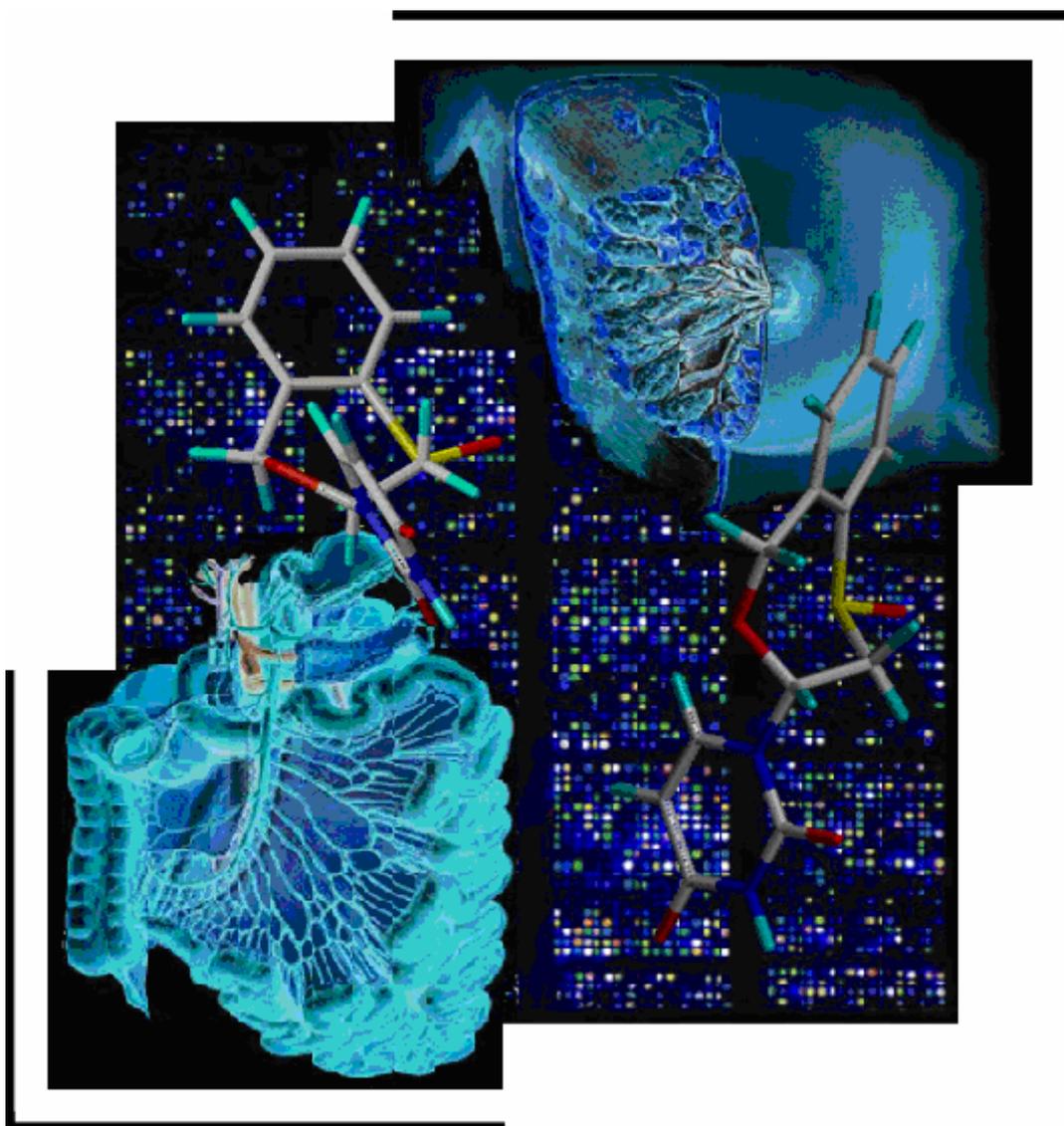


TESIS DOCTORAL

*POTENCIAL TERAPÉUTICO DE NUEVOS FÁRMACOS
ANTITUMORALES. ESTUDIO SOBRE LÍNEAS EPITELIALES.*



Octavio Caba Pérez
Granada, 2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Octavio Caba Pérez
D.L.: Gr. 2386 - 2006
ISBN: 84-338-4171-8

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA

HUMANA



TESIS DOCTORAL

***“Potencial terapéutico de nuevos fármacos antitumorales.
Estudio sobre líneas epiteliales”***

Memoria presentada por D. Octavio Caba Pérez para optar
al grado de Doctor Europeo en Biología.

Granada, 31 de Octubre de 2006

El trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis, ha sido realizado por el licenciado D. OCTAVIO CABA PÉREZ, durante los años 2002-2006 bajo la dirección de:

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES

D. FERNANDO RODRÍGUEZ SERRANO

Parte de este trabajo a sido subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria) a través del proyecto nº. 030225.

Resultados de esta Tesis han sido publicados parcialmente en Tetrahedron 2006, 62: 000.

Dña. ANTONIA ARÁNEGA JIMÉNEZ CATEDRÁTICA DEL
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D. Octavio Caba Pérez ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Potencial terapéutico de nuevos fármacos antitumorales. Estudio sobre líneas epiteliales”** durante los años 2002-2006 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 30 de Octubre de 2006.

Fdo. Antonia Aránega Jiménez

D. JUAN ANTONIO MARCHAL CORRALES, PREOFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

HACE CONSTAR:

Que D. Octavio Caba Pérez ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Potencial terapéutico de nuevos fármacos antitumorales. Estudio sobre líneas epiteliales”** durante los años 2002-2006 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 30 de Octubre de 2006.

Fdo. Juan Antonio Marchal Corrales

D. FERNANDO RODRÍGUEZ SERRANO, PROFESOR AYUDANTE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE JAÉN.

HACE CONSTAR:

Que D. Octavio Caba Pérez ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Potencial terapéutico de nuevos fármacos antitumorales. Estudio sobre líneas epiteliales”** durante los años 2002-2006 y corresponde fielmente a los resultados obtenidos.

Una vez redactada la presente memoria, ha sido revisada por mí y la encuentro conforme para ser presentada y aspirar al grado de Doctor Europeo ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente en Granada a 30 de Octubre de 2006.

Fdo. Fernando Rodríguez Serrano

A mis padres y hermano, por estar siempre dispuestos a ayudarme y porque espero que esta Tesis compense, en pequeña medida, los malos ratos que han pasado por mí.

A todos mis familiares, en especial a mi abuelo por todo lo que me ha enseñado.

A todos mis amigos, mi “gran familia” en Granada.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, Profesora Dña. Antonia Aránega Jiménez, Profesor D. Juan Antonio Marchal Corrales y Profesor D. Fernando Rodríguez Serrano, por poner a mi disposición todos sus conocimientos y su inmensa ayuda y disponibilidad a la hora de realizar esta Tesis Doctoral.

Un agradecimiento muy especial a D. Luis Álvarez Guisado, que siempre hacía que el ambiente laboral fuera mucho más humano, y cuyas anécdotas y amabilidad eran indispensables en la rutina del trabajo diario.

Un agradecimiento, muy sincero, a José Carlos Prados que siempre me ha dado buenos consejos, y cuyas palabras de ánimo siempre me ayudaron en los momentos más difíciles.

Quisiera agradecer también, de todo corazón, a mis compañeros Houria Boulaiz, Esmeralda Carrillo, Antonio Martínez, Macarena Perán, Fidel Hita, Raúl Ortiz, Celia Vélez, Consolación Melguizo, Ana Rama, Inés Suárez y Juan Emilio Fernández su amistad, y compartir con agrado cada día de trabajo.

No puedo olvidarme de todos los miembros del grupo del profesor Antonio Espinosa, y especialmente del profesor Joaquín Campos, que sintetizaron y proporcionaron los fármacos usados en esta Tesis y mostraron un gran interés en su consecución.

Quisiera agradecer a Jaime Lazuén y Nieves Rodríguez su ayuda en la realización de múltiples ensayos y su gran disposición a colaborar desinteresadamente.

Agradecer a José Ruiz por sus tertulias vespertinas tan entretenidas y compartir conmigo semanalmente nuevas ilusiones, a Inmaculada Moreno por su vitalidad y alegría diarias y por todos sus consejos no científicos, a Luis Roldán y Josefa Castro por esos avisos tan importantes y por su cordialidad siempre mostrada, a Sandra Fernández por su compañía y simpatía aún a altas horas de la madrugada, y a todos los demás miembros del departamento de Anatomía y Embriología humana de la Universidad de Granada.

También agradecer a todo el personal del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada y el del Banco de Líneas Celulares del hospital universitario San Cecilio su colaboración y siempre buena disposición.

Me gustaría agradecer al grupo empresarial Vilpomas s.l. y a la Universidad de Granada, por haberme asignado una beca con la que he podido realizar la mayor parte del trabajo que constituye esta Tesis Doctoral.

Agradecer, por último, a todas las personas que no siendo mencionadas aportaron algo a la realización de esta Tesis Doctoral.

“...en todo este tiempo aprendí que, antes de pensar en dos mil fracasos, he descubierto más de dos mil maneras de no hacer este filamento y eso me da la pauta de que estoy encaminado.”

Thomas Alva Edison

ÍNDICE

| | |
|---|----------|
| INTRODUCCIÓN... | 1 |
| 1. MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN MALIGNA..... | 3 |
| 1.1. DEFINICIÓN..... | 3 |
| 1.2. PROTO-ONCOGENES | 5 |
| 1.3. GENES SUPRESORES DE TUMORES | 9 |
| 1.4. GENES REPARADORES DEL ADN..... | 11 |
| 1.5. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER..... | 11 |
| 2. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DEL TEJIDO MAMARIO..... | 12 |
| 2.1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA MAMA..... | 12 |
| 2.2. DESARROLLO Y MODIFICACIONES DE LA MAMA..... | 15 |
| 3. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DEL EPITELIO INTESTINAL..... | 17 |
| 3.1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO | 17 |
| 3.2. RENOVACIÓN CELULAR DEL EPITELIO INTESTINAL..... | 20 |
| 3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN ENTEROCÍTICA..... | 24 |
| 4. CÁNCER DE MAMA | 26 |
| 4.1. DEFINICIÓN | 26 |
| 4.2. DIAGNÓSTICO..... | 27 |
| 4.3. PRONÓSTICO..... | 30 |
| 4.4. TRATAMIENTO..... | 33 |
| 5. CÁNCER DE COLON..... | 34 |
| 5.1. DEFINICIÓN..... | 34 |
| 5.2. POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR..... | 35 |
| 5.3. SÍNDROME HEREDITARIO NO POLIPÓSICO | 36 |
| 5.4. SÍNDROME POLIPÓSICO JUVENIL | 37 |
| 5.5. SÍNDROME DE PEUTZ-JEGHERS | 37 |
| 5.6. EVENTOS GENÉTICOS ADICIONALES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON..... | 38 |
| 6. LÍNEAS CELULARES COMO MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA EXPERIMENTACIÓN EN CÁNCER DE MAMA Y COLON..... | 39 |
| 7. CICLO CELULAR..... | 42 |
| 7.1. CONCEPTO..... | 42 |
| 7.2. FASES DEL CICLO CELULAR | 42 |
| 7.3. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR | 44 |
| 8. APOPTOSIS | 48 |
| 8.1. CONCEPTO..... | 48 |

| | | |
|---------|---|-----------|
| 8.2. | MECANISMOS MOLECULARES DE LA APOPTOSIS | 49 |
| 8.3. | APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES | 50 |
| 9. | ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE TECNOLOGÍA DE MICROARRAYS EN CÁNCER | 52 |
| 9.1. | CONCEPTO DE MICROARRAY | 52 |
| 9.2. | UTILIDADES DE LOS MICROARRAYS | 55 |
| 9.2.1. | Estudio de patrones de expresión génica como pronóstico de respuesta a un tratamiento en cáncer | 56 |
| 9.2.2. | Uso de microarrays par la elaboración de una taxonomía molecular del cáncer | 57 |
| 9.3. | PERSPECTIVAS | 58 |
| 10. | NUEVOS FÁRMACOS SELECTIVOS FRENTE A DIANAS MOLECULARES DE CICLO CELULAR Y APOPTOSIS | 59 |
| 10.1. | FÁRMACOS INDUCTORES DE APOPTOSIS | 59 |
| 10.2. | FÁRMACOS MODULADORES DEL CICLO CELULAR | 60 |
| 10.2.1. | Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas | 60 |
| 10.2.2. | Inhibidores de la proteína quinasa C | 61 |
| 10.2.3. | Inhibidores de las proteínas tirosina quinasas | 62 |
| 10.2.4. | Inhibidores del proteosoma | 62 |
| 10.2.5. | Inhibidores de la actividad histona desacetilasa | 62 |
| 10.2.6. | Moléculas que actúan sobre el citoesqueleto | 63 |
| | OBJETIVOS | 65 |
| | MATERIAL Y MÉTODOS | 69 |
| 1. | CULTIVOS CELULARES | 71 |
| 1.1. | LÍNEAS CELULARES | 71 |
| 1.2. | CONDICIONES DE CULTIVO | 71 |
| 1.3. | CONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES | 73 |
| 1.4. | DESCONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES | 74 |
| 2. | FÁRMACOS | 76 |
| 2.1. | FAMILIA 1: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZODIOXEPÍNICA | 76 |
| 2.2. | FAMILIA 2: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 4,1-BENZOXATIEPÍNICA | 80 |
| 2.3. | FAMILIA 3: O,O-ACETALES Y O,N-CETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZOXAZEPÍNICA | 82 |
| 2.4. | FAMILIA 4: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL SALICÍLICO | 88 |
| 2.5. | FAMILIA 5: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL TIOSALICÍLICO | 90 |

| | | |
|------|---|------------|
| 2.6. | FAMILIA 6: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL ANTRANÍLICO | 92 |
| 2.7. | FAMILIA 7: O,N-ACETAL ACÍCLICO CON EL GRUPO AMIDA | 94 |
| 2.8. | FAMILIA 8: OTROS COMPUESTOS..... | 94 |
| 3. | CURVAS DE ABSORBANCIA..... | 95 |
| 4. | INDUCCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES CON FÁRMACOS..... | 96 |
| 5. | CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (C _{I50})..... | 97 |
| 6. | ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR..... | 97 |
| 7. | ENSAYO DE VIABILIDAD, NECROSIS Y APOPTOSIS | 98 |
| 7.1. | ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO | 98 |
| 7.2. | ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL | 99 |
| 8. | ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS LÍNEAS CELULARES POR MICROSCOPIA ÓPTICA..... | 99 |
| 9. | ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARRAYS..... | 100 |
| 9.1. | EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL | 100 |
| 9.2. | CUANTIFICACIÓN DEL ARN..... | 101 |
| 9.3. | DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN | 101 |
| 9.4. | ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS..... | 102 |
| 10. | ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DATOS..... | 103 |
| | RESULTADOS..... | 105 |
| 1. | CURVAS DE ABSORBANCIA..... | 107 |
| 2. | CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (C _{I50}) EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7..... | 112 |
| 2.1. | FAMILIA 1: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZODIOXEPÍNICA | 113 |
| 2.2. | FAMILIA 2: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 4,1-BENZOXATIEPÍNICA | 116 |
| 2.3. | FAMILIA 3: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZOXAZEPÍNICA | 118 |
| 2.4. | FAMILIA 4: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL SALICÍLICO..... | 124 |
| 2.5. | FAMILIA 5: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL TIOSALICÍLICO..... | 126 |
| 2.6. | FAMILIA 6: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL ANTRANÍLICO | 128 |
| 2.7. | FAMILIA 7: O,N-ACETAL ACÍCLICO CON EL GRUPO AMIDA..... | 130 |
| 2.8. | FAMILIA 8: OTROS COMPUESTOS..... | 130 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 3. | CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI_{50}) Y DEL ÍNDICE TERAPÉUTICO (IT) <i>IN VITRO</i> DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS SOBRE LAS CUATRO LÍNEAS CELULARES..... | 131 |
| 3.1. | CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI_{50}) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 1..... | 131 |
| 3.2. | CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI_{50}) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 2..... | 132 |
| 3.3. | CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI_{50}) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 3..... | 132 |
| 3.4. | CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI_{50}) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 6..... | 134 |
| 3.5. | CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (IC_{50}) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS SOBRE LAS CUATRO LÍNEAS CELULARES | 134 |
| 3.6. | ÍNDICES TERAPÉUTICOS (IT) <i>IN VITRO</i> DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 1 | 137 |
| 3.7. | ÍNDICES TERAPÉUTICOS (IT) <i>IN VITRO</i> DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 2 | 139 |
| 3.8. | ÍNDICES TERAPÉUTICOS (IT) <i>IN VITRO</i> DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 3 | 140 |
| 3.9. | ÍNDICES TERAPÉUTICOS (IT) <i>IN VITRO</i> DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 6 | 141 |
| 4. | ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR..... | 142 |
| 4.1. | LÍNEA CELULAR MCF-7..... | 142 |
| 4.2. | LÍNEA CELULAR MCF-10A | 145 |
| 4.3. | LÍNEA CELULAR HT-29..... | 148 |
| 4.4. | LÍNEA CELULAR IEC-6..... | 150 |
| 4.5. | COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR ENTRE LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES..... | 152 |
| 5. | ENSAYO DE VIABILIDAD, NECROSIS Y APOPTOSIS..... | 159 |
| 5.1. | ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO | 159 |
| 5.1.1. | Línea celular MCF-7 | 159 |
| 5.1.2. | Línea celular MCF-10A..... | 162 |
| 5.1.3. | Línea celular HT-29 | 167 |
| 5.1.4. | Línea celular IEC-6..... | 171 |
| 5.1.5. | Comparación de los efectos de los fármacos sobre la viabilidad, apoptosis y necrosis entre las diferentes líneas celulares..... | 175 |
| 5.2. | ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL | 178 |
| 6. | ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS LÍNEAS CELULARES POR MICROSCOPIA ÓPTICA | 180 |
| 7. | ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARRAYS..... | 186 |
| 7.1. | LÍNEA CELULAR MCF-7..... | 189 |

| | |
|----------------------------------|------------|
| 7.2. LÍNEA CELULAR MCF-10A | 193 |
| 7.3. LÍNEA CELULAR HT-29..... | 199 |
| 7.4. LÍNEA CELULAR IEC-6..... | 201 |
| DISCUSIÓN. | 205 |
| CONCLUSIONES | 229 |
| ANEXO..... | 235 |
| 1. LÍNEA CELULAR MCF-7 | 237 |
| 1.1. FÁRMACO KS-47A | 237 |
| 1.2. FÁRMACO KS-47B | 239 |
| 1.3. FÁRMACO MDG-828B | 241 |
| 1.4. FÁRMACO MDG-884D..... | 243 |
| 1.5. FÁRMACO MDG-898D..... | 245 |
| 2. LÍNEA CELULAR MCF-10A..... | 247 |
| 2.1. FÁRMACO KS-47A | 247 |
| 2.2. FÁRMACO KS-47B | 249 |
| 2.3. FÁRMACO MDG-828B | 251 |
| 2.4. FÁRMACO MDG-884D..... | 253 |
| 2.5. FÁRMACO MDG-898D..... | 255 |
| 3. LÍNEA CELULAR HT-29 | 257 |
| 3.1. FÁRMACO KS-47A | 257 |
| 3.2. FÁRMACO KS-47B | 259 |
| 3.3. FÁRMACO MDG-828B | 261 |
| 3.4. FÁRMACO MDG-884D..... | 263 |
| 3.5. FÁRMACO MDG-898D..... | 265 |
| 4. LÍNEA CELULAR IEC-6..... | 267 |
| 4.1. FÁRMACO KS-47A | 267 |
| 4.2. FÁRMACO KS-47B | 269 |
| 4.3. FÁRMACO MDG-828B | 271 |
| 4.4. FÁRMACO MDG-884D..... | 273 |
| 4.5. FÁRMACO MDG-898D..... | 275 |
| BIBLIOGRAFÍA | 277 |

INTRODUCCIÓN

1. MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN MALIGNA

1.1. DEFINICIÓN

El término cáncer engloba un conjunto de enfermedades que se caracterizan por:

- Anaplasia: modificación de los caracteres celulares hacia un fenotipo y genotipo típico de células poco diferenciadas.

- Autonomía: el crecimiento de las células cancerígenas no es regulado de forma adecuada por las influencias bioquímicas y físicas del ambiente.

- Clonalidad: el cáncer se origina a partir de una única célula progenitora, que prolifera y da lugar a un clon de células malignas.

- Metástasis: las células cancerosas tienen la capacidad de crecer y diseminarse a otras partes del cuerpo.

El proceso mediante el cual una célula normal se convierte en una célula maligna, que presenta estas características, se denomina transformación maligna (Isselbacher *et al.*, 1994).

Las células tumorales se caracterizan por la pérdida de funcionalidad de algunos de los puntos de restricción que se encuentran a lo largo del ciclo celular. Éstos se encargan de detener el ciclo cuando se detecta alguna anomalía, intentar la reparación de la misma, y finalmente, en el caso de no poder resolverla, desencadenan la muerte celular. Esta pérdida permite la acumulación de errores en el ácido desoxirribonucleico (ADN), dando lugar a una alta inestabilidad genética (Malumbres y Barbacid, 2001). Existen dos tipos de alteraciones: cambios genéticos (translocaciones cromosómicas, deleciones, inserciones, amplificaciones o mutaciones puntuales) o cambios epigenéticos (que afectan al modo en que se expresan los genes).

Las mutaciones que dan lugar al desarrollo neoplásico pueden afectar a tres tipos de genes:

- Proto-oncogenes, fueron los primeros en asociarse al cáncer. Codifican para proteínas involucradas en crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Su expresión descontrolada o la de sus formas mutadas (oncogenes) dan origen a la transformación maligna. Las mutaciones que activan a los oncogenes pueden ser puntuales, amplificaciones génicas o translocaciones cromosómicas, siendo suficiente la mutación en uno de los alelos para alterar la función de la proteína que codifican.

- Genes supresores de tumores, su actividad consiste en regular negativamente la proliferación celular. Su pérdida de actividad desencadena carcinogénesis, y, salvo en raras ocasiones (como ocurre con *p53*), para ello es necesaria la inactivación de los dos alelos del gen.

- Genes reparadores del ADN, se encargan de corregir los posibles errores producidos en la replicación y de reparar las alteraciones producidas por cualquier agente mutagénico. Si alguno de estos genes no funciona, aparecen múltiples mutaciones en el genoma que acaban afectando a los dos tipos anteriores, desencadenando procesos tumorales (Wood *et al.*, 2001).

Los procesos de transformación maligna conllevan, a su vez, una pérdida del reconocimiento de las células tumorales como anómalas, con lo que no desencadenan una adecuada respuesta inmunitaria. Se sabe que las proteínas anómalas o las que se encuentran anormalmente incrementadas, y que desencadenan el proceso canceroso, pueden ser incorporadas y presentadas por los complejos de histocompatibilidad tipo 1 (MHC-1), actuar como neoantígenos y desencadenar una respuesta inmunológica. Estos antígenos activarían a los linfocitos T cooperadores o CD4⁺, provocando la liberación de citoquinas que estimulan el crecimiento y maduración de los linfocitos T citotóxicos o CD8⁺. Estos linfocitos citotóxicos se unen a través de su receptor específico T-cell receptor (TCR) a los antígenos presentados por los MHC-1 en la superficie de las células neoplásicas. Además, estos linfocitos

CD8⁺ precisan una co-estimulación que se da cuando la célula tumoral expresa a nivel de membrana una proteína denominada B7 capaz de interactuar a nivel de la membrana linfocitaria con el CD28, desencadenando, por lo tanto, la respuesta citotóxica (Germain y Margulies, 1993).

