mitochondrial outer membrane permeabilization), la cual provoca la salida de moléculas apoptogénicas como citocromo c, los cambios en el transporte de electrones, la pérdida del potencial de membrana, la alteración de la oxidación-reducción celular y la inducción de miembros pro y antiapoptóticos de la familia de proteínas de Bcl-2 (Green DR y Reed JC, 1998).

3.1.1.2.1. Miembros de la familia Bcl-2

B-cell leukemia/lymphoma-2 (Bcl-2) es un proto-oncogén que fue detectado por primera vez en linfomas foliculares de células B y el cual estaba sobreexpresado en el 85% de los casos debido a una translocación entre los cromosomas 14 y 18 (Tsujimoto Y, et al., 1985). La sobreexpresión de Bcl-2 también puede ser debida a la falta de la proteína p53, un gen supresor de tumores que regula negativamente a Bcl-2 y que se encuentra mutado en más del 50% de los cánceres humanos. De esta manera, se bloquea el proceso apoptótico en estas células favoreciendo la carcinogénesis. Asimismo, el incremento en la expresión de Bcl-2 es capaz de inhibir la apoptosis inducida por determinados agentes quimioterapéuticos citotóxicos y radiaciones, confiriendo a los tumores resistencia a estos tratamientos anticancerosos (Reed JC, et al., 1996).

Bcl-2 da nombre a toda una familia de más de 20 proteínas que actúan regulando la permeabilidad de la membrana mitocondrial y con ello el flujo de

proteínas apoptogénicas hacia el exterior de ésta (Cory S y Adams JM, 2002). Todas poseen de uno a cuatro dominios de homología con Bcl-2 (BH, de Bcl-2 homology) que son los que les permiten interactuar entre ellos para integrar las diferentes señales celulares y así activar la apoptosis o las rutas de supervivencia. Del número y combinación de estos dominios depende que sean proteínas proapoptóticas o antiapoptóticas (Figura 22).