Sin embargo, se ha evidenciado una disminución o ausencia de la expresión de los MHC-1 y/o de la proteína B7 en las células tumorales (MacCarthy *et al.*, 2000). De esta manera, se impide que estas células presenten antígenos que pudieran desarrollar una respuesta inmunitaria e impidiendo completar una reacción citotóxica al faltar la co-estimulación de la proteína CD28.

1.2. PROTO-ONCOGENES

Los proto-oncogenes nucleares juegan un papel central en los acontecimientos implicados en la proliferación celular, de hecho sus formas celulares normales se expresan durante este proceso, y tanto su ácido ribonucleico mensajero (ARNm) como sus proteínas tienen una vida media muy corta. Por lo tanto, los cambios en la transcripción de estos genes dan lugar a rápidas fluctuaciones en los niveles de ARNm y proteína.

Los proto-oncogenes pueden actuar por dos mecanismos distintos. El primero, implica la fosforilación de proteínas en residuos de serina, treonina o tirosina a través de las denominadas quinasas, que transfieren grupos fosfato desde la molécula donadora adenosina trifosfato (ATP). Este proceso tiene doble efecto sobre la proteína fosforilada: en primer lugar, cambia su conformación y, como consecuencia, provoca un incremento en la actividad enzimática de la proteína fosforilada; en segundo lugar, la fosforilación de los residuos de tirosina genera sitios de reconocimiento para proteínas señalizadoras. Todo esto desencadena la amplificación de la señal mitogénica.

El segundo mecanismo por el que actúan los proto-oncogenes implica la actividad enzimática GTPasa. Las denominadas proteínas G actúan como interruptores moleculares. Su estado activo se induce por su unión a guanosina

trifosfato (GTP), provocando en ellas un cambio conformacional que desencadena en una señal, tras interactuar con proteínas efectoras. Su vuelta al estado inactivo se produce por la hidrólisis del GTP a guanosina difosfato (GDP), catalizada por su actividad GTPasa intrínseca. Por otro lado, existen reguladores positivos, que promueven la transición de la proteína G a su estado activo a través de una actividad intercambiadora de nucleótidos, y reguladores negativos o efectores, que estimulan la actividad GTPasa intrínseca (Friedman y Devary, 2005).

Los primeros oncogenes con actividad GTPasa descubiertos fueron los de la familia *ras* que codifican una forma de GTPasas monoméricas pequeñas (Shih *et al.*, 1979). Éstas pertenecen a la conocida como superfamilia de proteínas Ras, cuyos miembros regulan numerosos procesos celulares, identificándose tres formas diferentes, denominadas *H-ras*, *K-ras* y *N-ras*. La activación de uno de los tres genes *ras* es la mutación dominante más común encontrada en cánceres humanos (Chung *et al.*, 1993).

La activación de Ras, en respuesta a la estimulación de los receptores de diversos factores de crecimiento, está mediada por la unión de la proteína adaptadora Grb2 a través de su dominio SH2. Por otro lado, Grb2 interactúa a través de sus dominios SH3 con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (Guanine nucleotide Exchange Factor, GEF) Sos, que puede estimular el intercambio de GDP por GTP en Ras, lo que lleva a Ras desde su forma inactiva a su forma activa. Por el contrario, la inactivación de Ras está mediada en parte por su actividad GTPasa intrínseca, que normalmente es baja, pero que puede ser estimulada por la proteína activadora de GTPasa (GTPase Activating Protein, GAP), a través de su dominio SH2, que convierte la forma activa de Ras unida a GTP en la forma inactiva unida a GDP (Barbacid, 1987).

Un efector de Ras es la serina treonina quinasa Raf, cuya activación fosforila y activa la tirosina treonina quinasa (MEK), que a su vez fosforila a la proteína serina treonina quinasa (ERK), que fosforila entonces varias proteínas. Esta cascada de señalización se conoce como la ruta de las proteína quinasas activadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein kinases, MAP) (Johnson y

Lapadat, 2002). La respuesta celular provocada por esta ruta de señalización incluye el incremento en la transcripción de genes tempranos, como *fos*, que a su vez regulan la expresión de genes cuyos productos controlan la progresión en el ciclo celular, lo que finalmente da lugar a la síntesis de ADN y a la división celular (Wang y Prywes, 2000) (Figura 1).

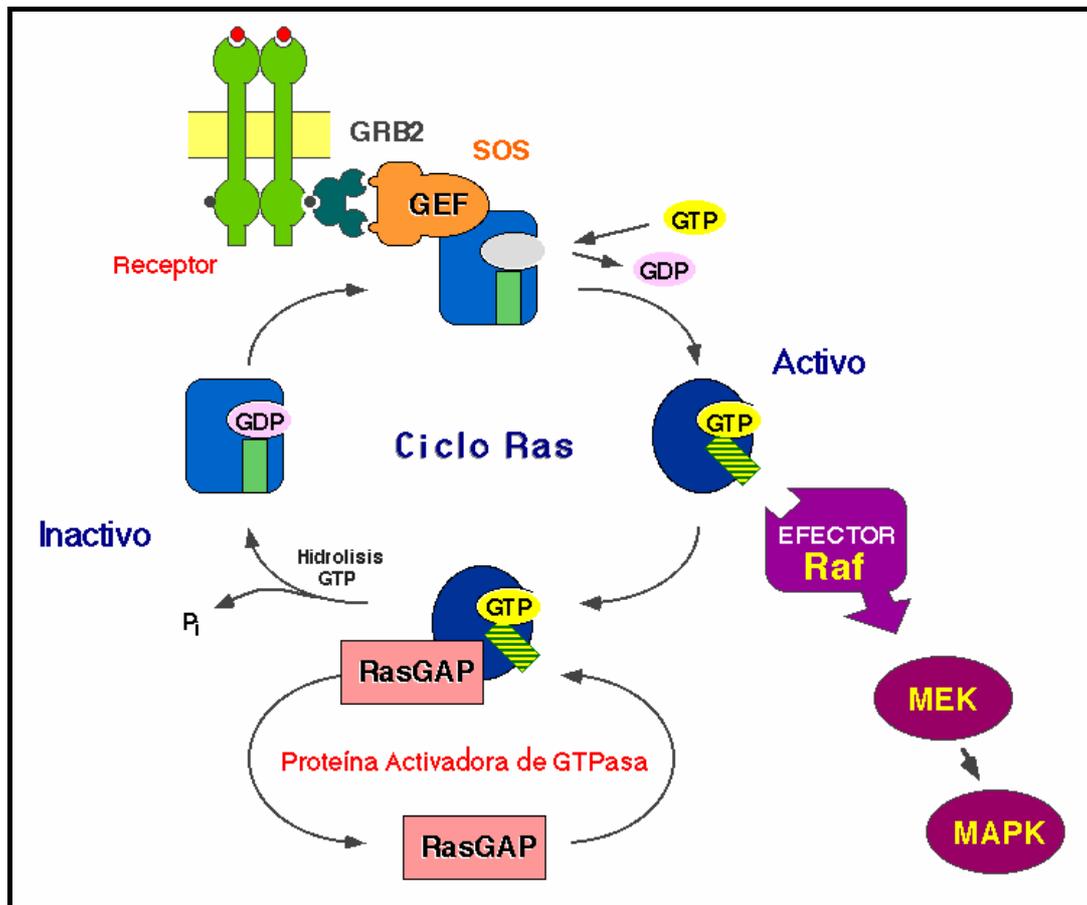


FIGURA 1. CICLO RAS

(Modificado de Aasland, 1999)

La transformación celular inducida por formas oncogénicas de Ras también requiere la actividad de los miembros de la superfamilia de proteínas Ras, Rho y Rac. Estas proteínas están implicadas en el reordenamiento del citoesqueleto de actina y regulan los cambios morfológicos asociados con la transformación celular inducida por el oncogén *ras* (Krengel *et al.*, 1990).

Los genes *jun* y *fos* codifican proteínas que son factores de transcripción y dimerizan para formar el complejo de transcripción denominado Activating Protein-1 (AP-1). Éste regula la expresión de genes inducidos por factores de

crecimiento y promotores tumorales, para ello se une a la secuencia “TGACTCA” del ADN desde donde regula la transcripción de los genes adyacentes. Se conocen numerosos genes regulados por AP-1 fundamentales para la proliferación y la diferenciación celular, entre ellos los propios genes *jun* y *fos* (Angel y Karin, 1991).

Su actividad biológica está regulada por fosforilación, y las alteraciones que presentan las formas oncogénicas de estas proteínas impiden su regulación, dando como resultado una actividad transcripcional permanente. En el caso de Jun, la fosforilación de dos serinas situadas en la región aminoterminal induce un incremento de su actividad transcripcional. Esta fosforilación está mediada por la serina/treonina quinasa Jun N-terminal Kinase (JNK), que interacciona con Jun en respuesta a distintos estímulos, como factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias y señales de estrés. La proteína Fos también es activada por fosforilación por otras quinazas activadas por factores de crecimiento, como las ERKs.

Otro tipo de proto-oncogen es el *c-myc* que pertenece a una familia de proto-oncogenes con actividad transcripcional compuesta por tres miembros: *c-myc*, *N-myc* y *L-myc*. Su producto génico es un componente esencial de los mecanismos de señalización que median la transformación por distintas oncoproteínas, como Bcr-abl, el receptor de CSF-1 y Ras (Zeller *et al.*, 2003). El nivel de expresión de *c-myc* se encuentra cuidadosamente regulado, y refleja el estado proliferativo de la célula. Se induce rápidamente a nivel transcripcional tras la estimulación con factores de crecimiento y es casi inexistente en células quiescentes. La inapropiada regulación de dicha expresión contribuye a la tumorigénesis más que las mutaciones sobre su secuencia.

La activación del proto-oncogén *c-myc* en las células da lugar a su reentrada en el ciclo celular en ausencia de factores de crecimiento, y su expresión en células sometidas a bajos niveles de nutrientes puede inducir apoptosis. El producto del gen se localiza en el núcleo celular e interacciona con diversas proteínas. C-myc posee varios dominios: uno compuesto por

aminoácidos básicos, otro denominado hélice-bucle-hélice, implicado en la unión al ADN, y otro dominio de cremallera de leucinas por el que interacciona con Max, otro miembro de la familia Myc de proteínas reguladoras de la transcripción. Los heterodímeros Myc-Max son activadores de la transcripción y son necesarios para la oncogénesis (Amati *et al.*, 1993). Todos estos dímeros interaccionan con la secuencia de ADN conocida como caja E, "GAGCTC", a través de la región básica de c-Myc (Dang *et al.*, 1999).

Además, c-Myc regula la expresión del factor de transcripción E2F y de la fosfatasa responsable de la activación de las ciclinas, que están implicadas en la regulación del ciclo celular (Dang y Lewis., 1997). Así mismo, regula la expresión de los genes *cad* y *odc* que son componentes necesarios del proceso de síntesis del ADN (Bush *et al.*, 1998).

1.3. GENES SUPRESORES DE TUMORES

Como mencionamos anteriormente, generalmente es necesario la inactivación de las dos copias de estos tipos de genes para que se desencadene el proceso de malignización (Greenblatt *et al.*, 1994; Schneider, 1995). Normalmente, uno de los alelos muta por un evento intragénico y el segundo se inactiva por la delección de un segmento cromosómico grande o incluso de un brazo entero del cromosoma. Hasta la fecha se han identificado más de 17 genes supresores de tumores que están implicados directamente en el cáncer en humanos.

El *p53* es uno de los mejor estudiados, y se le denomina comúnmente "el guardián del genoma". Su producto es una proteína, que recibe el mismo nombre, y que se activa cuando la célula se dispone a dividirse. Su misión es controlar que no existan daños ni en el material genético ni en la maquinaria de división celular, antes de que ésta ocurra (Elledge y Allred, 1998; Jeffrey *et al.*, 2003). Si se detecta una lesión no muy grave, *p53* detiene la división y activa a los genes responsables de repararla. Por el contrario, si estima que la lesión es irreparable, pone en marcha los mecanismos genéticos responsables de la muerte celular programada, previniendo, de esta manera, la propagación de

una célula que pudiera presentar alteraciones genómicas estables, y por lo tanto, que pudiera tener susceptibilidad incrementada hacia la transformación maligna (Lane *et al.*, 1994). La decisión de una célula de someterse a apoptosis mediada por *p53* versus detención en G₁ es dependiente del contexto celular, ya que existen diferencias entre los tipos celulares, y éstas van a determinar el destino celular tras la inducción de *p53* (Canman y Kastan, 1997).

La proteína *p53* contiene varios dominios funcionales necesarios para inducir la detención del ciclo celular y apoptosis. La mutación en el dominio de activación 2, entre los residuos 53-54, anula la actividad apoptótica pero no tiene efectos significantes en la detención del ciclo celular, mientras que la activación de este dominio induce genes proapoptóticos o inhibe genes antiapoptóticos (Zhu *et al.*, 2000).

Otro gen supresor de tumores importante es el *Rb*, que ejerce su efecto durante la primera parte de la fase G₁ del ciclo celular. La proteína *Rb* se une al factor de transcripción E2F. Este complejo tiene la función de activar diversos genes indispensables para el inicio de la fase S, por lo que su secuestro por parte de *Rb* garantiza que la fase S no pueda iniciarse. Además, el complejo *Rb/E2F* reprime la transcripción de otros genes también importantes para el inicio de la fase S. Cuando la célula llega al punto de restricción de G₁, y detecta que todo sigue un curso normal, se produce la fosforilación de *Rb* por una quinasa dependiente de ciclina que causa la liberación del factor E2F por parte de *Rb*, activándose entonces los principales genes de la fase S (Shan *et al.*, 1994). La disfunción de este gen es uno de los hallazgos más comunes tanto en líneas celulares tumorales como en tumores clínicos (Goodrich y Lee, 1993).

Otros genes supresores de tumores importantes son *BRCA1* y *BRCA2* (Ishikawa *et al.*, 2004). El primero se relaciona con la aparición temprana de cáncer de mama (Hall *et al.*, 1990), existiendo múltiples localizaciones de mutación que originan proteínas truncadas o ausentes. El *BRCA2* se relaciona con el cáncer mamario familiar (Wooster *et al.*, 1995).

1.4. GENES REPARADORES DEL ADN

Estos genes codifican proteínas cuya función normal es la de corregir errores que surgen cuando las células duplican su ADN antes de dividirse. Como mencionamos anteriormente, las mutaciones en los genes reparadores del ADN pueden conducir al fracaso en la reparación del ADN, lo cual a su vez permite que mutaciones subsecuentes se acumulen, pudiendo desencadenarse procesos cancerosos.

Las mutaciones detectadas en estos tipos de genes son deleciones, inserciones, mutaciones puntuales, y también hipermetilaciones. Normalmente, es necesaria la inactivación de las dos copias del gen para que se origine el cáncer. No obstante, existen estudios que muestran que un pequeño número de mutaciones germinales causan deficiencias en la reparación sin necesidad de un segundo evento mutacional (Parsons *et al.*, 1995), sugiriendo la existencia de alelos dominantes.

Existen múltiples relaciones entre mutaciones en los diferentes genes de reparación del ADN y distintos tipos de cáncer (Sarasin, 2003). Así, la afectación de los genes *XPA* y *XPB* es responsable de la acumulación temprana de mutaciones en células de la piel de los individuos con xeroderma pigmentosa (Magnaldo, 2004; Bacarelli *et al.*, 2004). Los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* se relacionan con el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (Plaschke *et al.*, 2004), el gen *RAD51* con el adenocarcinoma de colon (Tan *et al.*, 1999), el gen *PMS2* con el síndrome de Turcot con glioblastoma (Richardson *et al.*, 2000), y así una larga lista (Ronen y Glickman, 2001).

1.5. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA AL CÁNCER

El 5-10% de los cánceres tienen un claro componente hereditario, y se manifiestan con un patrón compatible con una segregación mendeliana. En este tipo de cáncer lo que se transmite a la descendencia no es el cáncer propiamente dicho, sino un aumento en el riesgo de desarrollar la enfermedad (Ponder, 1997). Esta susceptibilidad genética al desarrollo del cáncer suele

heredarse como un rasgo dominante a nivel del individuo. Sin embargo, las alteraciones genéticas que confieren esta predisposición son casi siempre de carácter recesivo, manteniéndose el funcionamiento correcto mientras persista una copia normal del gen supresor de tumores.

El cáncer hereditario suele aparecer a una edad más temprana que el esporádico, y el riesgo de desarrollarlo está relacionado con el grado de parentesco. En los individuos predispuestos es frecuente la presencia de tumores de localización multifocal, el desarrollo bilateral de la enfermedad y la asociación de múltiples neoplasias. Las neoplasias que afectan a los miembros de una misma familia suelen ser de un tipo concreto, pero también pueden encontrarse otros tumores o incluso una agrupación de distintas neoplasias.

Los estudios dirigidos a caracterizar los genes implicados en los síndromes de cáncer familiar, han proporcionado numerosas pruebas que apuntan a la inactivación de los genes supresores de tumores, siendo raras las alteraciones que activen oncogenes en la línea germinal. Es probable que el carácter dominante de las lesiones en los oncogenes tenga efectos letales e impida subsistir aquellos fetos que hereden una mutación de este tipo.

2. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DEL TEJIDO MAMARIO

2.1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA MAMA

Las mamas son unos órganos pares que en los humanos se encuentran en el tórax dentro de la región pectoral, entre la piel y la cara anterior del músculo pectoral mayor, apoyándose en su mayor parte sobre éste y, en una pequeña zona de su porción externa, en el músculo serrato mayor (figura 1) (Ruiz, 1993; Russo y Russo, 2000).

La mama, completamente desarrollada, tiene forma de un segmento de esfera, con su parte plana adaptada a la pared torácica a ambos lados de la región esternal; ocupando, en sentido longitudinal, desde la segunda a la sexta costilla y lateralmente hasta la línea axilar media, estando separadas entre sí

mediante un surco. La zona más prominente de la mama está constituida por el pezón y la areola. El primero es una prominencia de aspecto papilar o cilíndrico, de superficie rugosa y con pequeñas depresiones en su vértice que constituyen la desembocadura de los conductos galactóforos. La areola, en cuyo centro se encuentra el pezón, está recubierta por una piel fina y pigmentada de forma anular, de tres a cinco centímetros de diámetro, y a su alrededor asientan glándulas sebáceas, sudoríparas y alguna mamaria rudimentaria (Ruiz, 1993; Lester *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2000). La forma global de la mama, su volumen, dimensión y el aspecto del pezón y areola pueden variar sensiblemente de acuerdo a factores genéticos, estado nutricional y funcional o patológico del sujeto (García, 2002).

La mama es un órgano que requiere de un período más prolongado para completar su desarrollo orgánico y maduración funcional, la cual se consigue en el momento de la lactancia. Además, en la mujer sufre diferentes modificaciones durante los diferentes períodos de la vida: nacimiento, pubertad, madurez, embarazo, lactancia y menopausia. En el varón la glándula mamaria, carente de los estímulos biológicos, queda relegado a un órgano rudimentario.

Histológicamente, la mama es una glándula exocrina compuesta tubuloalveolar, de secreción apocrina y capacidad de responder a estímulos hormonales, con la función especializada de nutrir al recién nacido. Al corte y de dentro hacia fuera, está formada por tres componentes: el tejido glandular o glándula mamaria propiamente dicha, un revestimiento de tejido conjuntivo adiposo y la envoltura cutánea.

En la mama adulta, la mayor parte de la masa mamaria está constituida por tejido fibroadiposo, pero su unidad funcional está formada por unos 15 a 25 lóbulos que forman la glándula. Estos lóbulos están separados unos de otros por tejido conjuntivo y adiposo, y cada uno de ellos forma una unidad autónoma llamada lóbulo mamario. Cada uno de estos lóbulos está formado por un sistema de lobulillos y ductos que desembocan en el pezón por un mismo conducto colector. Los conductos mamarios reciben nombres diferentes en sus distintas partes, reconociéndose así, desde el pezón y en sentido distal al

mismo para cada lóbulo, el conducto colector, el seno galactóforo, el conducto galactóforo, los ductos mayores y las unidades terminales ductales, que constituyen los lobulillos mamarios (figura 2) (Romrell y Bland, 2000; Márquez y Ordi, 2003).

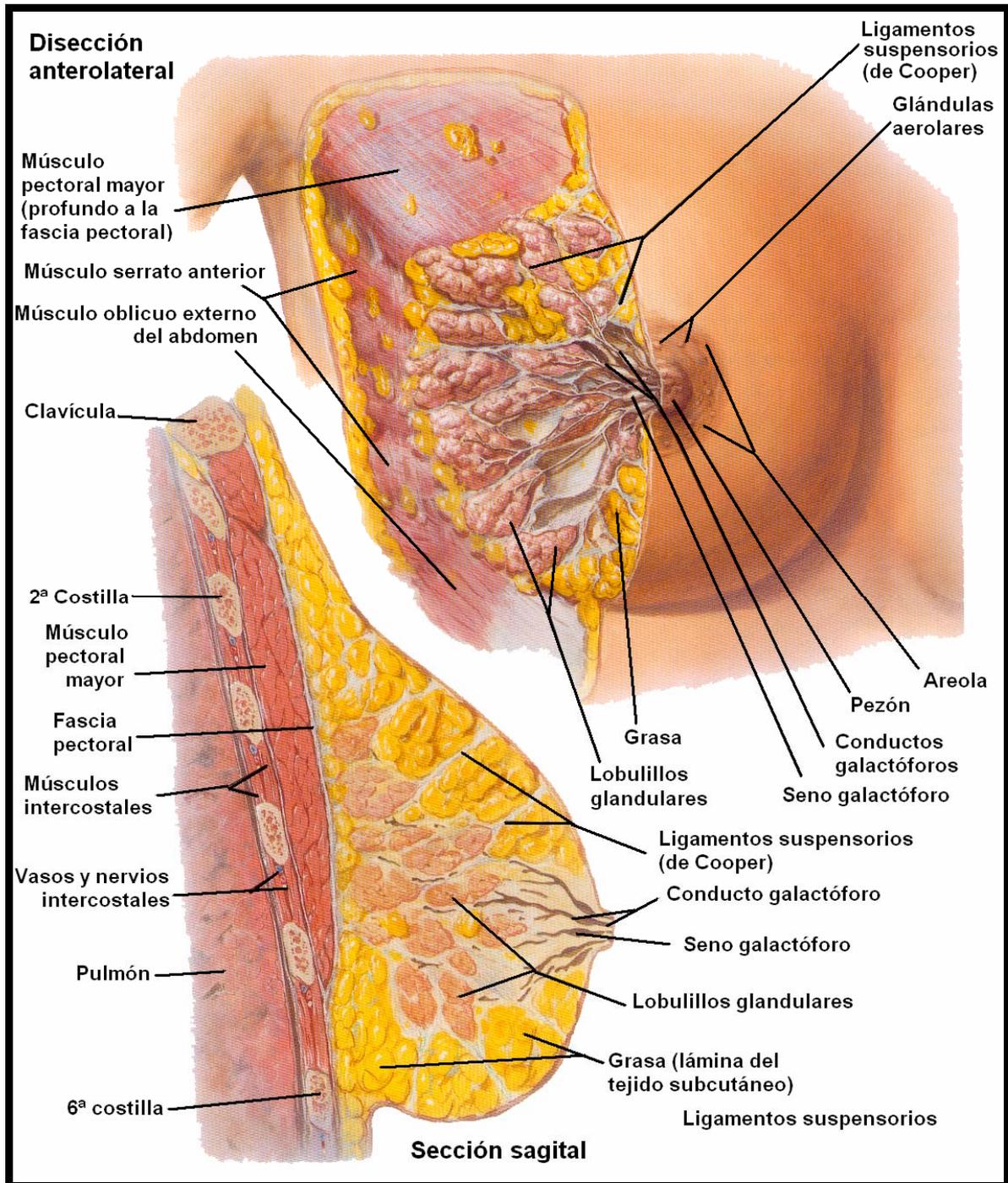


FIGURA 2. GLÁNDULA MAMARIA
 (Netter, 2003)

Los lobulillos están separados unos de otros por un tejido conjuntivo laxo, rico en células y vasos, mientras que cada lóbulo está separado de los otros por tejido conectivo denso que posee gran cantidad de células adiposas.