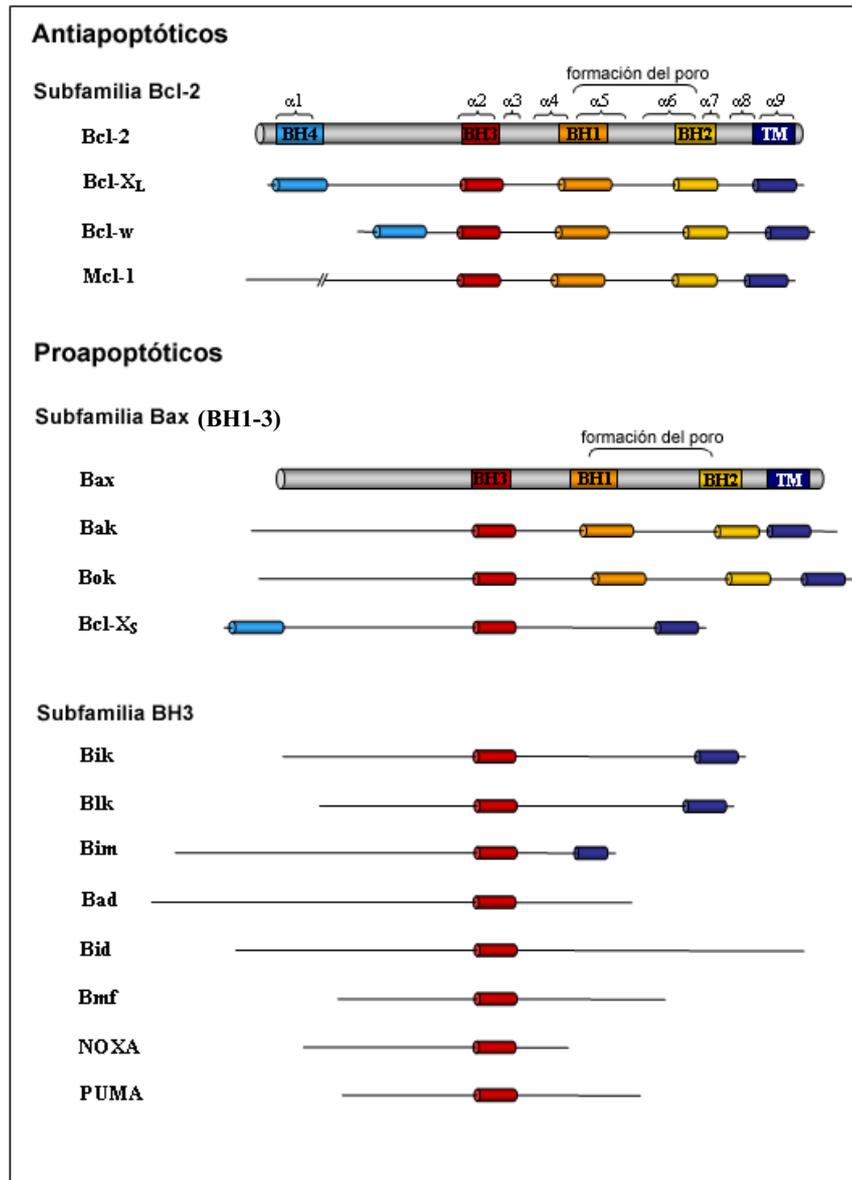


Figura 22. Miembros de la familia de Bcl-2.

Los miembros antiapoptóticos contienen los cuatro dominios BH y protegen a la célula de un amplio espectro de agresiones citotóxicas como radiaciones ultravioleta (UV), estrés térmico, ausencia de factores de crecimiento o citoquinas en el entorno celular, infecciones virales, agentes

formadores de radicales libres,... Entre ellos se encuentran Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 (de myeloid cell leukaemia-1) y Bcl-w. Los miembros proapoptóticos se caracterizan por no poseer el dominio BH4 y perturban las membranas intracelulares provocando así el proceso apoptótico. Se encuentran divididos en dos subgrupos, los multidominio BH1-3 [Bax (de Bcl-2 associated X protein), Bak (de Bcl-2 homologous antagonist killer), Bok y Bcl-X_S] y los que sólo tienen el dominio BH3 [Bik, Blk, Bim (de Bcl-2 interacting mediator of cell death), Bad (de Bcl-2-associated death promoter homologue), Bid, Bmf, NOXA y PUMA]. Muchos miembros de la familia Bcl-2 poseen un dominio transmembrana (TM, de transmembrane domain) en el extremo C-terminal el cual les permite emplazarse en las diferentes membranas celulares. En ausencia de señales de muerte, la mayoría de los miembros antiapoptóticos se suelen encontrar anclados a la membrana mitocondrial, nuclear o a la del retículo endoplasmático, mientras que muchos de los proapoptóticos se encuentran en el citosol.

Al llegar un estímulo de muerte se producen cambios en estas proteínas, alterando así la forma de interactuar entre ellas. Hay una redistribución de los miembros pro-apoptóticos, los cuales se colocan mayoritariamente en la membrana mitocondrial externa y causan su permeabilización (Figura 23) (Van Delft MF y Huang DC, 2006).

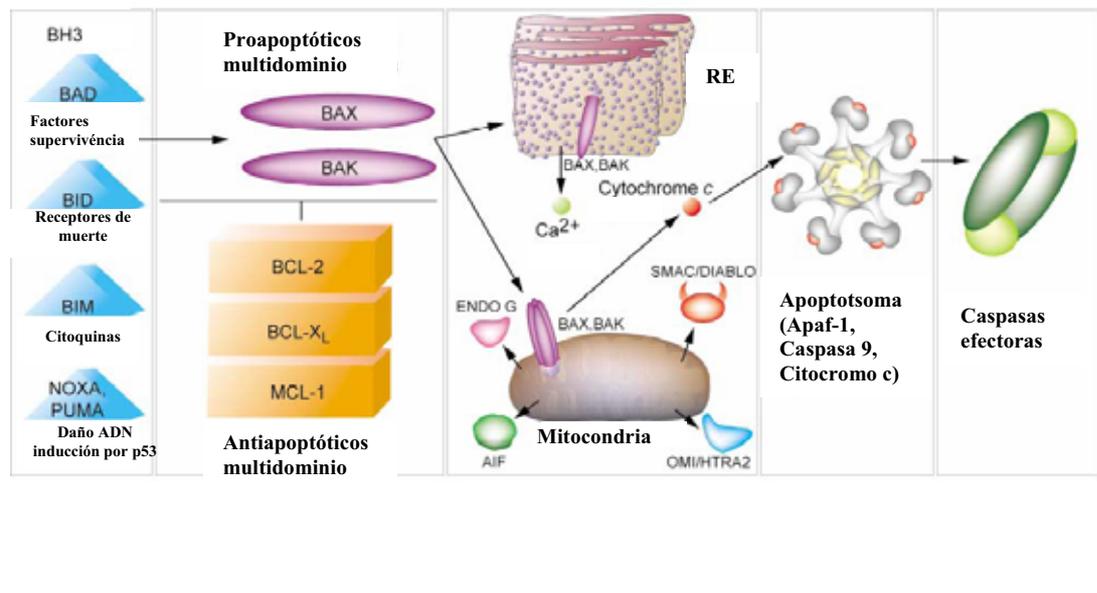


Figura 23. Vía intrínseca o mitocondrial (Modificada de Daniel y korsmeyer 2004).

Cada uno de los miembros BH3 funciona como sensor de los diferentes tipos de señales de estrés celular, las integran y son regulados, bien a nivel transcripcional (sobretudo por el gen supresor de tumores p53) o por modificaciones post-traduccionales. Una vez modificados, pueden unirse de forma específica a miembros antiapoptóticos como Bcl-2, inactivando su capacidad de proteger a la célula del proceso de muerte, lo cual consigue formando heterodímeros con miembros proapoptóticos e inactivándolos (Cory S y Adams JM, 2002). También hay proteínas BH3, como tBid (de truncated Bid, Bid truncado), que una vez activadas pueden unirse a miembros proapoptóticos multidominio, como Bax y Bak, para activarlos (Korsmeyer SJ, et al., 2000). A continuación, las proteínas proapoptóticas Bax y Bak oligomerizan en la membrana externa mitocondrial para provocar la MOMP (Degli Esposti M y Dive C, 2003), permitiendo así la salida de proteínas apoptogénicas al citoplasma las cuales desencadenarán el proceso apoptótico.

La MOMP puede ser causada directamente por la formación de canales por parte de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 o por la apertura del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC, de voltage-dependent anion channel) cuyo cierre o apertura están controlados por miembros de la misma familia (Shimizu S, et al., 1999). Indistintamente del canal utilizado, las proteínas apoptogénicas podrán salir al citoplasma y ejecutar el proceso de apoptosis.

3.1.1.2.2. Factores apoptogénicos mitocondriales

Tras una señal proapoptótica que resulte en la permeabilización de la mitocondria se crean unos poros que permiten la salida de la proteínas del espacio intermembranal al citoplasma. Los más relevantes son citocromo c, Smac/DIABLO (de second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with a low pI), Omi/HtrA2 (de Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2), AIF (de apoptosis-inducing factor; factor inductor de la apoptosis) y la endonucleasa G (Endo G, de endonuclease G) (Kroemer G, et al., 2007). Una vez liberados al citosol, cada proteína sigue un destino diferente. El citocromo c (Figura 24, 1) promueve la formación del llamado apoptosoma, una plataforma molecular para la activación, por autoproteolisis, de la caspasa-9 que también incluye la proteína adaptadora APAF-1 (de apoptosis protease activating factor

1) y ATP/dATP. A su vez, la caspasa-9 activada cataliza la activación por proteólisis de las caspasas efectoras, como la caspasa-3, -6 y -7, las cuales contribuyen en último término a que aparezcan los cambios morfológicos claves de la apoptosis, como la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. AIF y Endo-G (Figura 24, 2) se translocan del citoplasma al compartimento nuclear para favorecer la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN. Miembros de la familia de las HSP (de heat shock protein, proteína de choque térmico) antagonizan la actividad proapoptótica de AIF evitando su transporte al núcleo. Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 (Figura 24, 3) promueven la apoptosis de forma indirecta uniéndose y antagonizando miembros de la familia de las IAPs, las cuales ejercen una función antiapoptótica ya que evitan la activación de las caspasas.