La piel que recubre la superficie de la mama, salvo en la zona areolar y en el pezón, está formada por tejido cutáneo con epidermis, epitelio plano poliestratificado queratinizado y la dermis (papilar y reticular), que descansan sobre un tejido conjuntivo denso e irregular con vasos y nervios. A nivel de la areola, la piel es más delgada, pigmentada y descansa sobre un sustrato de fibrocélulas musculares lisas en disposición circular y radial llamado músculo areolar de Sappey. La contracción de este músculo produce la erección del pezón y favorece el vaciamiento de los senos galactóforos durante la lactancia. A nivel del pezón la piel también es muy delgada con numerosas papilas, no tiene folículos pilosos ni glándulas sudoríparas, sólo sebáceas. Las fibras musculares son radiales y constituyen el músculo papilar (García, 2002).

2.2. DESARROLLO Y MODIFICACIONES DE LA MAMA

La diferenciación mamaria completa es un proceso gradual que tarda muchos años y se puede asumir que en las mujeres que nunca tienen un embarazo nunca llegan a completarla (Russo y Russo, 2000).

A lo largo de la vida, mediado por factores hormonales, la mama sufre importantes variaciones. Para su desarrollo las hormonas más importantes son los estrógenos, que promueven el crecimiento y el desarrollo del sistema ductal, la progesterona, que estimula el crecimiento lobulillar, y la prolactina, necesaria para ambos procesos (Márquez y Ordi, 2003). También se requiere insulina, cortisol, tiroxina, y hormona de crecimiento para la diferenciación completa de la glándula.

En las niñas, en respuesta al incremento de los niveles de estrógenos, se produce un aumento de tamaño y pigmentación de la areola, y la formación de una masa de tejido mamario justo por debajo de ella. Esto es debido al crecimiento y ramificación del sistema ductal y lobulillar, con proliferación del

estroma periductal.

Durante la pubertad, mediado por la prolactina y parcialmente por la hormona del crecimiento (GH), hormona adrenocorticotropa (ACTH) y hormona estimulante del tiroides (TSH), tiene lugar un crecimiento alométrico. Además, se produce el desarrollo de las yemas mamarias, relacionado con el aumento de estrógenos y del factor semejante a la insulina tipo I (IGF-I). Los estrógenos también estimulan la proliferación del epitelio ductal, células mioepiteliales y células del estroma. La progesterona junto a los estrógenos inicia la formación de los componentes secretores acinares en la porción más distal de los ductos.

Con la menarquia, el incremento cíclico de estrógenos y progesterona produce un desarrollo ductal adicional con la formación definitiva de los lóbulos. Ambas hormonas estimulan la proliferación del tejido conectivo que reemplaza al tejido adiposo. Los esteroides ováricos también estimulan la proliferación del tejido adiposo, produciendo el aumento proporcional y la pigmentación de la areola y el pezón (Rosenbloom, 2000; Larrad, 2002). Durante el ciclo menstrual la mama aumenta de volumen durante la fase lútea y, en el período premenstrual tiene lugar un aumento de densidad, nodularidad y sensibilidad (Larrad, 2002).

Durante el embarazo, la mama sufre un dramático incremento de tamaño, caracterizado por una marcada ramificación de los ductos y diferenciación de las yemas terminales para formar los alvéolos que se agrupan constituyendo los lóbulos. Se produce, además, un cúmulo progresivo de material de secreción y una atenuación de la capa de células mioepiteliales. Hacia el final del embarazo, se aprecian vacuolas secretoras en las células epiteliales, aunque la lactación no se produce hasta después del parto.

En la mama lactante se observa distensión de los acinos, atenuación de la capa de células mioepiteliales, presencia de vacuolización de las células epiteliales y secreción luminal. Este proceso de mamogénesis es dependiente de una serie de interacciones hormonales (Larrad, 2002; Lombardía y Fernández, 2002; Santonja y Sanz, 2003).

Los cambios lactacionales inician su regresión de siete a diez días tras finalizar la estimulación del pezón, pero la mama no vuelve a adoptar por completo sus características de reposo hasta que no han transcurrido tres o cuatro meses (Lester *et al.*, 1999; Márquez y Ordi, 2003).

Tras la menopausia, la disminución de la secreción ovárica de estrógenos y progesterona, produce un proceso de involución de los elementos parenquimatosos de la mama. Se observa una disminución del número de acinos y atrofia y atenuación de las células epiteliales, engrosamiento de la membrana basal y transformación del estroma periductal en un tejido denso (Larrad, 2002; Márquez y Ordi, 2003).

3. ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DEL EPITELIO INTESTINAL

3.1. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO

El aparato digestivo se compone del tubo digestivo (boca, faringe, esófago, estómago e intestino delgado y grueso) y de un conjunto de estructuras anexas (lengua, dientes, glándulas salivales, páncreas, hígado y vesícula biliar). Su función principal es la de degradar y absorber los alimentos ingeridos.

Cada parte del aparato digestivo esta especializada en una misión. Así, la pared gastrointestinal tiene una doble funcionalidad. Por un lado, a través de ella se realiza la mayor parte de la absorción de los productos de la digestión, y por otro lado, tiene una función inmunológica, al constituir una barrera entre el medio externo e interno, separando este último de un amplio espectro de sustancias nocivas e inmunogénicas presentes en la luz del tubo. El deterioro de esta barrera supone la entrada y absorción de componentes que crean un desequilibrio en la homeostasis del individuo dando lugar a diversas enfermedades (Dignass, 2001).

El intestino delgado, con más de 6 metros en humanos, es la parte más larga del aparato digestivo, y se extiende en asas desde el píloro hasta su

desembocadura en el ciego (válvula ileocecal). Anatómicamente se divide en tres partes (Martín y Soto, 1994):

- Duodeno: mide unos 25 cm. de largo y está dispuesto en forma de “C”. En la porción inicial aparecen las glándulas de Brunner, cuya secreción alcalina protege a la mucosa de la acidez del quimo. En la segunda porción aparecen la carúncula duodenal mayor, donde se abre la ampolla de Vater, desembocadura conjunta del conducto pancreático de Wirsung y colédoco, y carúncula duodenal menor, donde desemboca el conducto pancreático de Santorini.

- Yeyuno: comienza en el ángulo duodenoyeyunal para desembocar en el íleon. Es de unos 2´5 metros de largo.

- Íleon: de unos 3´5 metros, termina en la válvula ileocecal, límite con el intestino grueso.

La pared del intestino delgado está constituida por cuatro capas, que desde la luz hacia fuera son:

- Mucosa: constituida por un epitelio de revestimiento que subyace en tejido conjuntivo (lámina propia) y una capa de músculos liso (muscular de la mucosa). En el epitelio encontramos hasta cinco tipos celulares diferentes:

- Enterocitos: son las células más abundantes del epitelio intestinal. Tienen forma cilíndrica y realizan la función de absorción.
- Células Caliciformes: su misión es la de formar una capa de moco que protege y lubrica la mucosa (Wright, 2000).
- Células de Paneth: su misión principal es la defensa de la mucosa del intestino delgado al secretar péptidos y enzimas antimicrobianas como criptidinas, defensinas y lisozimas. Además, intervienen en la regulación de la composición iónica luminal, en la inflamación intestinal y en la digestión (Porter *et al.*, 2002).

- Células enteroendocrinas: producen y secretan las hormonas serotonina, sustancia P y secretina de manera endocrina y paracrina (Lee y Kaestner, 2004).
- Células M: se encuentran en la lámina propia del íleon y actúan presentando microorganismos y antígenos que son captados en el lumen intestinal a los linfocitos, permitiendo una respuesta inmunológica (Man *et al.*, 2004).

La lámina propia no sólo representa el entramado que sustenta el epitelio intestinal, sino que además regula diferentes aspectos de su funcionalidad (Leedham *et al.*, 2005). Está formada por diferentes tipos celulares: fibroblastos, fibrocitos, endotelio vascular, células musculares lisas, varios tipos celulares sanguíneos y miofibroblastos subepiteliales intestinales que secretan diferentes factores de crecimiento, esenciales para la proliferación y diferenciación celular.

- Submucosa: es una capa de tejido conjuntivo denso.
- Muscular: formada por una capa interna de células musculares lisas dispuestas circularmente, y una capa externa longitudinal.
- Serosa: es una membrana que consiste en un epitelio simple plano (mesotelio) y una pequeña cantidad de tejido conjuntivo (Ross *et al.*, 2005).

En el intestino delgado existen, tanto en las células que tapizan la mucosa, como en la propia mucosa y submucosa, diferentes especializaciones encaminadas a aumentar su superficie. Así, encontramos las vellosidades intestinales que son en evaginaciones digitiformes de la mucosa proyectadas hacia la luz del intestino, pudiendo alcanzar hasta 1 mm de longitud, que consiguen incrementar por diez la superficie de absorción. También existen los llamados pliegues circulares, que son dobleces de la mucosa y submucosa extendidos perpendicularmente al eje del tubo intestinal, y multiplican por tres la superficie de absorción. Los enterocitos también presentan diferenciaciones

llamadas microvellosidades apicales, unas 2000-3000 por célula, que en conjunto se denomina borde o chapa estriada y son capaces de multiplicar por veinte la superficie de absorción (Junqueira y Carneiro, 1996; García-Porrero y Hurlé, 2005).

3.2. RENOVACIÓN CELULAR DEL EPITELIO INTESTINAL

Entre los puntos de inserción de las vellosidades se ven orificios donde desembocan glándulas intestinales denominadas glándulas o criptas de Lieberkühn. Son estructuras tubulares, que se extienden a través del espesor de la lámina propia y en ellas se lleva a cabo un proceso dinámico celular que posibilita la renovación del epitelio intestinal adulto.

Existen células madre multipotentes localizadas en la base de la cripta intestinal, capaces de dar origen a todos los tipos celulares que componen el epitelio (Clatworthy y Subramanian, 2001). Hay entre una y seis células madre por cripta, que tras duplicarse, originan una población de células progenitoras que siguen dividiéndose conforme migran hacia el lumen intestinal. A lo largo de la migración se va produciendo la diferenciación celular, que adquiere su grado máximo al alcanzar la región apical de la vellosidad, donde las células son finalmente descamadas (Sancho *et al.*, 2003). Las células progenitoras se diferencian hacia enterocitos, células caliciformes o enteroendocrinas, mientras que las células de Paneth lo hacen en la base de la cripta (figura 3).

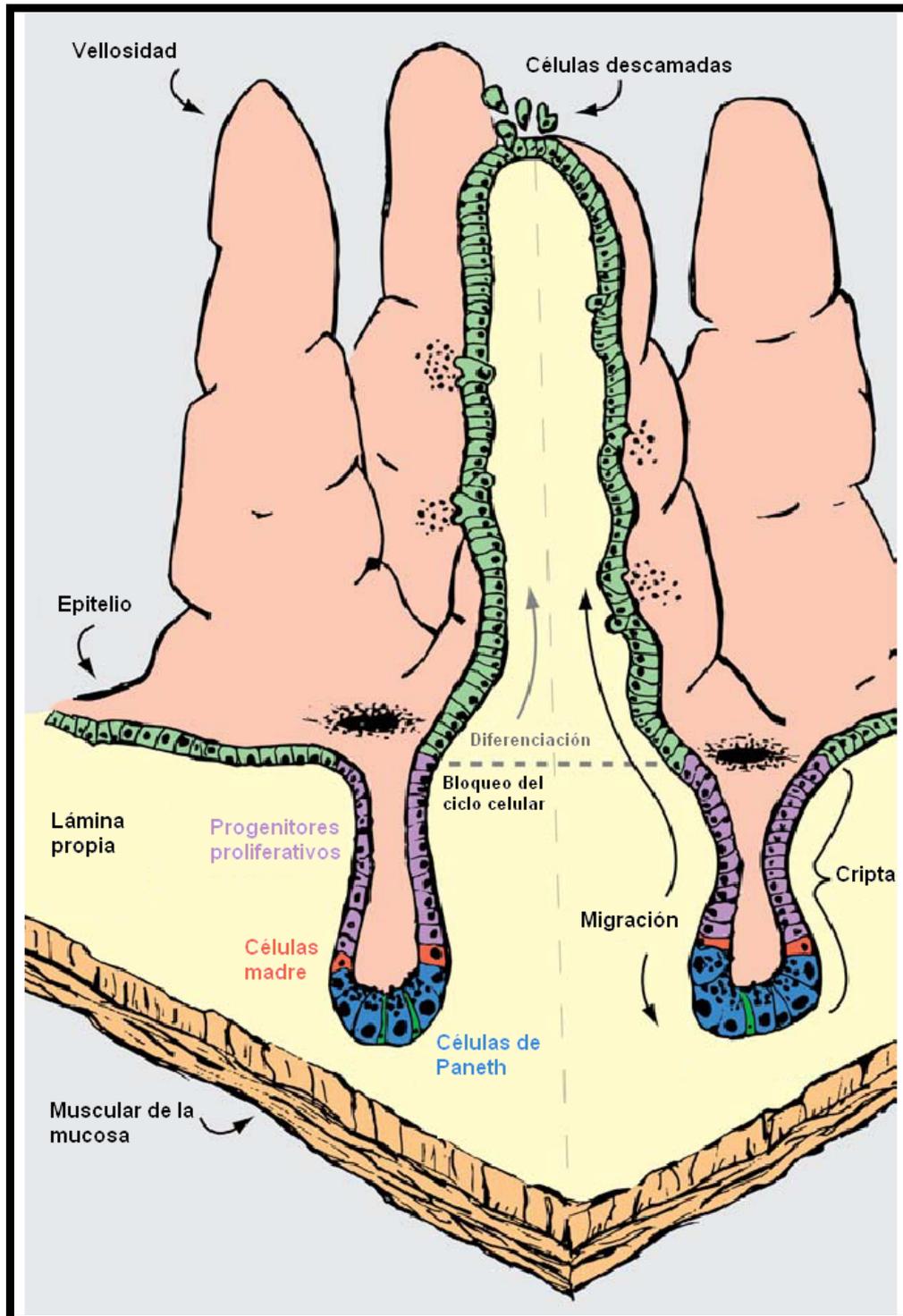


FIGURA 3. ESQUEMA DE LA MUCOSA Y DINÁMICA EPITELIAL DEL INTESTINO DELGADO
(Modificado de Sancho *et al.*, 2004)

La homeostasis epitelial intestinal se produce por tres procesos complementarios. Primero, la producción de células es compensada por la descamación que se produce en el ápice de la vellosidad. Segundo, la lámina de células epiteliales describe un movimiento continuo en sentido ascendente,

respecto al eje establecido entre la cripta y la vellosidad, exceptuando las células madre y las de Paneth, que localizadas en la base de la cripta, no sufren ese proceso de migración ascendente. Tercero, la capacidad proliferativa no es propia de un determinado grupo de células, sino de una determinada localización en la cripta intestinal, que se corresponde con el nicho ocupado por las células madre multipotentes. Es probable que este nicho esté constituido por células mesenquimáticas y por factores de la matriz extracelular que proporcionan el microambiente adecuado para la actividad de las células allí situadas (Sancho *et al.*, 2004).

Factores como Math1 y Hes1, tienen un papel fundamental en la diferenciación de las células madre hacia los cuatro linajes celulares presentes en el epitelio intestinal adulto. Así, la expresión de Hes1 inhibe a Math1, dirigiendo la diferenciación hacia enterocitos. Por el contrario, la ausencia de Hes1 incrementa la expresión de Math1, y la célula progenitora queda comprometida en la línea secretora. Además, el factor de transcripción BETA2/NeuroD, se ha relacionado con la diferenciación enteroendocrina (Schonhoff *et al.*, 2004), y el factor Rac1, miembro de la familia Rho de proteínas de unión al GTP, participa en la diferenciación hacia células de Paneth y linaje enterocítico (Stappenbeck y Gordon, 2000).

Entre los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo gastrointestinal y la renovación del epitelio intestinal, intervienen las rutas de señalización Wnt/ β -catenina y la Notch/Delta, a través de los factores de transcripción Hes1 y Math1, así como otro tipo de moléculas: el complejo proteico supresor de tumores -poliposis adenomatosa de colon (APC), factor de células T (Tcf-4), factor de transcripción de la familia helix/forkhead (Fkh-6), E2f4, Cdx-1, Cdx-2, Nkx2-3, molécula de señalización Indian Hedgehog (Ihh), molécula de señalización Sonic Hedgehog (Shh), proteína morfogénica de hueso (BMP), factor nuclear hepatocitario alpha (HNF1), proteína quinasa activada por mitógeno (p38 MAPK), activina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II), factor de crecimiento transformador (TGF- β 1), péptido similar a glucagón-2 (GLP-2), gastrina e integrina β 4 (Brittan y Wright, 2002; Sancho *et al.*, 2003;

Wang *et al.*, 2003; Leedham y Brittan, 2005; Madison *et al.*, 2005; Walters, 2005).

Las proteínas Wnt actúan sobre las células diana produciendo inhibición de la degradación del regulador transcripcional β -catenina. En el núcleo celular, la acumulación del mismo interacciona con diversos factores de transcripción, como el factor de células T/ factor intensificador linfocitario (TCF/LEF), afectando finalmente a la transcripción de diferentes genes (Logan y Nusse, 2004). Se ha observado en ratones transgénicos que expresan el inhibidor de la ruta Wnt, Dickkopf-1 (dkk-1) (Glinka *et al.*, 1998), reducción de la proliferación epitelial intestinal, pérdida de las criptas y ausencia mayoritaria de células secretoras (Pinto *et al.*, 2003).

El Tcf-4, miembro de la familia de factores TCF/LEF, es necesario para el mantenimiento de las células madre de la cripta y de la actividad proliferativa (Korinek *et al.*, 1998; van de Wetering *et al.*, 2002). Factores como Cdx-1 y Cdx-2 actúan en el control de las características morfológicas propias de cada zona del epitelio intestinal (Brittan y Wright, 2002) y también parecen intervenir en la regulación de la proliferación y diferenciación de las células madre de las criptas. Además, las proteínas quinasas p38 participan en el proceso de diferenciación, como elementos reguladores de la función de Cdx-2 (Houde *et al.*, 2001).

La activina, miembro de la familia TGF- β , contribuye a mantener la homeostasis del epitelio al actuar en la regulación de la diferenciación celular (Sonoyama *et al.*, 2000). La IGF-I estimula la proliferación y la migración de las células epiteliales (Kojima *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999); por el contrario, la IGF-II e insulina están más relacionadas con la diferenciación (Jehle *et al.*, 1999; Georgiev *et al.*, 2003). El EGF, interviene en la reorganización del citoesqueleto celular necesario para la diferenciación y reparación del epitelio intestinal (McCormack *et al.*, 1998).

La gastrina y GLP-2 se han mostrado como potentes agentes inductores de la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales

intestinales (Wang *et al.*, 2003; Jasleen *et al.*, 2002). Muchas citoquinas como la interleucina-2 (IL-2) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) dan lugar a diferentes señales de diferenciación, actuando en conjunción con contactos intercelulares y de célula con la matriz extracelular (Burgess, 1998).

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN ENTEROCÍTICA

Los enterocitos muestran un patrón de organización en la localización de sus orgánulos. Así, en la mitad inferior nos encontramos un núcleo celular ovalado, y encima de éste sacos y vesículas del aparato de Golgi. Las mitocondrias se acumulan en la región apical y el retículo endoplasmático queda distribuido por el resto del citoplasma. En la parte superior, se encuentran las microvellosidades constituyendo la chapa estriada, cubierta por una red fibrilar de carácter glucídico denominada glicocálix. Existen múltiples uniones intercelulares del tipo uniones estrechas y desmosomas.

El proceso de diferenciación del epitelio intestinal puede ser caracterizado mediante la determinación de la capacidad para desarrollar el transporte de diferentes sustratos, el seguimiento en los cambios de expresión y/o actividad de enzimas y proteínas específicas, estudio de los cambios morfológicos estructurales y ultraestructurales y la detección de la secreción de moléculas específicas (Ametani *et al.*, 1996).

Entre los marcadores específicos de células enterocíticas maduras se encuentra la fosfatasa alcalina, disacaridasas, peptidasas, gamma-glutamyltransferasa, transportador de glucosa de pendientes de sodio (SGLT 1), transportadores de fructosa como Glut 2 y Glut5, antígeno 104K, 5-nucleosidasa, villina, Fabpi/FabpL, apolipoproteína B, anexina y otros (Carroll *et al.*, 1988; Massey-Harroche, 2000; Sancho *et al.*, 2004). Además, la maduración de los enterocitos lleva implícito la pérdida de otros marcadores, tal como Ki67, inhibidor de quinasa dependiente de ciclinas (p21) y el marcador específico de gránulos de secreción MIM-1/39, que son expresados exclusivamente por las células de la cripta intestinal.

La fosfatasa alcalina es una enzima dimérica que cataliza la hidrólisis de ésteres monofosfato a pH alcalino, liberando fosfato inorgánico. En humanos, se conocen cuatro isoenzimas, una no específica de tejido que se expresa en una amplia variedad de tejidos como hígado, hueso y riñones (Calhau *et al.*, 2000), y tres específicas de tejido, que reciben el nombre en función del órgano en el que son más abundantes, intestinal, placentar y de las células germinales (Le Du y Millan, 2002). A nivel intestinal, se localiza en la membrana de las microvellosidades, fijada a la superficie a través de un anclaje fosfatidilinositol-glicosilado (GPI) (Wong y Low, 1992). A diferencia de otras especies, en la mucosa intestinal de las ratas se han encontrado dos ARNm con masas moleculares de 68 y 90kD respectivamente, que codifican dos isoformas de fosfatasa alcalina intestinal, rIAP-I y rIAP-II, con un 79% de homología (Engle y Alpers, 1992; Grewal y Mahmood, 2004). La isoforma rIAP-II, se caracteriza por encontrarse exclusivamente en la mucosa duodenal, por lo que parece ser la responsable, de las diferentes propiedades cinéticas y de sensibilidad a drogas de la fosfatasa alcalina, entre el duodeno y yeyuno de rata (Calhau *et al.*, 2000).

Las disacaridasas, son enzimas encargadas del paso final en la digestión de los hidratos de carbono. La determinación de las actividades enzimáticas maltasa, sacarasa, y lactasa son frecuentemente utilizadas como marcador en estudios de diferenciación epitelial intestinal (He *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2001). En el intestino grueso, el complejo sacarasa-isomaltasa tiene características inmunológicas diferentes a las presentadas en el intestino delgado, lo que sugiere diferencias en la estructura de ambas proteínas (Beaulieu *et al.*, 1990).