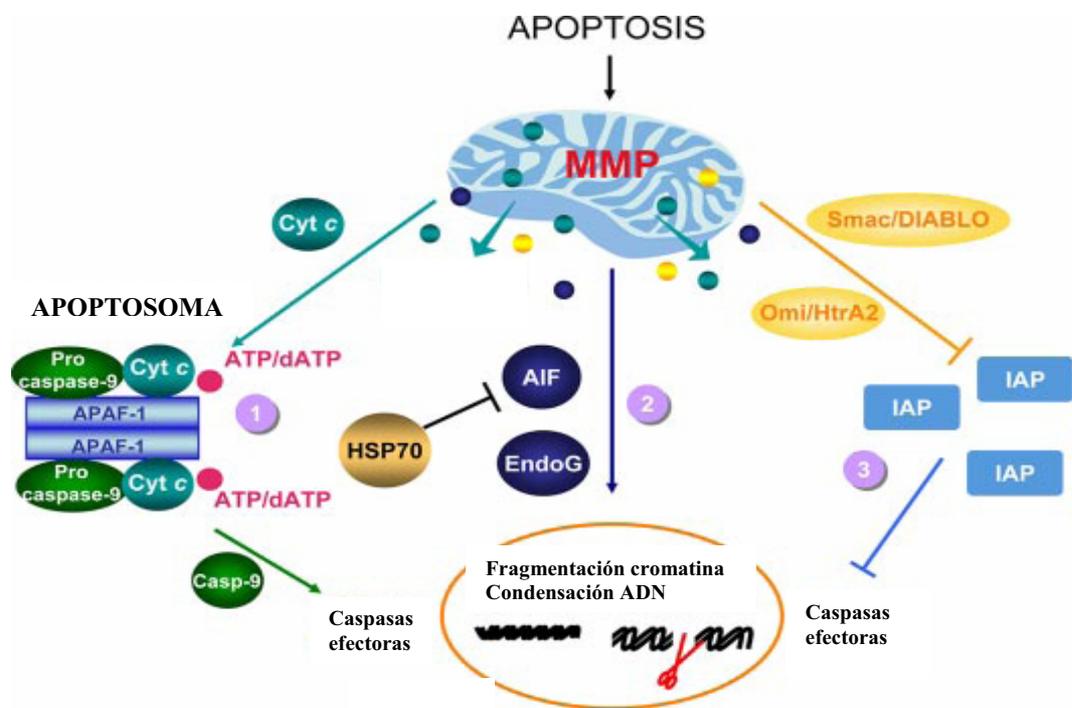


Figura 24. Proteínas del espacio intermembranal liberadas tras MOMP. (Cyt c, de cytochrome c, citocromo c; Casp-9, de caspase-9, caspasa-9) (Modificada de Kroemer G, et al., 2007).

3.1.1.3. La vía extrínseca

La vía extrínseca, también conocida por vía de receptores de muerte, es activada por la unión de un ligando a su receptor de membrana. Existen diferentes ligandos que pertenecen a la familia del TNF que al unirse a sus receptores TNFR (de tumor necrosis factor receptor, receptor del factor de necrosis tumoral) activan

la vía (Locksley RM, et al., 2001). Muchos de los miembros de la familia de TNF se unen a su receptor y activan señales celulares involucradas en respuestas proinflamatorias y no señalizan muerte celular. Los ligandos de TNF que pueden inducir apoptosis son TNF- α , FasL (también conocido por CD95L) y TRAIL (de TNF recceptor apoptosis-inducing ligand, también conocido por Apo2L). Después de la unión extracelular del ligando, el extremo citoplasmático del receptor recluta a la proteína adaptadora FADD (de Fas-asociating death domain-containing protein), la cual a su vez atrae a las caspasas iniciadoras -8 y -10. Este complejo de proteínas formado por el receptor, FADD y las caspasas recibe el nombre de DISC (de death-inducing signaling complex; complejo señalizador inductor de muerte) (Peter ME y Krammer PH, 2003). El reclutamiento de las caspasas al DISC resulta en su activación por autoproteólisis (Figura 25).