La villina forma parte del grupo de proteínas asociadas a actina moduladas por calcio (Pringault *et al.*, 1991). El corazón de las microvellosidades está ocupado por filamentos paralelos de actina, que se disponen desde el ápice de la vellosidad hasta la superficie celular. En el tracto digestivo y urinario, la villina se asocia a estos filamentos con gran afinidad a través de tres diferentes sitios, dos dependientes de calcio y otro independiente, realizando una función de mantenimiento de la morfología

característica de la superficie de las células. La expresión de villina incrementa en los enterocitos desde la cripta hasta el extremo superior de la vellosidad (Wang *et al.*, 2003).

La reprogramación genética que tiene lugar durante el proceso de diferenciación del epitelio a lo largo del eje cripta-vellosidad del intestino delgado de ratón, implica a un total de 1113 genes entre los que aparecen marcadores de diferenciación enterocítico, genes relacionados con el control de las fases del ciclo celular, procesamiento del ARN, citoesqueleto y captación de lípidos (Mariadason *et al.*, 2005).

4. CÁNCER DE MAMA

4.1. DEFINICIÓN

El cáncer de mama es una neoplasia, que se presenta con mayor frecuencia en los tumores de estirpe epitelial (en el epitelio ductal en un 70-80% de los casos y en el lobulillar en un 5-10%), aunque cualquiera de los tejidos que componen la mama puede albergar un cáncer. Es la primera causa de muerte por neoplasia entre las mujeres de países industrializados y representa cerca del 25% de las muertes no accidentales de mujeres con edades comprendidas entre los 35 y 54 años (Ursin y *cols*, 1994). La frecuencia de cáncer de mama aumenta con la edad hasta la menopausia y posteriormente continúa elevándose pero a menor velocidad (Guinee, 2000; Zamora *et al.*, 2001; Falcón y Falcón, 2002; Xercavins *et al.*, 2003).

Desde el punto de vista biológico, el cáncer de mama es una enfermedad altamente heterogénea lo cual, a su vez, se correlaciona con las distintas formas histopatológicas, los diversos grados de velocidad de crecimiento, las variaciones en la capacidad de dar metástasis, las distintas respuestas a terapias hormonales, etc. Todas estas variaciones son un reflejo de las diversas modificaciones a nivel genómico que han ocurrido durante el

proceso de transformación tumoral: alteraciones recesivas de genes supresores de tumores, con pérdida de sus funciones inhibitoras, y alteraciones dominantes en oncogenes, que habitualmente tienen como resultado una ganancia de sus funciones estimuladoras (Ciocca y Gago, 2000).

Las alteraciones genéticas, a su vez, pueden ser heredadas como mutaciones de la línea germinal o como mutaciones somáticas adquiridas. Estas últimas podrían ocurrir como resultado de la exposición a carcinógenos ambientales, ya sean físicos (ej. radiaciones ionizantes excesivas), químicos (ej. hidrocarburos policíclicos, nitrosoureas) y/o biológicos (ej. virus) (Martínez, 1995; Russo y Russo, 2000).

Existen una serie de factores que pueden aumentar o disminuir el riesgo de cáncer de mama, aunque un factor de riesgo no es suficiente para que aparezca este tumor ni es equivalente a un factor causal.

Existen dos grandes grupos de factores íntimamente relacionados. Por un lado están los factores hormonales y por otro se encuentran los factores ambientales entre los que se incluyen aspectos como la dieta, xenoestrógenos, o los hábitos tóxicos, que van a influir en el riesgo de padecer cáncer de mama a través de las modificaciones que ejercen en el perfil hormonal. Otro factor importante, aunque poco significativo desde el punto de vista estrictamente numérico, es el factor genético y familiar, ya que nos puede ayudar a comprender algunos mecanismos del desarrollo tumoral. También se pueden considerar factores de riesgo la patología mamaria benigna y los antecedentes personales de cáncer.

4.2. DIAGNÓSTICO

La principal posibilidad de alterar la evolución natural del cáncer de mama, es conseguir un diagnóstico temprano, en estadíos precoces, cuando el pronóstico de curación es excelente. Las tres pruebas de cribado más

importantes para la detección precoz del cáncer de mama son: la autoexploración mamaria, el examen clínico y la mamografía (López y Rodríguez, 2002). La mamografía es el método de cribado más efectivo para la detección de lesiones no palpables y cánceres de mama mínimos, pero no es efectiva al 100% (Cristóbal y Quevedo, 1998).

La ecografía es un método de diagnóstico complementario especialmente útil en el diagnóstico y estudio de las lesiones quísticas. La resonancia magnética es la más prometedora de las nuevas técnicas diagnósticas aplicadas al estudio de la mama ya que permite la estadificación de lesiones mal definidas mediante la mamografía o la ecografía, así como para la búsqueda de tumores ocultos en pacientes en las que se sospecha de cáncer de mama. Actualmente existen otras técnicas en estudio y desarrollo: interpretación mamográfica por ordenador, telemamografía, y mamografía digital donde se sustituye la placa radiográfica por una imagen digital que puede ser manipulada para aumentar así su sensibilidad (Zamora *et al.*, 2001).

Una vez establecido el diagnóstico de sospecha por pruebas clínicas y/o de imagen, se ha de confirmar dicho diagnóstico mediante citología y/o biopsia. Tras confirmar la naturaleza neoplásica de la lesión, ha de realizarse un estudio de extensión para determinar si existe enfermedad a distancia y, en función del estadio de la enfermedad, se decidirá la estrategia terapéutica adecuada en cada caso.

La mayoría de los cánceres de mama son neoplasias epiteliales puras, es decir carcinomas, y se suelen originar en la unidad ducto-lobulillar terminal. Al proceder de una glándula, se denominan más adecuadamente adenocarcinomas. Existen otros tipos tumorales malignos que no son epiteliales puros como el tumor filoides maligno (mixto epitelial y mesenquimal), o son no epiteliales y muy poco frecuentes como: sarcomas, linfomas, tumores cutáneos, tumor de células granulares, y los tumores metastásicos en la mama. Siguiendo la clasificación histológica de la OMS (1981), de los tumores mamarios malignos, podemos dividir a los tumores epiteliales en:

- In situ:

- Ductal (CDIS): se caracterizan por una proliferación epitelial que no sobrepasa el límite de la membrana basal, con mitosis más numerosas que en las hiperplasias atípicas, y donde es muy característico el solapamiento nuclear. Se han descrito cinco subtipos de CDIS: comedoniano, sólido, cribiforme, papilar y micropapilar.

- Lobulillar (CLIS): existe una proliferación epitelial de células pequeñas que no sobrepasan la membrana basal, y que van a rellenar ductos terminales y ductulos, cuyo volumen suele ser mayor que el de los no afectados.

- Microinvasores: presencia de invasión focal por células mioepiteliales alrededor de las sospechosas.

- Invasores:

- Ductal: la invasión de los tejidos normales adyacentes es por células epiteliales propias de los conductos mamarios. La mayor parte de la masa tumoral no posee rasgos especiales, excepto tendencia variable a formar estructuras glanduloides y mostrar signos de secreción. Existen dos tipos de carcinomas ductales invasores: inespecíficos y especiales como el tubular, medular, mucinoso, metaplásico, epidermoide, papilar, apocrino, con células gigantes osteoclastoides y con diferenciación endocrina.

- Lobulillar: Se suele diferenciar del ductal, por las características de sus células y su patrón de invasión.

- Combinados ductal-lobulillar.

- Inusuales: Tienen una presentación clínica inusual, como el ductal invasor asociado con enfermedad de Paget mamaria, inflamatorio, oculto con metástasis ganglionar en tejido mamario ectópico.

4.3. PRONÓSTICO

Factor pronóstico se define como una medida biológica o clínica que está asociada con supervivencia global o período libre de enfermedad en la ausencia de terapia adyuvante sistémica, y que es capaz de proporcionar en el momento del diagnóstico información importante sobre el curso clínico del proceso. Un factor predictivo es una medida asociada con respuesta o carencia de respuesta a una terapia particular permitiendo seleccionar a los pacientes para un tratamiento adecuado. En el cáncer de mama no existe ningún marcador específico, por lo que se han estudiado un gran número de parámetros con el fin de establecer un pronóstico que pueda indicar una terapéutica eficaz y predecir la supervivencia. Existen una serie de factores pronóstico que podemos dividir en:

- Factores pronóstico clínicopatológicos:

- Tamaño tumoral.
- Número de ganglios axilares positivos.
- Grado de invasión linfática y vascular.
- Angiogénesis: existe un pronóstico más desfavorable en pacientes con tumores asociados con actividad angiogénica elevada.
- Edad y estado hormonal: es un factor negativo en mujeres de corta edad y en mujeres embarazadas o premenopáusicas (Winer *et al.*, 2001).

- Factores pronóstico moleculares:

- Hormonodependencia: los factores pronóstico moleculares más importantes son la presencia o ausencia de receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (RP) en el tumor. El estado del RE es una medida de capacidad proliferativa y del potencial metastásico, además de ser

un factor predictivo para terapia hormonal y también pronóstico (Russo y Russo, 2000). La positividad para RE y RP es indicadora de tumores menos agresivos y de mejor pronóstico (Styblo y Wood, 2000).

- Crecimiento del tumor: a mayor proliferación mayor agresividad. Se incluyen métodos directos de medida como el índice de marcación con timidina tritiada, que indica el porcentaje de células que están sintetizando ADN o en fase S, y, el grado de ploidía obtenido por citometría de flujo. Como métodos indirectos se utilizan la detección mediante inmunohistoquímica de ciertas proteínas que se expresan durante fases específicas del ciclo celular, como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y el Ki67 (López y Roldán, 2002).

- Oncogenes/factores de crecimiento: en general, cualquier alteración de un proto-oncogen en un tumor maligno indica mayor agresividad y peor pronóstico. En la actualidad están en estudio otros factores como el factor de crecimiento insulínico (IGF), su receptor (IGF-r) y el factor de crecimiento transformante (TGF α).

La expresión del factor de crecimiento epidérmico Erb-B1 y sus receptores se asocia con un pronóstico desfavorable y resistencia hormonal en pacientes con ganglios linfáticos positivos y negativos (Holbro *et al.*, 2003). Erb-B2 (oncoproteína HER-2/neu), se encuentra sobreexpresada en un 20% de los casos y se asocia con un pronóstico desfavorable, menor tiempo libre de enfermedad y menor tasa de supervivencia (Hamilton y Piccart, 2000; Lohrisch y Piccart, 2001; Wang y Hung, 2001). La sobreexpresión de *c-myc* contribuye al desarrollo de cáncer de mama y se asocia con una reducción de la supervivencia libre de enfermedad y de la supervivencia global.

- Antioncogenes: los antioncogenes codifican proteínas, que por distintos mecanismos actúan frenando la proliferación celular.

Dos de los más importantes son el retinoblastoma (*Rb*) y el *p53*. La alteración del funcionamiento de pRb, es uno de los hallazgos más comunes en todas las líneas celulares tumorales y en los tumores clínicos (Rodríguez y Rodríguez, 2000).

El *p53* mutado e inactivado está presente en aproximadamente el 50% de las lesiones invasoras de mama, siendo relacionado con mal pronóstico incluso en pacientes con ganglios negativos. Por el contrario, su nivel de expresión es elevado en lesiones cancerosas preinvasoras, indicando que este antioncogen se inactiva en las etapas tempranas de la oncogénesis mamaria. En pacientes con cáncer de mama se han encontrado anticuerpos anti-p53 que no diferencian a la proteína salvaje de la mutada (Garrido y López, 2000).

- Apoptosis: un alto índice apoptótico se relaciona con características celulares malignas y es indicador de proliferación e invasión celular en cáncer de mama (Lipponen, 1999).

- Invasión/metástasis: determinadas proteínas juegan un papel importante en el control de la membrana basal y en la motilidad celular, y están actualmente en estudio, como nm23, activador del plasminógeno de uroquinasa (uPA) y catepsina D (Dahiya y Deng, 1998; Coradini y Daidone, 2004).

- Inestabilidad genómica: ha sido asociada con la transformación maligna en cáncer de mama, sin embargo, no se han encontrado evidencias, de la relación causa-efecto con este tipo de cáncer (Stepanova *et al.*, 2003).

- Respuesta a quimioterapias: la exposición de las células a agentes nocivos químicos produce una rápida e intensa síntesis de proteínas de choque térmico, de GST pi, HER-2/neu, p53 y glicoproteína p170 (codificada por el gen *mdr1*). Niveles elevados de las mismas se han asociado con estadíos avanzados, invasión vascular, disminución del período libre de enfermedad y de la supervivencia global.

4.4. TRATAMIENTO

Existen cuatro modalidades de tratamiento: cirugía, radioterapia (RT), quimioterapia (QT) y terapia hormonal (TH). El tratamiento complementario o adyuvante del cáncer de mama es aquél que se administra después del tratamiento quirúrgico, con el fin de destruir o impedir el crecimiento de las micrometástasis, cuya existencia se supone, pero no se puede demostrar en el momento de la cirugía (Jonson *et al.*, 2003). Estos tratamientos coadyuvantes se llevan a cabo mediante QT, RT y TH (Pérez y Martín, 1998; Osborne y Ravdin, 2000; Calero, 2003).

La cirugía conservadora de la mama asociada a radioterapia post-operatoria, tiene la misma supervivencia que la mastectomía, aunque con mayor incidencia de recidiva local (Fowble *et al.*, 2000; Veronesi, 2000). El tipo de tratamiento depende de la extensión del tejido extirpado (Pacheco *et al.*, 2000). La mastectomía radical clásica está en progresivo desuso, reservándose a los casos de tumores avanzados fijos al pectoral mayor (Bland y Copeland, 2000). La mastectomía radical modificada, preservando uno o los dos pectorales, está indicada, especialmente, en pacientes que rechacen la cirugía conservadora o en casos de tumores infiltrantes más agresivos (Román, 1998; Menke *et al.*, 2000; Bland *et al.*, 2000).

Existe un tratamiento neoadyuvante que se administra previamente a la intervención quirúrgica de un tumor, con el propósito principal de reducir la extensión de la cirugía. La quimioterapia (QT) neoadyuvante incrementa la proporción de mujeres que pueden ser tratadas con cirugía conservadora en vez de con mastectomía, mejora la supervivencia de la mujer y puede indicar la quimiosensibilidad del tumor, de manera que a mayor sensibilidad, mayor probabilidad de que la QT modifique la supervivencia de la paciente (Chacón y Álvarez, 2002).

En pacientes consideradas de alto riesgo tras mastectomía, se administra radioterapia (RT). Ésta se basa en el empleo de radiaciones

ionizantes y su interacción con la materia viva, con el fin de destruir un proceso neoplásico. Su objetivo es la irradiación de la zona tumoral, evitando en lo posible los órganos críticos (Moreno y Rodríguez-Escudero, 2003). La cirugía conservadora junto con la RT es un tratamiento en estadios precoces con la misma supervivencia que la mastectomía (Lanzós, 1998).

El objetivo de la QT es la destrucción del mayor número de células posibles (Moreno y Rodríguez-Escudero, 2003). La QT complementaria mejora la supervivencia libre de enfermedad y también la supervivencia global. La combinación de QT y TH es superior a la utilización de cada una de ellas por separado (Márquez y Alba, 1998).

La TH, se aplica en pacientes con receptores para estrógenos o progesterona positivos, con metástasis óseas o en partes blandas, con intervalo libre de enfermedad prolongado, con enfermedad poco sintomática, y en la mayoría de pacientes de edad avanzada (Piera, 1998). Existen diversas opciones, con mecanismos de acción distintos, que posibilitan el empleo de varias líneas de tratamiento (Cyr y Moulton, 2000).

5. CÁNCER DE COLON

5.1. DEFINICIÓN

Todos los tipos de cáncer de colon se caracterizan por la aparición inicial de un pólipo, que dependiendo del tipo de que se trate (adenomatoso o hamartoma) tendrá un mayor o menor riesgo de progresión hacia carcinoma. En la mayoría de los casos aparece de forma espontánea y en un pequeño porcentaje (5-10%) aparece formando parte de síndromes gastrointestinales hereditarios autosómicos dominantes.

Normalmente consisten en células epiteliales transformadas, como ocurre en los pólipos adenomatosos característicos de la poliposis familiar hereditaria (FAP), en el síndrome hereditario no-polipósico (HNPCC) y en tumores de colon esporádicos. En otras ocasiones el componente proliferativo

mayoritario es el estromal, como ocurre en los pólipos tipo hamartoma del síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) y en el síndrome polipósico juvenil (JPS), siendo éstos más benignos ya que raramente evolucionan hacia adenoma.

El pólipo adenomatoso se origina por la inactivación de los dos alelos del gen supresor de tumores *APC* (*adenomatous poliposis coli*). A continuación, en la fase de adenoma avanzado aparecen mutaciones del oncogen *K-ras* que lo inactivan, y por último, mutaciones en los alelos de *p53*. (Fearon y Vogelstein, 1990).

5.2. POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR

La poliposis adenomatosa familiar es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por la aparición de múltiples pólipos intestinales a una edad muy temprana (Burt y Jacobi, 1999). Estos pacientes desarrollan inevitablemente cáncer de colon a menos que sea eliminado. La edad media de aparición de los adenomas se sitúa a los 16 años de edad, y sin colectomía el cáncer de colon aparece a una edad media de 39 años (Burt y Jacobi, 1999; King *et al.*, 2000). La FAP surge como resultado de una mutación germinal en el gen *APC* y pérdida de la función génica del segundo alelo (King *et al.*, 2000). Manifestaciones gastrointestinales frecuentes de esta enfermedad son la aparición de adenomas duodenales y múltiples pólipos de las glándulas fúndicas gástricas (Burt y Jacobi, 1999). Aquellos individuos que tienen el polimorfismo I1307K (cambio de una T por una A en el nucleótido 3920) tienen un riesgo dos veces mayor de desarrollar cáncer de colon hereditario familiar con respecto a la población general (Laken *et al.*, 1997).

Existen tres variantes de la FAP:

- El síndrome de Gardner, es la forma más frecuente de FAP, y en él coexisten pólipos intestinales con tumores benignos extra-intestinales tales como osteomas, quistes epidermoides, fibromas y tumores desmoides (Guillén *et al.*, 1999).

- El síndrome de Turcot, está asociado a pólipos y tumores del sistema nervioso central. Dos tercios de los pacientes con el síndrome de Turcot presentan mutaciones en el gen *APC*, y además desarrollan tumores tipo meduloblastoma (Burt y Jacobi, 1999; Hamilton *et al.*, 1995). El resto de pacientes con este síndrome, sin embargo, presentan mutaciones en los genes reparadores de desemparejamientos de bases y aparición de glioblastomas multiformes.

- La forma atenuada (AAPC), es la tercera variante de FAP. Aquí los pacientes sólo desarrollan una media de 30 pólipos. Mutaciones próximas al codón 157 (Spirio *et al.*, 1993) y al codón 1900 (Gardner *et al.*, 1997) se asocian con esta patología.

5.3. SÍNDROME HEREDITARIO NO POLIPÓSICO

El cáncer hereditario no-polipósico, también conocido como síndrome de Lynch, ha de cumplir las siguientes características conocidas como “Criterios de Ámsterdam”: presencia de al menos tres casos de cáncer de colon en la familia (de los cuales uno de ellos es un familiar de parentesco directo con respecto a los otros dos), uno o más casos de cáncer de colon diagnosticados en la familia antes de los 50 años de edad, y existencia del cáncer de colon en al menos dos generaciones. Ésta es la forma hereditaria de cáncer colorrectal más frecuente y representa el 6% de los casos de cáncer de colon, aunque el número de pólipos adenomatosos es bajo en comparación con la poliposis familiar hereditaria (FAP), presentando además escasa diferenciación.

Este síndrome se clasifica atendiendo, a la presencia o ausencia de tumores extra-colónicos, como síndrome de Lynch tipo I y tipo II. El primero, comienza a una edad temprana con carcinomas en el colon proximal (asa derecha). Los pacientes con el síndrome de Lynch tipo II, además de presentar las características anteriores, desarrollan tumores extra-colónicos que incluyen: cáncer de endometrio, ovario, estómago, páncreas, intestino delgado, tracto hepatobiliar, uréter y pelvis renal (Lynch *et al.*, 1993).

5.4. SÍNDROME POLIPÓSICO JUVENIL

En el síndrome polipósico juvenil (JPS), aparecen múltiples pólipos que se localizan a lo largo de todo el tubo digestivo (fundamentalmente en colon, estómago e intestino delgado). Se trata de pólipos estromales o hamartomas, que, a diferencia de los encontrados en el síndrome de Peutz-Jeghers, no tienen componente de músculo liso (Howe *et al.*, 1998). Además, aparecen defectos congénitos asociados: enfermedad congénita del corazón, protuberancias óseas, fisura labial y palatal y microcefalia (Guillén *et al.*, 1999).

Hasta la fecha se han identificado dos genes involucrados: *SMAD4* y receptor tipo 1A del factor óseo morfogenético (*BMPR1A*), que intervienen en la vía de señalización SMAD4/TGF β . Aunque, a pesar de la implicación de ambas proteínas en el síndrome JPS, hay casos en los que todavía no se ha identificado el gen responsable (Zhou *et al.*, 2001).

5.5. SÍNDROME DE PEUTZ-JEGHERS

En el síndrome Peutz-Jeghers (PJS) encontramos tumores gastrointestinales en el 2-13% de los casos, aunque la incidencia tumoral es mayor en tejidos de diferente histología como páncreas, mama, ovario, útero, y cérvix. Los pólipos vistos en este síndrome son diferentes a los pólipos tipo hamartoma convencionales, ya que presentan un componente infiltrado de músculo liso y tienen forma ramificada (Bosman, 1999; Hemminki, 1999). Los pacientes afectados también presentan pigmentación de la piel y de la mucosa oral.

El locus responsable se encuentra en la posición 19p13.3 y codifica una serina-treonina quinasa de 433 aminoácidos denominada STK11/LKB1 (Hemminki *et al.*, 1998; Jenne *et al.*, 1998). La mayoría de las mutaciones encontradas en la línea germinal eliminan la actividad quinasa de la enzima, y suelen encontrarse en los codones 51-84 del exón 1 y en el exón 7. Es muy frecuente que en el paso de hamartoma a carcinoma se produzca la pérdida

del alelo salvaje, apareciendo un desequilibrio alelico en el locus STK11 (Wang *et al.*, 1999).

5.6. EVENTOS GENÉTICOS ADICIONALES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON

Aproximadamente el 50% o más de los tumores de colon presentan mutaciones en *p53* que se localizan primariamente en los exones 5-8. Estas mutaciones hacen que produzca una proteína con una vida media anormalmente larga (Ko y Prives, 1996; Prives, 1998). Las mutaciones inactivadoras de *p53* ocurren de forma tardía durante la transición de adenoma a carcinoma, y suelen ir acompañadas por deleciones del segundo alelo salvaje.

También es frecuente la mutación en el gen *K-ras*, aproximadamente el 50% de los tumores colorrectales, con alteración en los codones 12, 13 y, en menor medida, 61. Este gen interviene en la transducción de señales que regulan la progresión del ciclo celular (Rommel y Hafen, 1998; Pronk y Bos, 1994). Las mutaciones en *K-ras* se asocian a un aumento en la expresión de la enzima ADN metiltransferasa (DNMT1), ciclina D1 y gastrina. La elevada actividad DNMT1 detectada en tumores de colon podría conducir a la aparición de inactivación epigenética de genes supresores de tumores tales como *p16*, observado en tumores de colon (28-55%) (Guan *et al.*, 1999).

El gen supresor de tumores *DCC*, aparece delecionado en más del 70% de tumores MSS. Codifica un receptor de superficie para el ligando netrina que parece implicado en la regulación de la apoptosis, y su pérdida se asocia con un peor pronóstico (Shibata *et al.*, 1996).