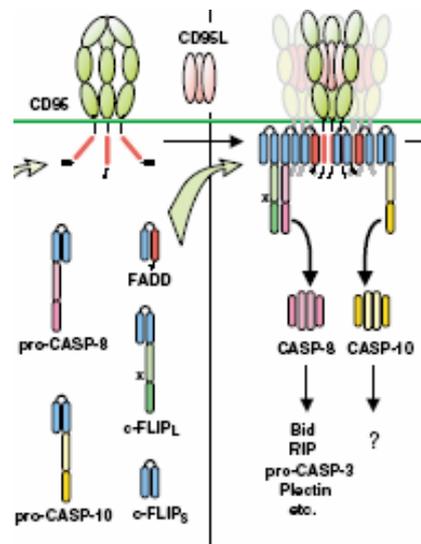


Figura 25. Activación de la vía extrínseca (Modificado de Peter ME y Krammer PH, 2003).

La actividad de la caspasa-8/10 puede ser bloqueada por una proteína con la que comparten una elevada homología, FLIP (de FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme inhibitory protein). FLIP puede oligomerizar con las caspasas pero le faltan residuos críticos del dominio catalítico de las caspasas, actuando de inhibidor de éstas. Una vez activadas las caspasas iniciadoras son capaces de activar por proteólisis a caspasas efectoras como la caspasa-3, lo cual es suficiente para provocar el proceso de apoptosis en algunos tipos celulares. En otros, es necesaria también la salida de proteínas apoptogénicas de la mitocondria que estaría provocada por la activación de las caspasas iniciadoras. La proteína de la familia de

Bcl-2 llamada Bid conecta la vía extrínseca con la intrínseca. Ésta es proteolizada por la caspasa-8 generando la forma que se conoce como tBid, la cual se transloca a la membrana mitocondrial y causa la oligomerización de Bax y Bak y con ello la MOMP (Luo X, et al., 1998).

3.2. Citostasis

La parada permanente del ciclo celular, principalmente en respuesta a daño en el ADN, es un fenómeno que se conoce con el nombre de senescencia. La senescencia celular limita la capacidad replicativa de las células, evitando así la proliferación de éstas. Por lo tanto, está considerada una estrategia en la terapia contra el cáncer, conocida como citostasis, ya que inhibiendo el crecimiento del tumor evitamos que pueda invadir otros órganos provocando metástasis y con ello la muerte del organismo (Dimri GP, 2005). Muchos supresores de tumores y oncogenes se han visto relacionados con la regulación de la senescencia, como es el caso de p53 y pRb. También hay otros mecanismos celulares que inducen parada de ciclo celular, como puede ser la activación de la vía de la citoquina TGF- β (de transforming growth factor-beta, factor de crecimiento transformante beta) (Siegel PM y Massagué J, 2003). Defectos en la señalización de mecanismos que conducen a la parada de ciclo celular contribuyen de forma muy significativa a la aparición y progresión del cáncer.

3.2.1. El gen supresor de tumores p53

La proteína p53 está considerada el “guardián del ADN” ya que supervisa su integridad y, dependiendo de la gravedad del daño en el genoma, activa diferentes programas genéticos que pueden llevar a la célula a una parada de ciclo transitoria (parada del ciclo celular en G₁ y G₂), permanente (senescencia), o bien a la eliminación de la célula (apoptosis). También puede responder a la activación de oncogenes, hipoxia, alteración de los telómeros o estrés replicativo (Kastan MB, 2007).

Entre los genes diana más relevantes de p53 (Shu KX, et al., 2007) podemos destacar algunos relacionados con:

- Apoptosis y supervivencia: Bax, DR-5 (de death receptor 5, receptor de muerte 5), TGF-alpha (de transforming growth factor alpha, factor de crecimiento transformante alfa),...
- Parada de ciclo y reparación de ADN: p21^{WAF1/CIP1}, EGFR (de epidermal growth factor receptor, receptor del factor de crecimiento epidérmico), gadd45, 14-3-3-sigma, TGF-beta, PCNA (de proliferating cell nuclear antigen), pRb, cdc25C,...
- Autorregulación: mdm-2.
- Angiogénesis e invasión: MMP-2 (de matrix metallopeptidase 2, metalopeptidasa de matriz 2),...
- Respuesta a estrés celular: PIG-3 (de p53 inducible gene 3, gen inducible por p53 3),...