En el cáncer de colon también es frecuente encontrar genes que se encuentran constitutivamente sobreexpresados pero no mutados. Ejemplos son el gen que codifica la ciclooxigenasa-2 (*cox-2*), que interviene en la regulación de la angiogénesis y apoptosis (Tsuji *et al.*, 1998), y que aparece aumentada

su expresión en el 43% de los adenomas y en el 86% de los carcinomas (Eberhart *et al.*, 1997).

6. LÍNEAS CELULARES COMO MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA INVESTIGACIÓN EN CÁNCER DE MAMA Y COLON.

Desde hace décadas se han venido usando diferentes líneas celulares cancerígenas como modelos para el estudio y desarrollo de terapias antitumorales. El uso de estas líneas celulares presenta una serie de ventajas, como la homogeneidad de las muestras y el control de las condiciones ambientales. No obstante, también existen ciertos inconvenientes, como las estrictas condiciones de asepsia en las que tienen que ser mantenidas.

Para el estudio experimental de cáncer de mama se utilizan una amplia variedad de líneas de cáncer de mama. Dichas líneas han sido establecidas procedentes de tumores epiteliales (HMT-3522 S1, HMT-3522 S2, HMT-3522 T4-2), adenocarcinomas (MDA-MB-361, MCF-7) ó transformadas (fR2, fR5, SVCT, SVCT-MI2).

La línea celular MCF-7 fue derivada en el año 1970 por efusión pleural de un adenocarcinoma de mama metastásico de una mujer de raza blanca de 69 años. Desde entonces, la línea MCF-7 es la más utilizada para llevar a cabo estudios experimentales de cáncer de mama RE⁺ (Levenson y Jordan, 1997), ya que fueron las primeras células de cáncer de mama humano en ser permanentemente mantenidas en cultivo celular. Esto ha conllevando el desarrollo de variedades aparentes de células MCF-7, observándose diferentes características entre células de la misma línea.

Estas células son salvajes para *p53* y difícilmente sufren fragmentación apoptótica del ADN aunque muestran aparente inducción morfológica de apoptosis, exhibiendo cambios en la estructura nuclear (Gooch y Yee, 1999). Exhiben algunas características de epitelio mamario diferenciado, como la síntesis de estradiol y la expresión de receptores de progesterona y estrógenos.

Además de las líneas tumorales, para el estudio del cáncer de mama también son de gran utilidad el uso de líneas celulares mamarias no tumorales, como es el caso de la línea MCF-10A, con objeto de poder establecer comparaciones que permitan identificar mecanismos involucrados en el fenotipo maligno. Esta línea procede del epitelio de la glándula mamaria humana y fue establecida a través de un cultivo a largo tiempo en un medio libre de suero con baja concentración de calcio (Soule y McGrath, 1991).

Estas células inmortalizadas y no transformadas son un excelente modelo para analizar el efecto en el comportamiento de células sanas al sobreexpresar una proteína de interés mediante ingeniería genética (Sun y Rotenberg, 1990). Así, esta línea celular ha sido utilizada para proponer mecanismos de transformación neoplásica por activación de *H-ras* (Zhong *et al.*, 1997), de ErbB2 y TGF (Seton-Rogers y Brugge, 2004) y activación autocrina de CSF-1R (Wrobel *et al.*, 2004). También se han usado estas células en cultivos tridimensionales, para identificar y caracterizar los mecanismos que controlan los procesos de proliferación y muerte celular, en estructuras que simulan la situación dentro de los lóbulos mamarios (Underwood *et al.*, 2006).

Para el estudio del epitelio intestinal, se han ido desarrollando diferentes líneas celulares, tanto normales como tumorales, humanas y de otras especies. La línea celular HT-29 fue establecida a partir de células de adenocarcinoma de colon humano (Fogh, 1975). En condiciones estándar de cultivo, más de un 95% de las células presentan una morfología típica de células indiferenciadas. Por el contrario, el 5% restante desarrolla características diferenciadas: expresan aminopeptidasa N (APN), dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), antígeno carcinoembrionario (CEA), la glicoproteína de membrana MUC1, así como otras mucinas (Lesuffleur *et al.*, 1990). Sin embargo, cultivadas con las condiciones adecuadas, expresan características típicas de la diferenciación de los enterocitos normales (Pinto *et al.*, 1982; Hauri *et al.*, 1985; Rousset *et al.*, 1985).

A nivel genético, las células HT-29 presentan las alteraciones típicas de

los tumores colorrectales, como son mutaciones en *APC* y *p53* con la consiguiente pérdida de sus funciones, amplificación de *c-myc*, y un fenotipo de aneuploidía e inestabilidad cromosómica (Corzo *et al.*, 2003).

Estas células son capaces de generar tumores bien diferenciados de tipo enterocítico al ser inoculados en ratones (Zweibaum *et al.*, 1984; Chantret *et al.*, 1987; Zweibaum, 1993). Sin embargo, no proceden de células normales no tumorales, por lo que pueden existir diferentes características metabólicas, que las alejen de la situación epitelial normal *in vivo* e *in vitro*.

La línea celular IEC-6 fue establecida a partir de células epiteliales procedentes de yeyuno de rata, y se consideran como derivadas de las criptas del intestino delgado (Quaroni *et al.*, 1979). Las células tienen características fenotípicas indiferenciadas (capaces de sintetizar fibronectina y colágeno), y su comportamiento en cultivo se asemeja al que experimentan las células epiteliales intestinales *in vivo*. En primer lugar, proliferan de manera intensa, como ocurre en la base de las criptas intestinales, hasta llegar a la confluencia, entonces la monocapa se va engrosando y aparecen más capas superpuestas de células. Después, se produce un bloqueo de la proliferación, expresión de marcadores como la fosfatasa alcalina intestinal y desarrollo de microvellosidades en su superficie celular, del mismo modo que ocurre en las células que se localizan a nivel de la vellosidad intestinal, donde los enterocitos van adquiriendo el grado máximo de diferenciación. Por último, tras su muerte celular por apoptosis, son descamadas hacia el medio de cultivo (Ametani *et al.*, 1996).

Estas células se usan en estudios tan variados como de proliferación celular (He *et al.*, 1993; Corkins *et al.*, 1995; Wolpert *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1999; Jasleen *et al.*, 2002; Tuhacek *et al.*, 2004), diferenciación (Carroll *et al.*, 1988; He *et al.*, 1993; Suh y Traber, 1996; Soubeyran *et al.*, 1999), reparación de daño tisular (Sturm *et al.*, 1999; Beck *et al.*, 2003; Hirata y Horie, 2003; Tabel *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005), pruebas de la calidad nutricional de alimentos (Thoreux *et al.*, 1996), ó evaluación de infecciones (McGee *et al.*, 1993; Tabel *et al.*, 2003; Upperman *et al.*, 2003). Del mismo modo, este tipo celular se ha utilizado como modelo experimental válido para estudios de

toxicidad de fármacos antitumorales (Sosogi *et al.*, 2003; Kuratko y Constante, 1998; Kuo *et al.*, 1997; Kuo, 1996).

7. CICLO CELULAR

7.1. CONCEPTO

Se habla de ciclo celular para describir el proceso que se inicia al término de una división celular y que acaba con el final de la siguiente división. Dos condiciones indispensables para que el ciclo celular tenga éxito son que la célula madre replique el ADN exactamente y que las dos células hijas reciban correctamente los cromosomas replicados.

La división de las células en eucariotas superiores es un proceso coordinado con las necesidades del organismo como un todo. Defectos existentes en la regulación del ciclo celular dan lugar a la proliferación anormal de las células, como ocurre en el caso de los tumores y el cáncer. Por el contrario, el camino de la diferenciación y especialización celular lleva asociado una progresiva pérdida del potencial proliferativo (Cooper y Hausman, 2004).

7.2. FASES DEL CICLO CELULAR

El ciclo celular eucariota se divide en 4 fases (figura 4):

- Fase G₁, comprendida entre la mitosis y la síntesis del ADN, es un período muy activo metabólicamente, se producen los desoxiribonucleótidos y los enzimas necesarios para la replicación, la célula aumenta de tamaño y genera nuevos orgánulos.

- Fase S, donde se produce la síntesis del ADN, ADN-polimerasa y de las proteínas histonas. Esta fase acaba con todos los cromosomas duplicados y formados por dos cromátidas iguales.

- Fase G₂, en ella se comprueba que la replicación del material genético ha ocurrido con éxito, antes de que se inicie la mitosis (Viallard *et al.*, 2001), y

se sintetizan proteínas para la preparación de la mitosis. Acaba con la condensación de los cromosomas al inicio de la mitosis.

- Fase M, es donde se produce la división celular y en ella se sincronizan dos procesos, la división del núcleo (cariocinesis) y la división celular (citocinesis), tras lo cual la célula queda dividida en dos células hijas, portando cada una de ellas un paquete genético idéntico.

En una célula tipo con un ciclo celular de 24 horas, G_1 es la fase de duración más variable (unas 11 horas en células humanas) incluso entre células de la misma estirpe y dentro del mismo cultivo (Agami y Bernards, 2002). La duración del resto de las fases es prácticamente constante: la fase S tendría 8 horas, la G_2 4 horas y la fase M 1 hora. En condiciones subóptimas de crecimiento, hay células que cesan por completo su división, entrando en la denominada fase G_0 , en la que permanecen metabólicamente activas pero no proliferativas (Viallard *et al.*, 2001).

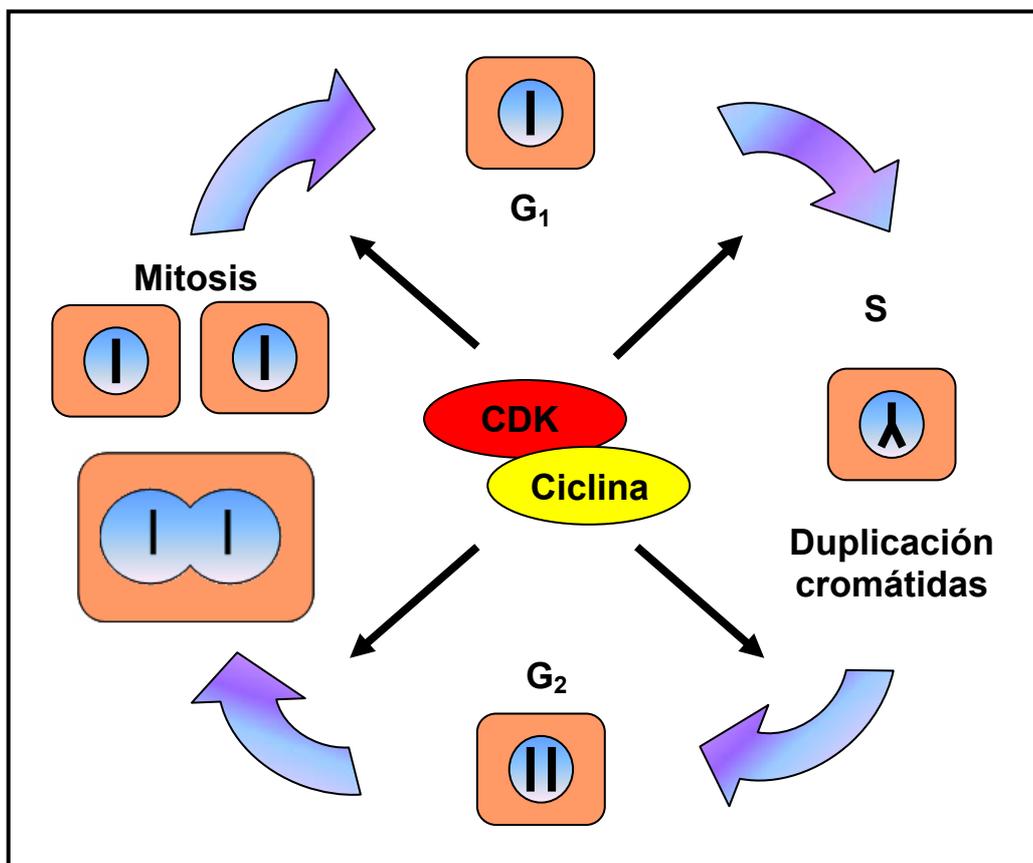


FIGURA 4. EL CICLO CELULAR

7.3. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

Para coordinar las diferentes fases que lo componen, a lo largo del ciclo celular existen una serie de puntos de control denominados puntos de restricción o “check points”, de tal forma que no se puede avanzar en el ciclo hasta que las condiciones no sean apropiadas, o haya inducción por señales extracelulares. En ellos se detectan posibles daños en el ADN, respondiendo la célula con el retraso en su progresión en el ciclo celular o el bloqueo definitivo (Lukas *et al.*, 2004).

Los puntos de control más importantes son dos: el primero se encuentra entre G₁-S, y permite que se repare el ADN dañado antes de ser replicado en la siguiente fase. El segundo se localiza en G₂-M, detecta el ADN que no ha sido replicado y/o ADN dañado, y genera una señal que evita que comience la fase M, permaneciendo la célula en G₂ (Lukas *et al.*, 2004).

Al final de la mitosis existe otro punto de control, donde se evalúa que los cromosomas se alineen correctamente en el huso mitótico, para asegurar la distribución de un juego completo de cromosomas a cada célula hija.

El ciclo celular de todos los eucariotas está controlado por un grupo de subunidades reguladoras llamadas ciclinas y otro grupo de subunidades catalíticas denominadas quinasas dependientes de ciclina (CDK) (Nigg, 2001). Diferentes ciclinas se unen específicamente a diferentes CDK para formar una serie de complejos en fases específicas del ciclo celular y conducir a la célula de un estado del ciclo celular a otro (figura 4).

Las ciclinas son una familia de proteínas activadoras de serín/treonín quinasas, cuya concentración celular oscila en función de la fase del ciclo celular. Tienen una región común conocida como “box de las ciclinas”, que sirve para unir y activar a las quinasas dependientes de ciclinas.

Hasta la fecha se han descrito las siguientes ciclinas: A, B1, B2, C, D1, D2, D3, E, F, G1, G2, H, I, K, T1 y T2. Las ciclinas A y B son ciclinas mitóticas que permanecen estables durante la interfase, pero son rápidamente proteolizadas durante la mitosis, por una vía dependiente de la ubiquitina. Mutaciones en la ciclina A parán las células en la fase G₂. Las ciclinas de la fase G₁ son la C, D y E, y son proteínas de vida corta que se destruyen por la vía de la ubiquitina. La síntesis de ciclina D (D1, D2, D3) está inducida por factores de crecimiento. Cuando se expresa constantemente se le considera como un oncogén, aunque por sí misma no es capaz de transformar una célula. La ciclina F actúa en la transición de la fase G₂ a la fase M, y la ciclina G actúa en respuesta al daño del ADN. La ciclina H, se sabe que forma complejos con la CDK7, para producir una enzima conocida como quinasa activante dependiente de ciclina, que está implicada en la activación de las quinasas CDC2 y CDK2.

Como hemos mencionado, el tránsito a través del ciclo celular depende de la activación secuencial de quinasas dependientes de ciclinas. Existen nueve quinasas dependientes de ciclinas: CDC2 (también llamada CDK1, p34 o MPF -factor promotor de la fase M-), CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8 y CDK9. Cuando son activadas promueven fosforilación de otras proteínas, y son reguladas positivamente por ciclinas, y negativamente por inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Olashaw y Pledger, 2002; Osborne *et al.*, 2004).

La CDC2 se une a las ciclinas A y B. El complejo ciclina B/CDC2 es específicamente requerido para la mitosis, y también hay evidencias de que se requiere para la apoptosis (Castedo *et al.*, 2002). La ciclina B se degrada en la transición de la metafase-anafase causando la inactivación de CDC2, siendo esto necesario para la finalización de la mitosis.

Las ciclinas de la familia D forman complejos con las CDK4, CDK5 y CDK6, comienzan su actividad quinasa en mitad de la fase G₁ y tienen su actividad máxima en la transición de G₁/S (Viallard *et al.*, 2001). Una de las funciones de los complejos ciclina D/CDK4 es fosforilar la proteína del

retinoblastoma (Rb), activando la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S.

La CDK2 se asocia con las ciclinas A y E, y es esencial para la progresión durante la fase G₁/S. Así el complejo ciclina A/CDK2 parece tener un papel en el control de la elongación de la síntesis del ADN, y también se ha visto que tiene un rol en el bloqueo de la apoptosis (Golsteyn, 2005).

La CDK7 se une a la ciclina H y tiene capacidad de fosforilar tanto CDC2 como CDK2. Ni la expresión de la proteína CDK7, ni su actividad varían en el curso del ciclo (Faust *et al.*, 2002).

La regulación del ciclo celular no es la única función de las ciclinas, es más, poseen otras actividades como la regulación de la transcripción, reparación del ADN, diferenciación y apoptosis.

Existe una familia de reguladores negativos, denominados inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, que bloquean la actividad de uno o varios complejos ciclina-CDK. Estas proteínas inhibidoras de las CDK están implicadas en la parada del ciclo celular en respuesta a varias señales antiproliferativas como privación de factores de crecimiento, citoquinas o daño en el ADN. Estos reguladores negativos del ciclo celular son considerados genes supresores de tumores, en los que la pérdida de su función puede contribuir a comportamiento maligno.

Existen dos familias de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas: La familia KIP/CIP incluye tres proteínas p21, p27 y p57, y presenta una más amplia especificidad que la familia INK4, ya que sus miembros interactúan e inhiben la actividad quinasa de los complejos ciclina E/CDK2, ciclina D/CDK4, ciclina D/CDK6, ciclina A/CDK2 y ciclina B/CDC2.

El gen *p21* es una diana transcripcional de *p53* y juega un papel en la senescencia, diferenciación y en la coordinación de reparación del daño del

ADN con detención del ciclo celular. Cuando se activa la proteína p53 estimula la transcripción del gen que codifica para la proteína p21. Esta proteína bloquea el ciclo celular en la transición G₁-S, uniéndose a complejos ciclina-CDK (ciclina D/CDK4 y ciclina E/CDK2), responsables de conducir a la célula a la fase S. Esta parada del ciclo celular permite a la célula reparar el ADN dañado antes de replicarse (Cariou *et al.*, 1998).

Muchas señales antiproliferativas (ausencia de mitógenos/citoquinas, contacto célula-célula) inducen la acumulación de p27 (Clurman y Porter, 1998). Se ha sugerido que p27 puede jugar un importante papel regulador negativo en células quiescentes y en G₁. Los niveles de p27 son regulados inicialmente mediante la degradación proteolítica a través de la ruta de la ubiquitina, a nivel transcripcional (Slingerland y Pagano, 2000).

Las proteínas de la familia INK4 son unos inhibidores que se unen únicamente a CDK4-CDK6 y no a ciclinas, y por lo tanto son específicas para la fase G₁ temprana. Está formada por cinco proteínas, p14, p15 (INK4B), p16 (INK4A), p18 (INK4C) y p19 (INK4D).

A parte de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, existen otros reguladores negativos del ciclo celular que son los formados por los productos de los genes supresores de tumores *p53* y *Rb*, que pueden interactuar y modular las actividades de los complejos ciclina/CDK.

El entendimiento de estos puntos de control es muy importante, ya que nos permite conocer los mecanismos implicados en la proliferación de células normales. Además, las células cancerígenas presentan una incrementada y desregulada proliferación celular debido a alteraciones en los agentes moduladores del ciclo celular (Sandhu y Slingerland, 2000). Por ello, la comparación de las modificaciones existentes entre las células normales y las tumorales, nos da información relativa a la predisposición al cáncer y supone una posible vía de tratamiento (Dash y El-Deiry, 2004).

8. APOPTOSIS

8.1. CONCEPTO

Los tejidos adultos mantienen su homeostasis gracias al equilibrio que existe entre la proliferación y la muerte celular (Potten y Wilson, 2004). Así, la velocidad de crecimiento (proliferación) y la velocidad de muerte deben compensarse mutuamente.

Kerr *et al.* en 1972 propusieron el término “apoptosis” (en griego “caída de las hojas”), que alude al carácter “secuencial y ordenado” de este proceso, para definir a un mecanismo de muerte celular con características morfológicas, bioquímicas y genéticas específicas. La célula se elimina sin producción de respuesta inmunológica y sin interferir en el normal transcurso del tejido circundante (Vaux, 1993). La apoptosis, por lo tanto, se diferencia de la necrosis en que es una forma de muerte celular programada controlada genéticamente.

Desde el punto de vista morfológico, las células apoptóticas se caracterizan por la contracción celular, la ruptura de las uniones por desmosomas, el incremento en la condensación del citoplasma, la condensación de la cromatina en la periferia del núcleo, la posterior fragmentación del mismo, el hinchamiento del retículo endoplasmático y de las mitocondrias y, finalmente, la formación de protuberancias que se separarán dando lugar a la formación de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos o células vecinas.

Las características bioquímicas más destacables de la apoptosis son: la activación de unas proteasas denominadas caspasas, la ruptura del ADN por las uniones interoligonucleosómicas, el desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico, generación de radicales libres, la disminución del potencial de membrana mitocondrial y la pérdida de la asimetría de la membrana citoplasmática, exponiéndose la fosfatidilserina en la superficie celular.

Estas características morfológicas y bioquímicas utilizadas para identificar las células apoptóticas deben emplearse con cierta cautela, y para estudiar la magnitud de la apoptosis es necesario el estudio combinado de varios de los parámetros descritos (Siles *et al.*, 1998). Esto es así ya que las primeras únicamente son visibles durante la fase de ejecución de la apoptosis, un período de tiempo relativamente corto, lo que puede llevar a subestimar la importancia de este fenómeno. Y por otra parte, las características bioquímicas tampoco son estrictamente universales (Ekert *et al.*, 2004) ya que es posible que algunas células apoptóticas no muestren alguno de los cambios descritos.

8.2. MECANISMOS MOLECULARES DE LA APOPTOSIS

En la apoptosis se produce una pugna entre genes que previenen y genes que promueven su inicio (Krajewski *et al.*, 1999; Cory y Adams, 2002). El desencadenamiento de la apoptosis puede ser consecuencia de la alteración de la membrana mitocondrial, en cuyo caso estaremos ante la llamada vía intrínseca, o bien originarse por la unión de determinados ligandos a receptores de la superficie celular, la llamada vía extrínseca.

La vía intrínseca puede desencadenarse por varios factores como el daño en el ADN, la hipoxia o la derivación de factores de crecimiento, y en ella la mitocondria desempeña un papel crucial. Estos desencadenantes modifican el equilibrio entre miembros proapoptóticos (ej. Bax o Bak) y antiapoptóticos (ej. Bcl-2 o Bcl-x), se altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial y se liberan diversos factores proapoptóticos (procaspasas, el factor inductor de apoptosis AIF, endonucleasa G, SMAC/DIABLO, HtrA2/Omi, Apaf-1 y, muy especialmente, el citocromo c). La proteína activadora de caspasas Apaf-1 se une al citocromo c y, en presencia de ATP o dATP, promueve la activación de la procaspasa-9 lo que desencadena la activación de otras caspasas efectoras como la caspasa-3. Entre otros sustratos de la caspasa-3 se encuentra ICAD, un inhibidor de la endonucleasa CAD (Enari *et al.*, 1998) que al liberarse del enzima propicia la actuación de ésta y por tanto la ruptura interoligonucleosómica del ADN.

La mitocondria libera otros componentes con un papel importante en la apoptosis, como la endonucleasa G y el factor activador de proteasas apoptóticas (AIF), que participan en la degradación del ADN tanto de forma dependiente como independiente de caspasas.

La otra vía, la extrínseca, se origina cuando uno de los receptores pertenecientes a la familia de los receptores del TNF (FAS/CD95, TNF-R1, DR-3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR-6, EDA-R, DF-5 y p75NTR) denominados genéricamente receptores de muerte (DR) se une a su ligando. En ellos diferenciamos dominios extracelulares con motivos ricos en cisteína, una región transmembrana y una cola intracitoplasmática en la que destaca el dominio de muerte (DD) (Wallach *et al.*, 1998). Esta unión, conlleva la interacción de los DD con otros dominios DD presentes en proteínas adaptadoras como FADD/MORT1 o TRADD (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 1995). Estas proteínas adaptadoras presentan a su vez dominios efectores de muerte (DED) que interaccionan con los DED de las procaspasas 8 y 10, generándose un complejo multimérico denominado complejo de la señal inductora de muerte (DISC), que permite la activación de las procaspasas y desencadena el comienzo de la apoptosis.

La vía intrínseca y extrínseca no constituyen dos rutas perfectamente aisladas. Así, es posible que la vía extrínseca induzca la liberación del citocromo c mediante la activación de un miembro de la familia Bcl-2, Bid. La proteólisis de Bid, inducida por la caspasa-8, hace que se dirija hacia la mitocondria donde activa a Bax y Bak, miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, desencadenando la liberación de citocromo c.

8.3. APOPTOSIS EN CÉLULAS TUMORALES

Todos los tipos celulares presentan programa apoptótico (Hanahan y Weinberg, 2000), siendo una de las finalidades de la apoptosis la de eliminar células que han sufrido una mutación que les confiere una ventaja proliferativa, por lo que la alteración de la apoptosis parece desempeñar un papel importante en la carcinogénesis. Así, alteraciones en la vía intrínseca se han puesto de

manifiesto en distintos tipos de tumores y también se han asociado con fenotipos resistentes al tratamiento antitumoral (Tsujiimoto, 1989; Strasser *et al.*, 1991; Kirkin *et al.*, 2004). La vía extrínseca también aparece alterada en muchos tumores, debido a la pérdida de expresión o alteración de estos receptores en las células tumorales, lo cual impediría su destrucción por el sistema inmune facilitando la progresión tumoral (Owen-Schaub *et al.*, 1998; Gronbaek *et al.*, 1998; McKnight *et al.*, 2005).

Además, se han descrito alteraciones que afectan a la funcionalidad de la proteína p53, bien por mutación directa del gen, o bien por la alteración de proteínas relacionadas con ella, como Mdm-2 ó NF- κ B (Greten y Karin, 2004).

La proteína Bcl-2 se relaciona con enfermedades linfoproliferativas, y también se sobreexpresa en tumores sólidos de mama, nasofaringe, pulmón, estómago y próstata (Leek *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1993; Ikegaki *et al.*, 1994; Lauwers *et al.*, 1995; Stattin, 1997; Kallakury *et al.*, 1996). Además, la inactivación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 son muy frecuentes en carcinomas de colon (Rampino *et al.*, 1997).

También se ha observado disminución de la actividad de las caspasas, en neuroblastomas (Teitz y cols, 2000); por último, mutaciones que afectan a los receptores de muerte o sus ligandos, son frecuentes en linfomas no Hodgkin (Gronbaek *et al.*, 1998).

Dentro de las neoplasias de origen epitelial mamario se expresan múltiples proteínas moduladoras de apoptosis, lo cual sugiere la complejidad en su regulación (Zapata *et al.*, 1998). Los receptores de estrógenos tienen un papel importante dentro de las neoplasias mamarias. Aproximadamente 2/3 de los cánceres de mama poseen receptores de estrógenos en el momento del diagnóstico, y a menudo responden a intervenciones hormonales como la ablación ovárica, antiestrógenos o inhibidores de la aromatasa, inhibiendo la proliferación celular y promoviendo la apoptosis (Denmeade *et al.*, 1997). Así investigadores como Warri *et al.* (1993), observan que en las células MCF-7

creciendo en cultivo, existe una morfología apoptótica después de la reducción de estrógenos, y también observan evidencias de apoptosis en un 60% de las células tras el uso del antiestrógeno toremifeno durante tres días.

La apoptosis es un proceso normal en el funcionamiento del tracto gastrointestinal, sin embargo, su alteración es un factor común en diversas patologías (Ramachandran *et al.*, 2000). Se localiza de manera mayoritaria en el ápice de las vellosidades, relacionado con la llegada de los enterocitos a la fase terminal de su vida, de manera que llegado dicho momento, se activaría el proceso apoptótico antes o durante la exfoliación de las células, desde la mucosa intestinal hacia el lumen. Además, el proceso de diferenciación de los enterocitos los hace ser más sensibles a la apoptosis frente a determinadas agresiones externas como puede ser la hipoxia (Hinnebusch *et al.*, 2002).

También existen fenómenos de apoptosis en las células madre de la cripta. Este proceso es muy trascendente, ya que de no producirse, se daría lugar a un incremento del número de éstas, aumentando el riesgo de aparición de cáncer (Potten y Wilson, 2004).

9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE TECNOLOGÍA DE MICROARRAYS EN CÁNCER

9.1. CONCEPTO DE MICROARRAY

Un array (colección) de ADN consiste en un gran número de moléculas de ADN dispuestas, de forma ordenada sobre un sustrato sólido, de manera que forman una matriz de secuencias en dos dimensiones (Schulze y Downward, 2001).

El inicio de esta tecnología lo encontramos a finales de los años ochenta, cuando los científicos Fodor, Pirrung, Read y Stryer desarrollaron una tecnología para la determinación y cuantificación del ADN en una muestra. La principal ventaja de esta novedosa tecnología frente a los métodos tradicionales (Northern y Southern), residía en la alta cantidad de material

biológico que se consigue inmovilizar, con lo que se podrían analizar simultáneamente miles de genes. Esta tecnología desembocaría posteriormente en la primera plataforma de microarrays de ADN, denominada GeneChip de Affymetrix.

Los fragmentos de material genético, que se disponen sobre el sustrato sólido, pueden ser secuencias cortas de oligonucleótidos, secuencias de mayor tamaño, ADN complementario (ADNc, sintetizado a partir de ARNm), o bien productos de la reacción en cadena de la polimera (Polymerase Chain Reaction, PCR). Estos fragmentos de ADN de una sola hebra inmovilizados en el soporte se llaman “sondas”. En el primer tipo, las sondas están normalmente formadas por unos 20-25 pares de bases en los ensayos de expresión diferencial, y de hasta 100 pares de bases para análisis de expresión génica. Los clones de ADNc, se depositan en la superficie del array en forma de fragmentos o genes completos, que generalmente provienen de librerías genómicas y pueden tener un tamaño de hasta cientos de kilobases. En el caso de los productos generados por PCR, consisten en fracciones de genes generados por PCR procedentes de clones de ADNc, librerías genómicas ó ARN. La longitud de estos fragmentos suele ser de 200 a 500 pares de bases.

Los microarrays se basan en la complementariedad de bases del ADN. Así, al poner en contacto el array, que porta diferentes sondas, con una muestra dada se producirá una hibridación en las zonas que se complementen. Para detectar esta hibridación entre las sondas de ADN y la muestra problema, es necesario un marcaje previo. Los métodos más usados para el marcaje de las sondas son los químicos o enzimáticos, normalmente a través de los fluoróforos cianina 3 y cianina 5 (Osborn, 2000). El uso de estos fluoróforos permite el análisis de varias muestras en el mismo array, y además posibilita el escaneado de varios marcadores simultáneamente. Otro marcador que está muy en uso son los fluoróforos de la serie Alexa, que muestran mayor fotoestabilidad y proporcionan una señal más clara que los anteriores.

Otra técnica de detección de ácidos nucleicos muy sensible es la que emplea sondas de ADN marcadas con biotina y detectada a través de

conjugados enzimáticos de avidina. Además, para amplificar más la señal, se puede acoplar una segunda enzima a la molécula de avidina y estreptavidina (Osborn, 2000).

También se están desarrollando nuevas técnicas para obviar el marcaje de las sondas. Los principales métodos que se están desarrollando son la detección óptica, la electroquímica (Popovich, 2001) o espectrometría de masas Matrix–assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF).

Los tipos de soporte de los microarrays se suelen dividir en porosos y no porosos. Dentro del primer tipo, los soportes más comúnmente usados son pequeñas porciones de geles, o membranas porosas de nylon o nitrocelulosa. Aquí las interacciones entre el material a inmovilizar y el sustrato sólido suelen ser de carácter no covalente (adsorción física, irradiación ultravioleta o inmovilización electrónica) (Hoheisel, 2001). Los no porosos, o microarrays lisos, suelen usar como material de soporte cristal o cualquier otra superficie como silicio, plástico u oro. En ellas las uniones suelen ser de carácter covalente, realizada mediante procedimientos químicos. Además, se están desarrollando alternativas a los tipos anteriores como la inmovilización del ADN sobre geles de acrilamida o matrices de oro.

El revelado es uno de los procesos clave durante el trabajo con los sistemas basados en microarrays (Hedge y Qi, 2000). Durante este paso se produce la localización de los puntos en los que la reacción ha sido positiva, para ello los sistemas de revelado más comúnmente empleados son los que se basan en la utilización de escáneres láser o la detección mediante cámaras CCD. El fundamento de estos dispositivos es la emisión de un haz de luz de una determinada longitud de onda (excitación), capaz de estimular la liberación de un fotón en una longitud de onda distinta por parte del marcador fluorescente, y la posterior detección de estos fotones mediante un dispositivo recolector.

En este proceso se generan las imágenes correspondientes al patrón de reacciones positivas y negativas que se han producido en la superficie del chip. Los datos son adquiridos como una imagen con puntos de diferente intensidad que deben ser interpretados y transformados. A este proceso se le puede denominar como procesamiento de las imágenes, y en él se procede a la interpretación de las intensidades detectadas en cada uno de los puntos en los que la reacción de afinidad ha sido positiva, para ello se usa un hardware de detección.

Posteriormente a la detección de la imagen, los datos pueden ser almacenados y presentados en diferentes formatos, aunque normalmente se remiten al investigador en forma de imagen en formato TIFF de 16 bits.

9.2 UTILIDADES DE LOS MICROARRAYS

En la actualidad, esta tecnología tiene aplicación en campos tan diversos como (Clarke *et al.*, 2001):

- Análisis de la expresión génica: se puede determinar cual es el patrón de expresión génica, además de cuantificar el nivel de expresión de manera simultánea para un elevado número de genes. Esto nos permite realizar estudios comparativos de activación entre genes de tejidos sanos y enfermos.

- Detección de mutaciones y polimorfismos: posibilitan el estudio de todos los posibles polimorfismos y la detección de mutaciones en genes complejos.

- Secuenciación: se han diseñado microarrays para secuenciación de fragmentos cortos de ADN. No existe aún ninguno que permita secuenciar de novo secuencias largas de ADN, aunque se pueden utilizar como controles de calidad.

- Seguimiento de terapia: permite valorar rasgos genéticos que pueden tener incidencia en la respuesta a una terapia determinada.

- Medicina preventiva: el conocimiento y posible diagnóstico de ciertos caracteres genéticos asociados a determinadas patologías permitiría una prevención de las mismas antes de que aparezcan los síntomas.

- Screening y toxicología de fármacos: se analizan cambios de expresión génica durante la administración de un fármaco. También se usa para la localización de nuevas posibles dianas terapéuticas y los efectos toxicológicos asociados.

- Diagnóstico clínico: posibilitan la identificación rápida de los patógenos empleando determinados marcadores genéticos.

9.2.1. ESTUDIO DE PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA COMO PRONÓSTICO DE RESPUESTA A UN TRATAMIENTO EN CÁNCER

Una de los principales objetivos en el campo de la investigación sobre el cáncer es el estudio de marcadores que puedan predecir la respuesta a un tratamiento determinado. Esta respuesta viene mediada por la expresión de un alto número de genes que, sin embargo, pueden ser estudiados mediante los microarrays de ADN.

Se conocen múltiples ejemplos del empleo de patrones de expresión como predictores de respuesta a tratamiento. Así, Rosenwald *et al.* (2002) han estudiado mediante microarrays pacientes con linfoma B difuso de células grandes, confirmando la existencia de cinco patrones de expresión diferentes, cada uno con pronósticos diferenciales. Características como el patrón de tipo centro germinal se asoció a un buen pronóstico, mientras que la expresión de genes proliferativos se asoció a un mal pronóstico. Además, todos los pacientes recibieron el tratamiento estándar de este tipo de linfoma, por lo que los resultados de expresión también han podido ser utilizados para elaborar predictores de respuesta a dicho tratamiento.

También existen diversos estudios en cáncer de mama (Sorlie *et al.*, 2001; van't Veer *et al.*, 2002) que coinciden en señalar al estatus del receptor

de estrógenos (RE) como el elemento de más impacto en el perfil de expresión del cáncer de mama. También en este tipo de cáncer, se han desarrollado estudios de cambios en los perfiles de expresión génica como respuesta a un determinado tratamiento, identificando genes claramente implicados con la respuesta a fármacos (Jazaeri *et al.*, 2002).

En cáncer de pulmón se ha conseguido, usando técnicas de microarrays, el establecimiento de diferentes grupos de pronóstico. Así, el adenocarcinoma de pulmón se dividen el tres subgrupos, siendo el de peor pronóstico aquel que expresa genes de diferenciación neumocítica y actividad proliferativa (Virtanen *et al.*, 2002).

Además, el uso de estas técnicas permitirá, en el futuro, el uso de terapias individualizadas frente al cáncer. En cáncer de mama y melanomas se ha demostrado que tumores distintos procedentes del mismo paciente presentan patrones de expresión más similares que si comparamos el mismo tipo de muestra procedente de diferentes pacientes (Sotiriou *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002).

9.2.2. USO DE MICROARRAYS PARA LA ELABORACIÓN DE UNA TAXONOMÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

Otra gran utilidad que ofrecen los arrays es su empleo para clasificar cualquier tipo de tumor de manera rápida y efectiva, con el objetivo final de elaborar una clasificación de tumores que sea universal (Wooster, 2000). Así, cuanto mayor sea nuestra capacidad para clasificar un tumor de forma clara, tendremos información más fidedigna referente al comportamiento de ese cáncer (resistencia a tratamientos, metástasis, etc.) y mayores serán las posibilidades de curación.

Además, la tecnología de microarrays puede usarse para establecer asociaciones entre un tumor y su línea celular de origen, ayudando en el pronóstico, ya que la proporción de genes que aparece diferencialmente expresada entre ambos tipos es de, aproximadamente, sólo un 5% (Miller *et al.*,

2002). De hecho, la clasificación taxonómica del cáncer debería basarse en los tipos histológicos normales en los que se origina. Por ejemplo, esta relación está demostrada en leucemias y linfomas (Goulb *et al.*, 1999; Ship *et al.*, 2002), y en tumores primarios de mama, donde existen dos patrones de expresión semejantes a los encontrados en líneas celulares derivadas de los linajes basales y luminales (Sorlie *et al.*, 2001).

9.3. PERSPECTIVAS

Como hemos visto anteriormente, el futuro del uso de microarrays aplicados al campo del cáncer pasa por la predicción de los efectos que determinados estímulos podrían tener sobre las células cancerosas y por una mejor clasificación de los diferentes tipos de cáncer.

Con todo esto, el uso de esta metodología todavía ofrece una serie de limitaciones que en el futuro deberán ser superadas. A pesar de los esfuerzos que se están realizando para la estandarización de los protocolos de ensayo, quizás la desventaja principal de esta técnica resida en la variabilidad de los resultados obtenidos en ensayos similares, lo cual imposibilita la obtención de dispositivos clínicos fiables. A ésta limitación se le unen otras como son la escasa difusión de esta tecnología, el elevado coste de inversión o la existencias de kits comerciales que rara vez se pueden personalizar a las necesidades del investigador.

En conclusión, el mundo del diagnóstico molecular es un campo que avanza muy rápidamente. El análisis de la expresión global mediante técnicas de microarrays nos permite conocer, simultáneamente, el estado de miles de genes de células enfermas. Todo esto, nos podrá revelar una valiosa información de la patología de la enfermedad, su progresión, resistencia a tratamientos y respuestas a microambientes celulares y, finalmente, llevarnos a una mejora en el diagnóstico prematuro y desarrollo de innovadoras terapias contra el cáncer (Macgregor y Squire, 2002).

10. NUEVOS FÁRMACOS SELECTIVOS FRENTE A DIANAS MOLECULARES DE APOPTOSIS Y CICLO CELULAR

El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en los procesos de apoptosis y ciclo celular está permitiendo diseñar nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a modularlos y facilitar, así, el tratamiento del cáncer. Ya existen fármacos ensayados en fase clínica que actúan sobre dianas reguladoras de estos procesos.

Para comprender el papel de la apoptosis y el ciclo celular en la carcinogénesis y buscar estrategias adecuadas de tratamiento, es necesario conocer los mecanismos moleculares que subyacen tras esta modalidad de muerte celular. El éxito de estas estrategias con actividad selectiva sobre dianas moleculares de la apoptosis y el ciclo celular permitiría la obtención de nuevos agentes antitumorales más específicos de pacientes de cáncer, con la consiguiente mejora en su calidad de vida.

10.1. FÁRMACOS INDUCTORES DE APOPTOSIS

No sólo la proliferación celular participa en la carcinogénesis, sino que la inhibición de los procesos de muerte celular, y concretamente de la apoptosis, también parece desempeñar un papel destacado. No obstante, la supresión de la apoptosis por sí misma no es suficiente para la transformación tumoral (Hanahan y Weinberg, 2000). Son muy amplias y variadas las estrategias que se pueden estudiar dentro de este campo. Así, para actuar sobre la apoptosis a nivel de bcl-2 se han desarrollado imitadores de unos de sus antagonistas directos denominado BH3, con gran poder antineoplásico (Baell y Huang, 2002).

Otra diana muy estudiada son los receptores de quimioquinas (MCP) que tienen capacidad para inducir apoptosis en muchos tipos celulares. Uno de los más estudiados es el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), prototipo de

inductor de apoptosis (Simstein *et al.*, 2003).

Existen pequeñas moléculas que disparan una salida programada del ciclo celular e inducen apoptosis, por lo que tienen un potencial clínico inmenso para el tratamiento del cáncer. Recientemente una clase de antibióticos conocidos como inhibidores de bombas V-ATPasa han mostrado una alta selectividad citotóxica sobre una gran variedad de líneas celulares cancerígenas. Así, la apoptolidina induce apoptosis en células transformadas con el oncogen *E1A*, mientras que no muestra ningún efecto sobre células normales (Kim *et al.*, 1997).

10.2. FÁRMACOS MODULADORES DEL CICLO CELULAR

10.2.1. INHIBIDORES DE QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINAS

La alteración en la regulación del ciclo celular es una propiedad presente en muchos tipos de cáncer. Por ello, se han desarrollado diferentes fármacos que actúan modulando estas alteraciones. Ningún grupo de proteínas reguladoras está más íntimamente ligada a la progresión de ciclo celular como las quinasas dependientes de ciclinas.

Los análogos de purinas representan un grupo de inhibidores específicos de las quinasas dependientes de ciclinas con gran potencial. Una de ellas es la olomucina, un potente inhibidor de las CDK1, 2 y 5 pero relativamente inerte sobre CDK4 y 6, que produce inhibición de la transición G_1/S y $G_2/M/G_1$, deteniendo a las células en las fases G_1 y G_2 (Meijer *et al.*, 1997).

El desarrollo de inhibidores de CDK basados en una estructura flavonoide proviene de la observación de los efectos antiproliferativos que tiene

el flavonoide natural quercetin (Sielecki *et al.*, 2000). El flavopiridol detiene a las células en las transiciones G₁/S y en G₂/M, actuando sobre la actividad proteín-quinasa de las CDK1, 2 y 4, mostrando un gran efecto antiangiogénico (Senderowicz, 1999).

Un nuevo tipo de inhibidores son las paullonas, que surgen de la búsqueda de moléculas que pudieran tener las mismas propiedades antiproliferativas que el flavopiridol (Zaharevitz *et al.*, 1999). La kenpaullona inhibe a los complejos ciclina B/CDK1, ciclina A/CDK2, ciclina E/CDK2, y p25/CDK5, mostrando una CI₅₀ en un rango de 0.5-10 µM. Esta actividad inhibidora da lugar, en último lugar, a una parada de las células en la fase G₁.

La butirolactona fue identificada como inhibidora de la ciclina B/CDC2 y es relativamente inerte sobre CDK4 y PKC, induciendo parada de las células en G₂/M al bloquear la fosforilación de las histonas (Kitigawa *et al.*, 1994).

10.2.2. INHIBIDORES DE LA PROTEINA QUINASA C

La proteína quinasa C (PKC) tiene un papel muy importante en la proliferación y diferenciación celular. La estaurosporina es un producto natural inhibidor relativamente específico de la PKC, que también muestra inhibición sobre ciclina A/CDK2 y ciclina D/CDK4 (Gadbois *et al.*, 1992). Se ha observado que este compuesto produce la parada de las células normales en la fase G₁, mientras que es relativamente inefectivo en la detención del ciclo celular de células tumorales (Bruno *et al.*, 1992), pudiendo ser útil su uso para proteger células normales cuando se usen fármacos que tengan efectos citotóxicos sobre células proliferativas (Chen *et al.*, 2000). El UCN-01 es un derivado de la estaurosporina y, además de inducir apoptosis, produce parada en la fase G₁ al inhibir directamente las CDK1, 2 y 4 (Fuse *et al.*, 2005).

10.2.3. INHIBIDORES DE LAS PROTEÍNAS TIROSINA QUINASAS

Las proteínas tirosina quinasas (PTKs) se encuentran activas de forma constitutiva en muchos tipos de cáncer, lo cual suscita un gran interés en la búsqueda de inhibidores de las mismas (Jimeno, 2005). La lavendustina A ha sido identificada como un potente inhibidor de varios tipos de PTKs, incluyendo el receptor de EGF (Cammisuli *et al.*, 1996). Sin embargo, la relación entre las propiedades antiproliferativas de este compuesto y su capacidad inhibitoria de las PTKs es cuestionable, ya que también se ha mostrado como un inhibidor moderadamente efectivo de la polimerización de tubulina.

10.2.4. INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA

El proteosoma tiene un papel clave en la regulación positiva y negativa del ciclo celular, ya que existe una larga lista de proteínas esenciales para un desarrollo normal del ciclo celular que son reguladas por éste. El PS-341 (bortezomib, Velcade[®]), autorizado para combatir el mieloma múltiple, inhibe de forma específica a la fracción 20S del proteosoma, acumulando ciclinas A y B, con lo que detiene las células en las fases S y G₂, además de inducir apoptosis (Adams y Kauffman, 2004).

La epoxomicina fue aislada de un actinomiceto y tiene actividad antitumoral frente al melanoma B16 (Hanada *et al.*, 1992) demostrando una gran especificidad hacia el proteosoma. El agente antimetabólico aclacinomicina A es el primer inhibidor del proteosoma no peptídico que se describió (Figueiredo-Pereira *et al.*, 1996), y muestra una discreta selectividad sobre el proteosoma 20S.

10.2.5. INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD HISTONA DESACETILASA

La metilación, acetilación, fosforilación o ubiquitinación de las histonas induce cambios conformacionales en el ADN que se asocian a ellas, lo que sirve para modular el reconocimiento de ciertos promotores del ADN por parte de factores de transcripción. Las partes con bajo nivel de acetilación del genoma son generalmente poco transcritas, sugiriendo que la modificación covalente de las histonas es un método para regular la transcripción de proteínas.