Este gen supresor de tumores se encuentra mutado en más del 50% de los tumores humanos, con lo que terapias que dependan de esta proteína para activar mecanismos de parada de ciclo o muerte fracasan en numerosas ocasiones. Es por ello que es importante el descubrimiento o diseño de nuevas drogas anticancerosas que tengan mecanismos de acción independientes de p53 para así poder inducir citostasis o citotoxicidad en las células tumorales que tengan dicha proteína mutada.

3.2.2. Vía del TGF- β

La familia de citoquinas del TGF- β regula diversos procesos fisiológicos como son la proliferación y diferenciación celular, la adhesión y producción de matriz extracelular, la motilidad y la muerte por apoptosis (Massagué J, et al., 2000). Está dividida en dos subfamilias, la del TGF- β propiamente dicha y la de los BMPs (de bone morphogenetic protein, proteína morfogenética de hueso), agrupadas según la secuencia de homología y la vía de transducción de señal que activan (Miyazawa K, et al., 2002).

El miembro mejor caracterizado es el TGF- β . La ruta de los receptores del TGF- β se activa al unirse el ligando al receptor tipo II (T β RII, de TGF- β receptor type II), lo cual lleva a la formación de un complejo heterodimérico con el receptor tipo I (T β RI, de TGF- β receptor type I) en la superficie celular. Ambos receptores son serina/treonina quinasa. Éste último receptor es fosforilado por el T β RII y con ello activado. Seguidamente, una proteína regulada por receptor llamada smad-2/3 (de mothers against decapentaplegic homolog 2/3) es fosforilada por el T β RI, permitiéndole así

asociarse con smad-4 y translocarse al núcleo. Una vez dentro del núcleo, el complejo de smads activa la transcripción de sus genes diana (Shi Y y Massagué J, 2003). Otras vías de señalización independientes de smads han sido implicadas en la señalización de los receptores de TGF- β , como rutas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, de mitogen-activated protein kinases) (Figura 26) (Derynck R y Zhang YE, 2003).

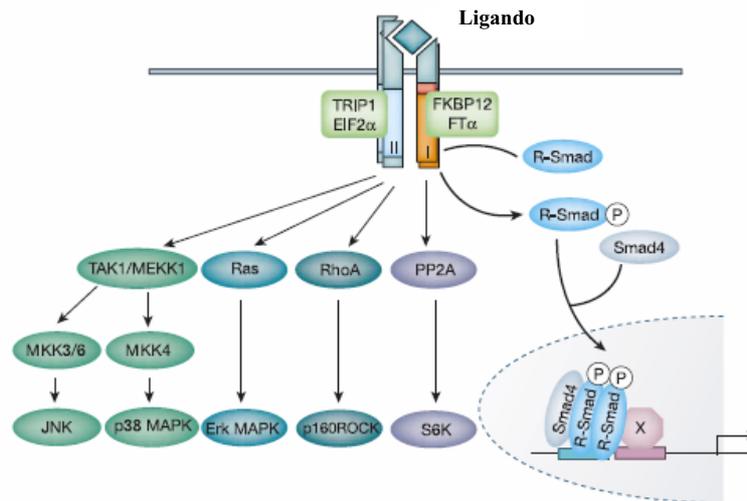


Figura 26. Rutas de señalización del TGF- β (Derynck R y Zhang YE, 2003).

La vía del TGF- β tiene un papel dual durante la carcinogénesis (Figura 27). En el epitelio normal y en estadios tempranos de tumores esta citoquina ejerce su función de limitar el crecimiento celular asegurando la correcta homeostasis del tejido (a). Cuando la progresión del tumor avanza (b), las células pierden la capacidad de responder al efecto inhibitor de la proliferación de TGF- β , ya sea por pérdida de la expresión de sus receptores o de las proteínas smads o bien por la pérdida específica de genes de respuesta citostática. Como resultado, se seleccionan células tumorales agresivas y se facilita la adquisición de nuevas mutaciones oncogénicas. Las células tumorales que han perdido la respuesta citostática pero mantienen los componentes de señalización de TGF- β pueden sufrir una transdiferenciación epitelio-mesénquima en respuesta a éste, haciéndose más invasivas (c). El TGF- β derivado del tumor crea un microambiente inmunosupresivo ya que inhibe la función de las células T, permitiendo que el tumor escape a la eliminación mediada por linfocitos T citotóxicos (d). TGF- β puede inducir una respuesta angiogénica, facilitando el reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos que sustenten el crecimiento del tumor y permitan la diseminación de éste por el resto del organismo (e). Finalmente, una vez el tumor se ha diseminado, TGF- β contribuye a la extravasación y colonización del nuevo órgano (f y g) (Siegel PM y Massagué J, 2003).