La tricostatina, una pequeña molécula inhibidora de la desacetilación de las histonas, detiene a las células en las fases G₁ y G₂ del ciclo celular y provoca un aumento en los niveles celulares de ciclina A (Herold *et al.*, 2002). La trapoxina es también un potente inhibidor de la desacetilación de histonas que muestra competitividad con la tricostatina, sugiriendo que ambas moléculas comparten el mismo modo de acción.

La inhibición de la desacetilación de histonas se considera actualmente una potente estrategia terapéutica contra el cáncer (Schmidt *et al.*, 1999). Así, el MS-275 induce acumulación de p21 y detención del ciclo celular (Ryan *et al.*, 2005), y el depsipéptido detiene las células en G₁ y G₂, siendo muy usado frente a linfomas (Piekarz *et al.*, 2001).

10.2.6. MOLÉCULAS QUE ACTÚAN SOBRE EL CITOESQUELETO

Los microtúbulos, que muestran una gran actividad durante la mitosis, son otra diana de una gran cantidad de moléculas que producen parada de las células en la fase M. La elongación y contracción de los microtúbulos buscando la unión a los cinetocoros tipifica el comportamiento mitótico de una célula. La estabilización o desestabilización de los microtúbulos en esta etapa crítica puede servir para provocar la parada del ciclo celular. Una molécula clásica de unión a microtúbulos es la colchicina, que despolimeriza a los microtúbulos citosólicos a alta concentración, mientras que a baja concentración inhibe esa

despolimerización, consiguiendo en ambos casos la parada del ciclo celular. Cabe destacar, las moléculas epotilona A/B, discodermolide y paclitaxel (Taxol[®]) que compiten con la colchicina por su diana en los microtúbulos, pero por el contrario inducen detención del ciclo celular mediante la estabilización de tubulina.

Además, un gran número de moléculas producen arresto del ciclo celular mediante su interacción con actina. Así, las dolastatinas son un grupo de moléculas de unión a actina que producen detención en la fase G₂/M al provocar la reorganización de los filamentos (Posey y Bierer, 1999).

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en el presente trabajo de investigación han sido:

- Analizar la actividad citotóxica de nuevos *O,O*-Acetales y *O,N*-Acetales cíclicos y acíclicos sobre líneas celulares normales y tumorales de estirpe epitelial mamaria y de colon.

- Evaluar el efecto de los compuestos más activos sobre la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular.

- Valorar la capacidad de estos compuestos de inducir apoptosis y/o necrosis en las 4 líneas celulares empleadas.

- Analizar las modificaciones en la expresión génica producida por los fármacos seleccionados, con objeto de esclarecer las dianas moleculares sobre las que actúan.

- Establecer las posibles diferencias en los mecanismos de acción de estos fármacos sobre las células de estirpe mamaria con relación a las de colon.

- Valorar el efecto lesivo de los compuestos sobre las células normales frente a las tumorales.

- Proponer los fármacos más interesantes para un posible uso en ensayos, preclínicos y clínicos, de tratamiento de cáncer de mama y/o colon.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. LÍNEAS CELULARES

Para el desarrollo de los diferentes ensayos, seleccionamos las líneas celulares IEC-6 (referencia ATCC nº CTR-1592), procedente de epitelio del yeyuno de rata, la HT-29 (referencia ATCC nº HTB-38), derivada a partir de un adenocarcinoma de colon humano, la MCF-7 (referencia ATCC nº HTB-22), establecida a partir de un adenocarcinoma de mama metastático, y la MCF-10A (referencia ATCC nº CRL-10317), una línea celular mamaria no tumoral inmortalizada. Todas las líneas celulares fueron obtenidas a través del servicio de cultivos celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

1.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Los cultivos se mantuvieron en frascos estériles tipo Falcon (de 25 ó 75 cm², Sarstedt), en estufa (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Electrón Corporation, USA) a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. La manipulación de los cultivos se realizó, bajo condiciones de esterilidad, en cabina de flujo laminar (Aura Vertical S.D.4, Bio Air Instruments, Italy)

Para el cultivo se utilizaron diferentes medios, según la línea celular:

- Para las líneas celulares MCF-7 y HT-29, se usó el medio Dubelcco`s Eagle modificado (DMEM) (Gibco, USA) (13,37 gr de medio base), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), inactivado en calor húmedo a 56°C durante 30 minutos. El medio fue tamponado con 27 ml de NaHCO₃ al 7,5% y 10 ml de buffer Hepes 1M pH 7,2 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), y suplementado con 40 mg/l de gentamicina (Antibióticos S.A), 500 mg/l de ampicilina (Antibióticos S.A), 10 ml

de L-glutamina 200 mM (Sigma Chemical co., St. Louis, MO, USA), y agua bidestilada, c.s.p. hasta 1000 ml.

- Para la línea celular IEC-6, se usó el medio anterior, reduciendo el suero bovino fetal al 5% y suplementado con 0,1 IU/ml de insulina de páncreas bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

- Para la línea celular MCF-10A, se usó el medio DMEM-F12 1:1(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), suplementado con 5% de suero de caballo descomplementado (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 10 µg/ml de insulina de páncreas bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 100 ng/ml de toxina colérica (cedida por el servicio de cultivos celulares del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada), 0.5 µg/ml de hidrocortisona (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y 100 µg/ml penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Todos los medios de cultivo, una vez preparados, fueron filtrados con filtros estériles de 0,22 µm Millex (Millipore, France) y conservados en frascos estériles.

Los diferentes cultivos, conforme alcanzaban la confluencia, tuvieron que ser sembradas en nuevos Falcons. Para ello:

- Se desechó el medio de cultivo y lavamos dos veces con PBS (Tampón salino de fosfato, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), con un volumen de 0,2 ml/cm². De esta manera, eliminamos todo el suero que inhibe la acción de la tripsina.

- Se añadió 0,1 ml/cm² de tripsina-EDTA previamente calentada hasta 37°C (0,25% Tripsina, 0,02% EDTA en PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Se cubrió la superficie de células durante unos 15-30 segundos.

Posteriormente, se retiró casi todo el volumen de tripsina dejando tan solo unas gotas.

- Se incubó durante 15 minutos a 37°C en estufa de CO₂.
- Se le añadió 0,1-0,2 ml/cm² de medio de cultivo fresco y se dispersaron los agregados celulares con ayuda de una pipeta pasteur.

- Tras esto, se centrifugó a 600 x g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en su respectivo medio completo.

- Posteriormente, se realizó un conteo con cámara de Neubauer (Zuzi Corp., France), y se diluyó hasta obtener una concentración de 0,5 x 10⁶ células/ml.

- Por último, se sembraron en nuevos frascos tipo Falcon.

1.3. CONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

Los cultivos celulares, para su almacenamiento, fueron congeladas en nitrógeno líquido a -196°C. Para ello, se dispusieron en medio de congelación constituido por suero fetal bovino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), inactivado en calor húmedo a 56°C durante 30 minutos, y dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) al 10%. Para ello:

- Las células fueron despegadas de los frascos de cultivo mediante el protocolo descrito anteriormente.

- El botón celular se resuspendió en medio de congelación a razón de 0,5 x 10⁶ células/ml.

- Se introdujeron inmediatamente en criotubos (Nunc, USA) que fueron llevados al Banco de Líneas Celulares de Andalucía del Hospital Clínico San Cecilio, donde se llevó a cabo una congelación progresiva que garantiza una mayor viabilidad de los cultivos celulares. Se usó un congelador Kryo 360M-1.7 (Planer PLC, UK) y el protocolo de congelación que aparece en las figuras 5 y 6, alcanzando una temperatura final de -130°C.

- Por último, los criotubos fueron introducidos en contenedores de nitrógeno líquido.

```

Start temp +004.0 C
No seeding selected
#01 hold 15 mins 00 secs
#02 -01.00 C/min to -005.0 C sample
#03 -03.00 C/min to -012.0 C sample
#04 -05.00 C/min to -014.0 C sample
#05 -07.50 C/min to -020.0 C
#06 -06.50 C/min to -025.0 C
#07 hold 02 mins 00 secs
      8 +03.00 C/min to -020.0 C
#09 hold 02 mins 00 secs
#10 -01.00 C/min to -050.0 C sample
#11 -10.00 C/min to -130.0 C sample

```

FIGURA 5. PROTOCOLO DE CONGELACIÓN

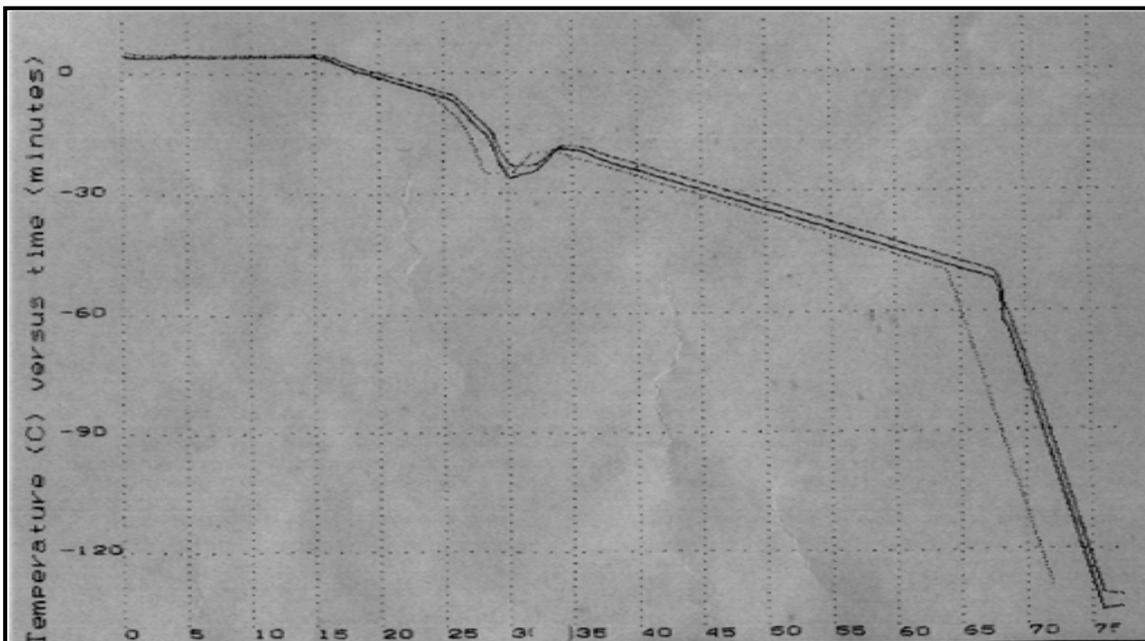


FIGURA 6. CURVA DE CONGELACIÓN

1.4. DESCONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

La descongelación de los criotubos, con los cultivos celulares, también se realizó en del Banco de Líneas Celulares de Andalucía del Hospital Clínico San Cecilio, de manera progresiva en un congelador Kryo 360M-1.7 (Planer PLC, UK) mediante el siguiente patrón de descongelación (figuras 7 y 8):

```

#U1 +10.00 C/min to -110.0 C sample
#02 +01.00 C/min to -050.0 C
#03 hold 02 mins 00 secs
#04 +03.00 C/min to -025.0 C sample
#05 +07.50 C/min to -020.0 C sample
#06 +05.00 C/min to -014.0 C sample
#07 +03.00 C/min to -012.0 C
#08 hold 02 mins 00 secs
#09 +01.00 C/min to -005.0 C sample
  0 +03.00 C/min to +004.0 C sample
#11 +01.00 C/min to +015.0 C sample

```

FIGURA 7. PATRÓN DE DESCONGELACIÓN

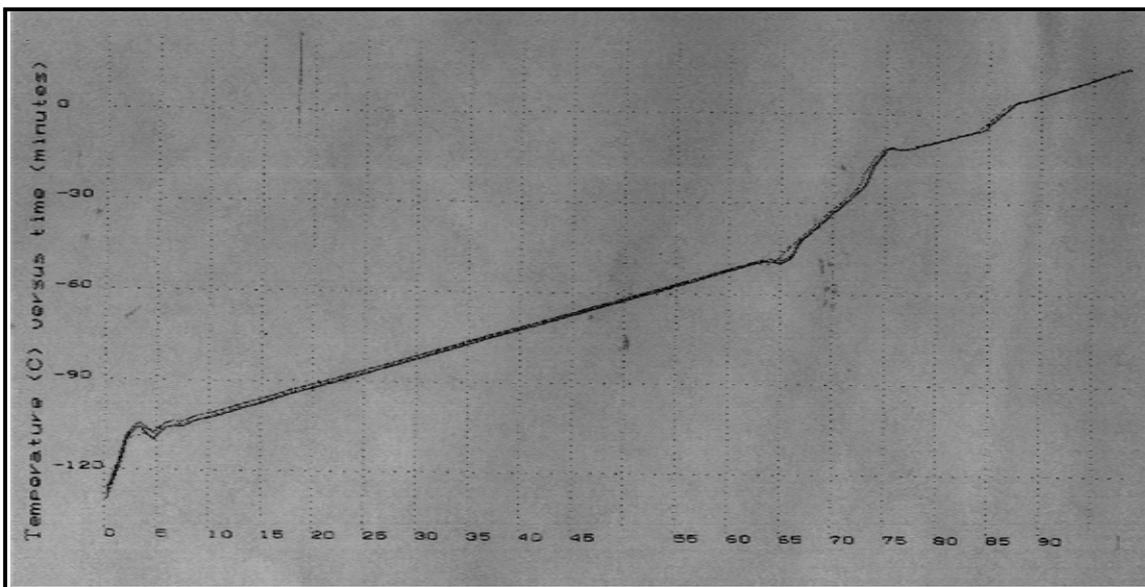


FIGURA 8. CURVA DE DESCONGELACIÓN

A continuación:

- Se limpió externamente el criotubo con alcohol al 70% y se abrió en condiciones de esterilidad.

- Tras ello, se resuspendieron las células en medio de cultivo estéril a 37°C. Se lavaron dos veces con PBS para eliminar los restos de DMSO.

- Se resuspendió el botón de células en medio de cultivo estéril completo y, tras realizar un conteo con cámara de Neubauer, se diluyeron hasta obtener una concentración de 2×10^4 células/ml.

- Por último, se sembraron en nuevos frascos.

2. FÁRMACOS

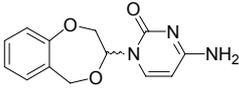
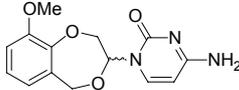
Todos los compuestos, usados en los diferentes experimentos, fueron diseñados y sintetizados en colaboración con el grupo de investigación dirigido por los profesores Dr. Antonio Espinosa y Dr. Joaquín Campos del departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Granada.

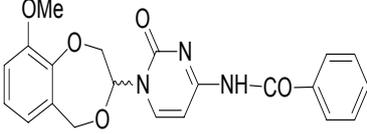
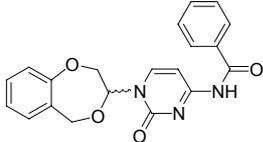
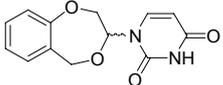
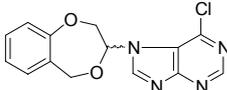
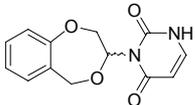
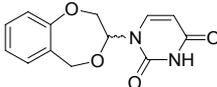
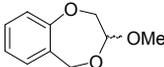
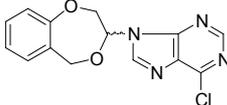
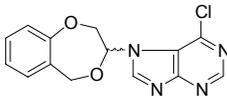
Éstos fueron disueltos en DMSO a la concentración deseada para cada experimento, de manera que la cantidad final del disolvente en el medio de cultivo no superó el 1% en ningún caso. Del mismo modo, utilizamos controles de DMSO de forma independiente y a las mismas concentraciones que los fármacos a los que diluye. Los efectos fueron eliminados de los resultados globales obtenidos con las técnicas realizadas en nuestro estudio, de tal modo que dichos resultados corresponden exclusivamente a la acción de los compuestos.

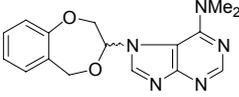
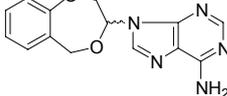
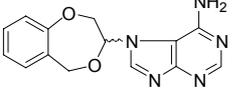
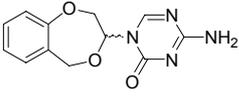
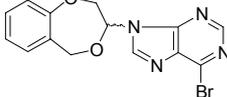
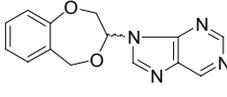
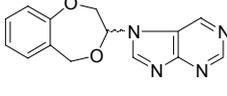
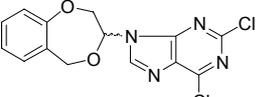
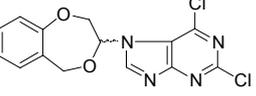
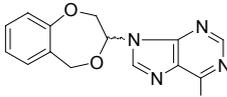
Los compuestos que se utilizaron se clasificaron en 8 familias:

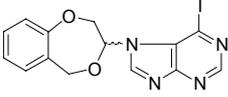
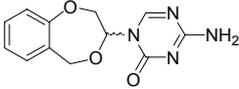
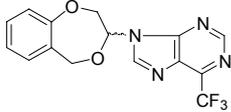
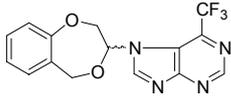
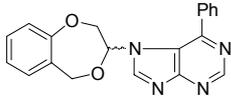
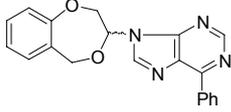
2.1. FAMILIA 1: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZODIOXEPÍNICA (tabla 1):

TABLA 1. Cl_{50} DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA "O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZODIOXEPÍNICA", EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|--------|------------------------|--|
| TRE | 259,26 |  |
| MOC | 289,28 |  |

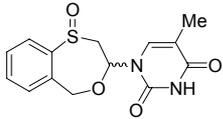
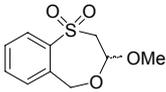
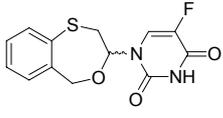
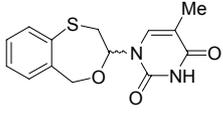
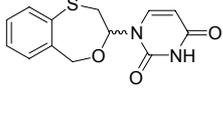
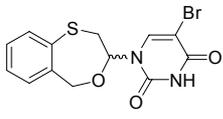
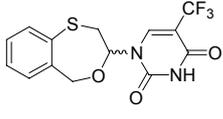
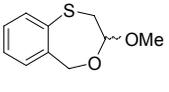
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|--------------|------------------------|--|
| DAVID | 393,37 |  |
| ESB-974BS/AS | 362,36 |  |
| ESB-930A | 260,25 |  |
| GP-1 | 302,50 |  |
| GP-2 | 260,00 |  |
| GP-3 | 260,00 |  |
| MDG-752A | 180,20 |  |
| MB-90A | 302,72 |  |
| MB-90B | 302,72 |  |

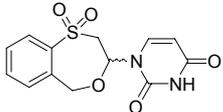
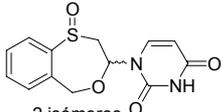
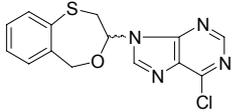
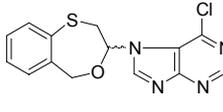
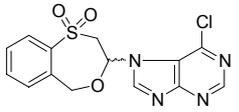
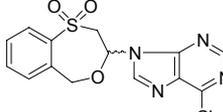
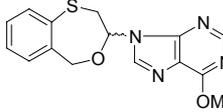
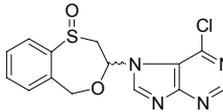
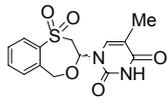
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|----------|------------------------|--|
| MB-III A | 311,14 |  |
| MB-III B | 283,11 |  |
| MB-III C | 283,11 |  |
| KS-89C | 260,13 |  |
| BDM-69C | 347,13 |  |
| KS-70A | 300,13 |  |
| KS-70B | 300,13 |  |
| KS-47A | 337,02 |  |
| KS-47B | 337,02 |  |
| BDM-185A | 394,03 |  |

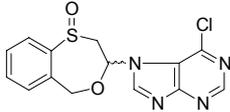
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|---------|------------------------|--|
| KS-193B | 394,03 |  |
| KS-89C | 261,26 |  |
| KS-171C | 336,27 |  |
| KS-171D | 336,27 |  |
| KS-214D | 344,37 |  |
| KS-214B | 344,37 |  |

2.2. FAMILIA 2: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 4,1-BENZOXATIEPÍNICA (tabla 2):

TABLA 2. Cl_{50} DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA “O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 4,1-BENZOXATIEPÍNICA”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

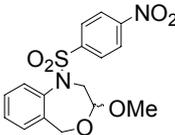
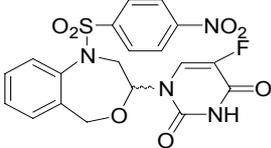
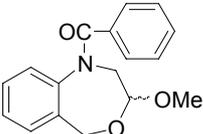
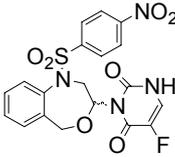
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|--------|------------------------|--|
| MN-56B | 306,34 |  |
| MN-64B | 228,27 |  |
| MN-28D | 294,30 |  |
| MN-40C | 290,34 |  |
| MN-44B | 292,37 |  |
| MN-48C | 355,21 |  |
| MN-52B | 344,04 |  |
| MN-24B | 196,26 |  |

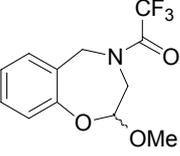
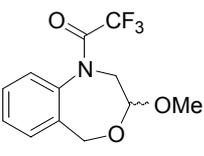
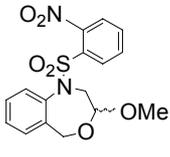
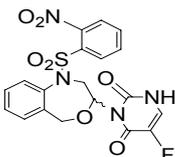
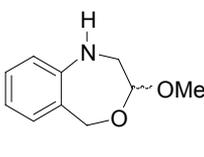
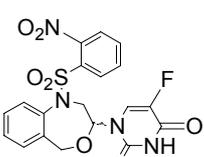
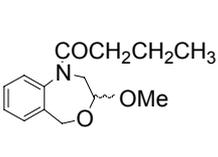
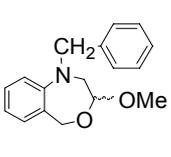
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|---------|------------------------|--|
| MN-76C | 308,31 |  |
| MN-72C | 292,31 |  2 isómeros |
| MN-84D | 318,78 |  |
| MN-116B | 318,78 |  |
| MN-80C | 350,78 |  |
| MN-92B | 350,78 |  |
| MN-96B | 314,36 |  |
| MN-88C | 334,78 |  2 isómeros |
| MN-170B | 322,34 |  |

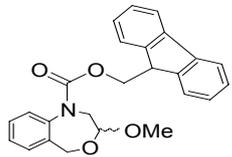
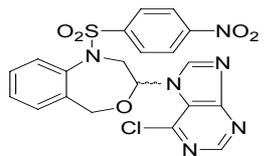
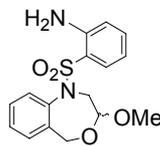
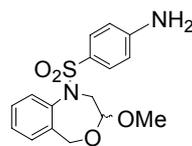
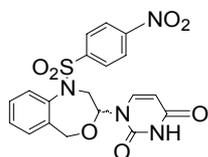
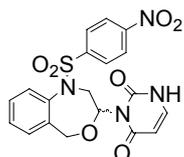
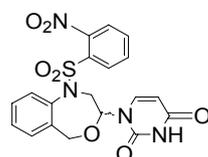
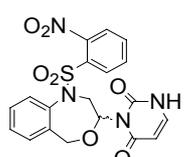
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|--------|------------------------|--|
| MN-88B | 334,78 |  |