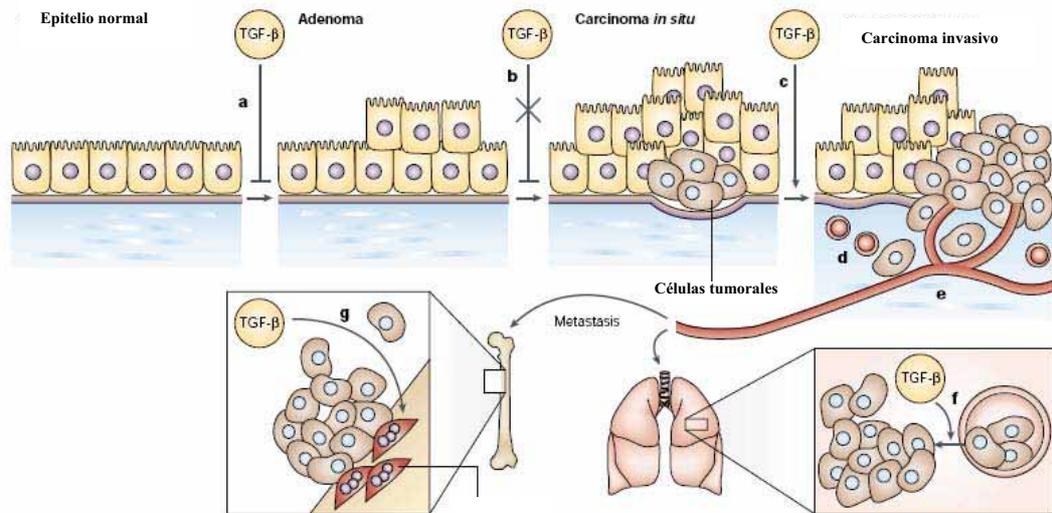


Figura 27. Puntos de acción del TGF- β durante la progresión del cáncer (Modificado de Siegel PM y Massagué J, 2003).

El efecto inhibitorio del crecimiento en células epiteliales mediado por la señalización del TGF- β es consecuencia de la activación de un programa de respuesta de genes citostáticos, que incluye la regulación negativa de factores de transcripción como c-Myc y Id y la activación de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p15^{INK4b} y p21^{WAF1/CIP1} (Massagué J y Gomis RR, 2006; Kang Y, et al., 2003). p21 principalmente inhibe los complejos ciclina/ cdk2 (de *cyclin-dependent kinase 2*, quinasa dependiente de ciclina 2) (Gartel AL, et al., 1996) regulando así negativamente la progresión del ciclo celular tras diversos estímulos, como la exposición a agentes que dañan el ADN (El-Deiry WS, et al., 1994). Además de p53, una gran variedad de factores pueden activar la transcripción de p21, incluyendo Sp1/Sp3, smads, Ap2, STAT (de *signal transducer and activator of transcription*, transductor de señal y activador de la transcripción), BRCA1, E2F-1/E2F-3 y CAAT/enhancer binding protein α y β (Gartel AL y Tyner AL, 1999).

Uno de los miembros de la familia del TGF- β más recientemente descrito es NAG-1/GDF15 (de *nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene 1/growth differentiation factor 15*). Es una proteína secretada que activa la ruta de los receptores del TGF- β induciendo parada de ciclo (Tan M, et al., 2000) o apoptosis en muchos tipos celulares diferentes (Liu T, et al., 2003; Li PX, et al., 2000). Además, muchos tratamientos con compuestos antitumorogénicos como genisteína (Wilson LC, et al., 2003), resveratrol (Baek SJ, et al., 2002) y vitamina D (Lambert JR, et al., 2006) entre

otros, han demostrado regular positivamente la expresión de dicho gen, sugiriendo algún papel en la muerte celular inducida.