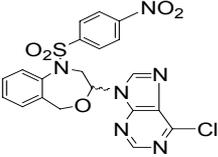
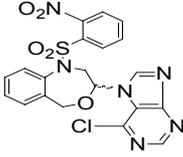
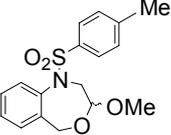
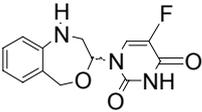
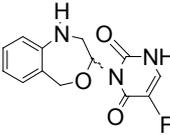
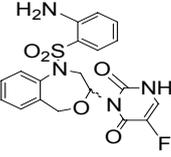
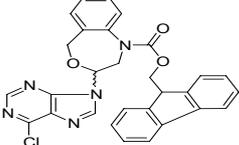
2.3. FAMILIA 3: O,O-ACETALES Y O,N-CETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZOXAZEPÍNICA (tabla 3):

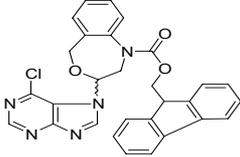
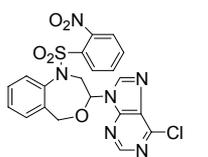
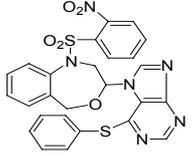
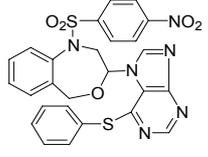
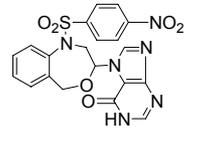
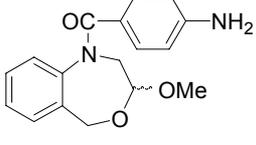
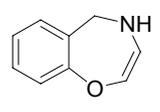
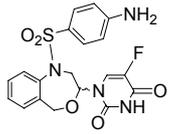
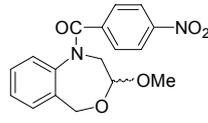
TABLA 3. Cl₅₀ DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA “O,O-ACETALES Y O,N-CETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZOXAZEPÍNICA”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

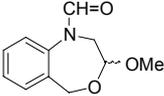
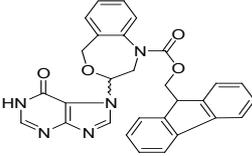
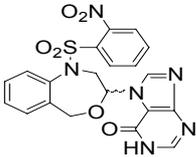
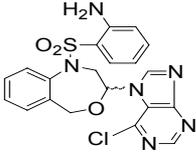
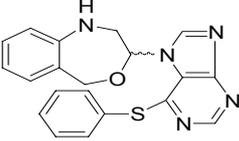
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|----------|------------------------|--|
| MDG-430A | 364,37 |  |
| MDG-612B | 462,40 |  |
| MDG-616A | 283,32 |  |
| MDG-612C | 462,40 |  |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|----------|------------------------|--|
| MDG-292A | 275,23 |  |
| MDG-540A | 275,23 |  |
| MDG-206A | 364,37 |  |
| MDG-607F | 462,40 |  |
| MDG-484D | 179,22 |  |
| MDG-607B | 462,40 |  |
| MDG-530B | 249,31 |  |
| MDG-804B | 269,34 |  |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|-----------|------------------------|--|
| MDG-791D | 401,46 |  |
| MDG-798D | 486,89 |  |
| MDG-858B | 334,39 |  |
| MDG-872B | 334,39 |  |
| MDG-850B2 | 444,41 |  |
| MDG-850C | 444,41 |  |
| MDG-864B | 444,41 |  |
| MDG-864C | 444,41 |  |

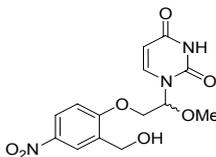
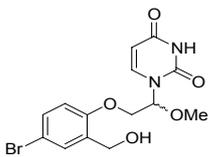
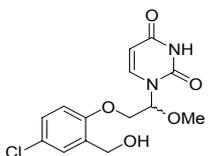
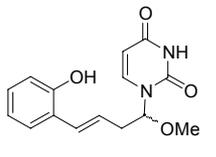
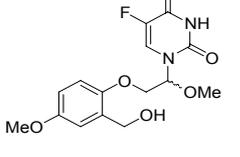
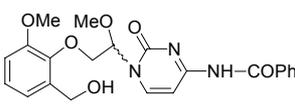
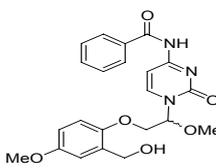
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|----------|------------------------|--|
| MDG-878A | 432,43 |  |
| MDG-798C | 486,89 |  |
| MDG-884B | 486,89 |  |
| MDG-904B | 333,4 |  |
| MDG-924C | 277,25 |  |
| MDG-936B | 277,25 |  |
| MDG-892A | 432,43 |  |
| MDG-828B | 523,97 |  |

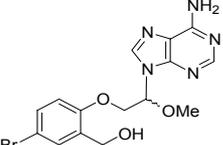
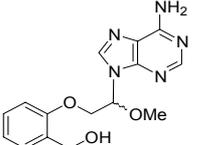
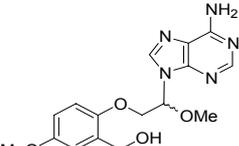
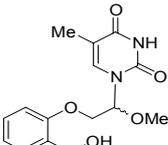
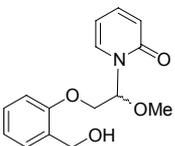
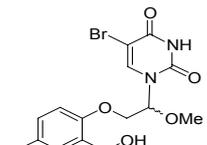
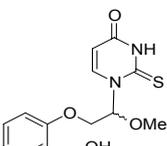
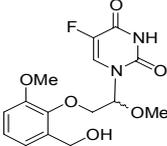
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|-------------|------------------------|--|
| MDG-828C | 523,97 |  |
| MDG-884A2-2 | 486,89 |  |
| MDG-942B | 560,61 |  |
| MDG-958A | 560,61 |  |
| MDG-798D2 | 468,44 |  |
| MDG-964B | 298,34 |  |
| MDG-310A | 147,17 |  |
| MDG-930B2 | 432,43 |  |
| MDG-946C | 328,32 |  |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|-----------|------------------------|--|
| MDG-918C2 | 207,23 |  |
| MDG-828F | 505,18 |  |
| MDG-884B2 | 486,89 |  |
| MDG-953C3 | 456,91 |  |
| MDG-940C | 375,45 |  |

2.4. FAMILIA 4: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL SALICÍLICO (tabla 4):

TABLA 4. Cl_{50} DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA “O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL SALICÍLICO”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|-----------|------------------------|--|
| ESB-946C | 337,28 |  |
| ESB-948A | 371,18 |  |
| ESB-950C | 326,73 |  |
| ESB-954B | 288,11 |  |
| ESB-912C | 340,31 |  |
| COOP | 425,43 |  |
| ESB-966D1 | 425,16 |  |

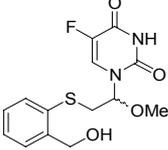
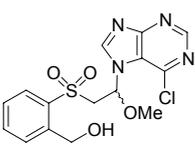
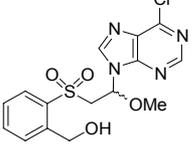
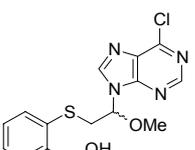
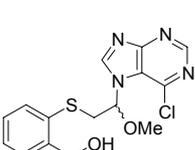
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|-------------|------------------------|--|
| ESB-958CS | 393,04 |  |
| ESB-960D | 315,13 |  |
| ESB-968AD-S | 345,14 |  |
| ESB-976AS | 306,12 |  |
| ESB-982C1 | 275,11 |  |
| ESB-980AS | 368,04 |  |
| ESB-984D | 308,08 |  |
| ESB-540ES | 340,30 |  |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|---------|------------------------|------------|
| ESB-968 | 313,12 | |
| GP-4 | 292,29 | |

2.5. FAMILIA 5: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL TIOSALICÍLICO (tabla 5):

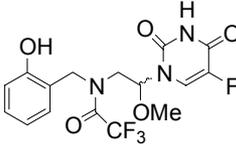
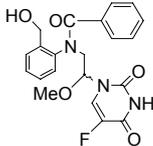
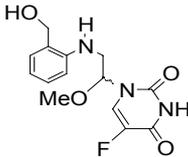
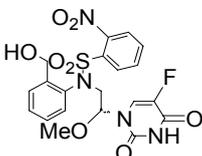
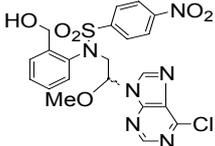
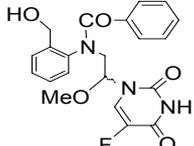
TABLA 5. CI_{50} DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA “O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL TIOSALICÍLICO”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

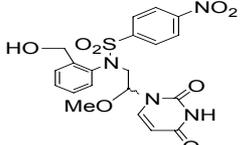
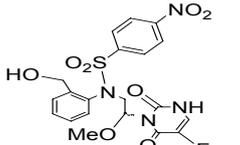
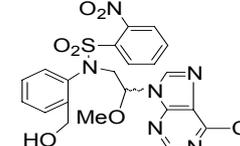
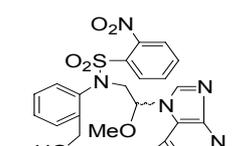
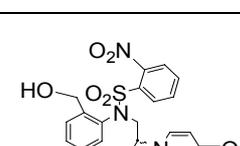
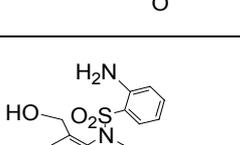
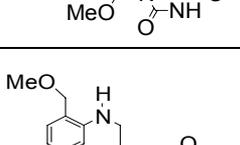
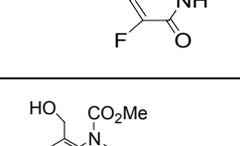
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|--------|------------------------|------------|
| MN-32C | 276,31 | |
| MN-80D | 382,82 | |
| MN-80E | 382,82 | |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|---------|------------------------|--|
| MN-36D | 322,38 |  |
| MN-80E | 382,82 |  |
| MN-80D | 382,82 |  |
| MN-84C | 318,78 |  |
| MN-116C | 318,45 |  |

2.6. FAMILIA 6: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL ANTRANÍLICO (tabla 6):

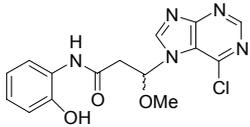
TABLA 6. Cl₅₀ DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA “O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL ANTRANÍLICO”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|-----------|------------------------|--|
| MDG-464E | 494,45 |  |
| MDG-310B | 405,08 |  |
| MDG-718C4 | 413,40 |  |
| MDG-708B | 309,29 |  |
| MDG-607G | 494,45 |  |
| MDG-798E | 518,93 |  |
| MDG-680G | 381,36 |  |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|----------|------------------------|--|
| MDG-850D | 476,46 |  |
| MDG-850E | 476,46 |  |
| MDG-884C | 518,93 |  |
| MDG-884D | 518,93 |  |
| MDG-864D | 476,46 |  |
| MDG-898D | 464,47 |  |
| MDG-568D | 323,32 |  |
| MDG-568F | 367,33 |  |

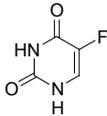
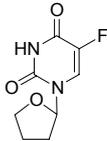
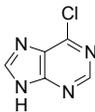
2.7. FAMILIA 7: O,N-ACETAL ACÍCLICO CON EL GRUPO AMIDA (tabla 7):

TABLA 7. Cl₅₀ DEL COMPUESTO DE LA FAMILIA “O,N-ACETAL ACÍCLICO CON EL GRUPO AMIDA”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|---------|------------------------|--|
| MN-184D | 347,76 |  |

2.8. FAMILIA 8: OTROS COMPUESTOS (tabla 8):

TABLA 8. Cl₅₀ DE “OTROS COMPUESTOS”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA |
|-------------|------------------------|--|
| 5-FU | 130,10 |  |
| FTORAFUR | 200,16 |  |
| CLOROPURINA | 154,56 |  |

3. CURVAS DE ABSORBANCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS

Con objeto de cuantificar el número de células en los cultivos experimentales, se sembraron por cuadruplicado cantidades conocidas de células de las 4 líneas (10000, 20000, 30000, 40000, 60000 y 120000) en placas de 24 pocillos (Iwaki Microplate, Japan). Tras esperar 24 horas para que las células se pegaran a la superficie de la placa, se estudió su absorbancia mediante el método de tinción con Sulforrodamina-B (SRB) siguiendo el protocolo propuesto por Papazisis *et al.* en 1997:

- Se adicionó 300 μ l de ácido tricloroacético (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) frío (4°C) al 10%, y se dejó en la nevera a 4°C durante 30 minutos.

- A continuación, se lavó 3 veces con agua destilada, y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

- Tras este tiempo, se añadió 500 μ l de SRB al 0.4% en ácido acético (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) al 1% y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente.

- Se eliminó la SRB sobrante y se lavaron las placas con ácido acético al 1% tres veces.

- Se solubilizó la SRB fijada a las células con 500 μ l de una solución 10mM Tris-base pH 10.5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en agitación suave (figura 9).

- Se transfirieron alícuotas de 100 μ l a placas de 96 pocillos (Iwaki Microplate, Japan) por triplicado y se leyeron en un colorímetro (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, USA) a 492 nm.

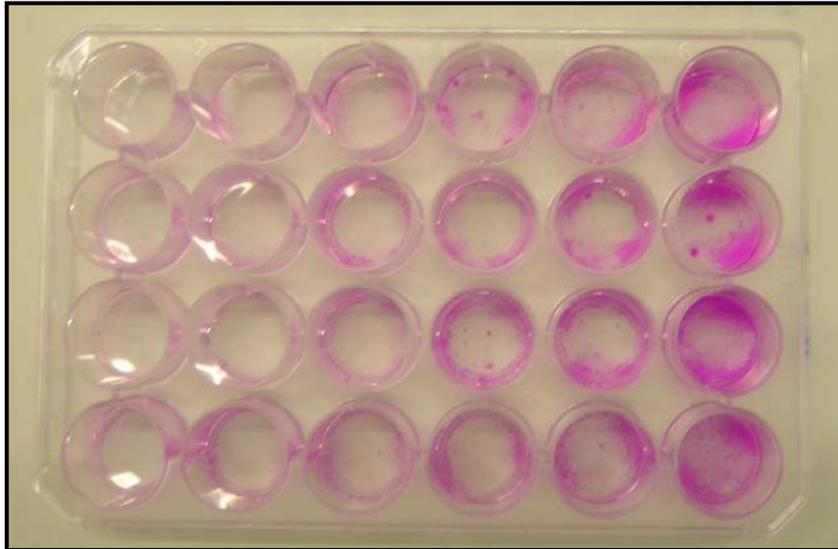


FIGURA 9. PLACA DE 24 POCILLOS PARA LA CURVA DE ABSORBANCIA DE LÍNEA IEC-6. SE OBSERVAN LAS CÉLULAS TEÑIDAS CON SRB A CONCENTRACIONES CRECIENTES.

Los valores de densidades ópticas se obtuvieron usando un programa informático llamado “Ascent Software for Multiskan” para Windows v.2.6 (Thermo Labsystems, USA). Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de regresión, con la finalidad de establecer la función matemática que relaciona el valor del número de células sembrado con las densidades ópticas obtenidas. Para ello se usó el programa estadístico Statgraphics plus para Windows v.5.1, (Statistical Graphics Corp, 2000).

4. INDUCCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES CON FÁRMACOS

Se siguió el siguiente protocolo con todas las líneas celulares:

- Las células se despegaron de la superficie de los frascos de cultivo con tripsina-EDTA (0.25% Tripsina, 0.02% EDTA en PBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) durante 15 minutos a 37°C en estufa de CO₂. Se lavaron dos veces con PBS a 4°C mediante centrifugación a 600 x g durante 5 minutos.

- Se diluyeron, en su respectivo medio de cultivo, hasta obtener suspensiones celulares que posteriormente fueron sembradas sobre diversos soportes estériles, según el caso.

- Tras 24 horas de cultivo, se realizó la inducción con los diferentes fármacos añadiendo las concentraciones deseadas de cada uno de ellos. Cada compuesto permaneció en contacto con las células durante un tiempo variable, dependiendo del tipo de experimento a desarrollar.

Se utilizaron como control para cada experimento cultivos paralelos de células de las 4 líneas sin adición de drogas. En todos los experimentos el medio de cultivo se reemplazó cada 72 horas, en su caso.

5. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Se calcularon las CI_{50} para cada uno de los diferentes compuestos. Para ello $0,5 \times 10^4$ células/cm² de las diferentes líneas fueron sembradas en placas de 24 pocillos (Iwaki Microplate, Japan) e inducidas durante 6 días a concentraciones crecientes de los fármacos seleccionados, reemplazando el medio de cultivo y adicionando la cantidad correspondiente de cada fármaco a los tres días de cultivo. Tras esto, se llevó a cabo una tinción con Sulforrodamina-B, tal y como se explica en el apartado 3 de material y métodos. Se hicieron gráficas que relacionaron la concentración del compuesto considerado (eje X), con el valor del número de células existente para cada caso (eje Y). Esta cantidad resulta de la transformación del valor de la densidad óptica obtenida, mediante la recta de regresión antes descrita. Finalmente, sobre las gráficas, se determinó el valor de la concentración del compuesto que produjo una reducción del 50% de la población celular (CI_{50}).

6. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR

Para el estudio del posible efecto de los diferentes fármacos sobre la distribución del ciclo celular, se sembraron 7×10^5 células de las diferentes líneas en Falcons de 25 cm² y fueron inducidas con los diferentes fármacos a su respectiva CI_{50} durante 48 horas. A partir de entonces:

- Se levantó la monocapa celular con una solución de PBS-EDTA (0.02% EDTA en PBS) incubando en estufa a 37°C durante 15 minutos.

- La suspensión celular se dispuso en tubos Facs y se lavó dos veces por centrifugación durante 10 minutos a 400 x g con la solución tampón. Ésta estaba constituida por 1 gr de glucosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) en 1 l de solución salina de fosfato (PBS) sin iones Ca^{++} ni Mg^{++} .

- Se fijó en 1 ml de etanol al 70%frío (-20°C) durante 12 horas a 4°C .

- Tras este tiempo, las células se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos, y se lavaron 2 veces con la solución tampón.

- Para su tinción, se resuspendieron con 1 ml de una solución de yoduro de propidio (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IP, 100 U/ml de RNasa en la solución tampón, ambas de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) durante 30 minutos en oscuridad.

Como control se usó la línea parental sin adición de fármaco. Las muestras fueron leídas, dentro de las 2 horas posteriores a la tinción con yoduro de propidio, mediante citometría de flujo por FACScan. Se usó un citómetro de flujo "VANTAGE" (Becton Dickinson, San José, CA, USA), del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, que dispone del software de análisis del ciclo celular CellFIT. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado.

7. ENSAYO DE VIABILIDAD, NECROSIS Y APOPTOSIS

Se analizó el posible efecto de los fármacos sobre la apoptosis de los cultivos. Para ello se utilizó el Kit TACSTM Annexin V-FITC (Pharmingen) que, además, contiene yoduro de propidio, con lo que se pudo distinguir, no sólo células apoptóticas, sino también necróticas y viables. Utilizamos dos técnicas diferentes:

7.1 ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para ello, se dispusieron 5×10^5 células de cada línea celular en Falcons de 25 cm^2 , y se trataron con los diferentes fármacos a su correspondiente CI_{50} durante 24 y 48 horas. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- Las células se levantaron con PBS-EDTA siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

- La suspensión celular se dispuso en tubos Facs y se lavaron dos veces por centrifugación durante 5 minutos a 500 x g con 500 µl de PBS frío (4°C).

- A continuación, cada muestra se resuspendió en 100 µl de una suspensión compuesta por 1 µl de la solución de anexina V, 10 µl de binding buffer, 10 µl PI y 79 µl H₂O. Después, las células se incubaron en oscuridad durante 15 minutos a 4°C.

- Finalmente, se añadió 400 µl de la solución de binding buffer y se procedió a su análisis por medio del FACScan.

Se preparó, además del control habitual de células sin fármacos, otro control negativo de la técnica, para descartar posibles fenómenos de autofluorescencia celular, en el que se analizaron células sin fármacos y sin teñir con anexina ni ioduro de propidio. Las muestras se analizaron por el Dr. Jaime Lazúen Alcón mediante citometría de flujo por FACScan, usando un citómetro de flujo "VANTAGE" (Becton Dickinson, San José, CA, USA) perteneciente al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

7.2 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Las muestras fueron inducidas con los distintos fármacos durante 48 horas y procesadas con el kit de apoptosis, de igual manera que para el estudio con citómetro de flujo. A continuación, 10 µl se depositaron en un porta y se analizaron mediante microscopía confocal utilizando un microscopio C. Zeiss EM 902 (Carl Zeiss Optical, Inc., Oberkochen, Germany) del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

8. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS LÍNEAS CÉLULARES POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Las cuatro líneas celulares, en Falcons de 75 cm², fueron inducidas con fármacos a su respectiva CI₅₀ durante 48 horas. A continuación, fueron observadas mediante microscopio invertido de contraste de fases Nikon Phase Contrast-2, ELWD 0.3 (Nikon Corp., Japan), en busca de alteraciones

morfológicas, y fotografiadas con una cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 5400 (Nikon Corp., Japan).

9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARRAYS

9.1. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

Para estudiar la modificación del patrón de expresión génica que producían los compuestos se seleccionaron 5 fármacos de las distintas familias atendiendo a diferentes motivos: CI_{50} , isomería, etc. Para ello, cultivos de 8×10^6 células fueron inducidos 48 horas con la concentración CI_{50} de estos 5 compuestos, en las diferentes líneas celulares. La extracción del ARN se realizó mediante la utilización del kit RNeasy Midi (QIAGEN), según el siguiente protocolo:

- Las células se despegaron de los frascos de cultivo con una solución de PBS-EDTA mediante el protocolo descrito anteriormente.

- Las células se recolectaron en tubos universales de 30 ml (Iwaki microplate, Japan), añadiéndoles la misma cantidad de PBS. Se centrifugaron a $600 \times g$ durante 5 minutos.

- Los botones celulares se resuspendieron en 2 ml de trizol, y se homogeneizaron pasándolos de 8 a 10 veces a través de una aguja de 2 ml.

- Después de 3 minutos a temperatura ambiente, se añadió a las muestras 800 μ l de cloroformo, se mezcló todo bien con vortex y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

- Tras este tiempo, las muestras se pasaron a tubos de 15 ml que poseen un gel denominado Phase Lock Gel (PLG, Eppendor Corp., Hamburg, Germany), que optimiza la separación de la fase de ADN y proteínas de la de ARN, y se centrifugaron a $2000 \times g$ durante 15 minutos.

- Tras la centrifugación, la capa superior fue transferida a tubos universales de 50 ml (Iwaki microplate, Japan) y se añadió gota a gota el mismo volumen de alcohol al 70% previamente preparado.

- El total de la muestra fue volcado en las columnas Rneasy suministradas en el kit, y se centrifugó 5 minutos a $3000 \times g$. La fase eluida se

recogió, se dispuso otra vez en la columna y se centrifugó de nuevo 5 minutos a 3000 x g.

- Entonces, la fase eluida se decantó y añadimos a la columna 4 ml de RW₁ buffer (buffer de lavado), centrifugando a 3000 x g durante 5 minutos. Se decantó la fase que pasó a través de la columna y añadimos 160 µl de DNasa, dejándolo actuar 15 minutos a temperatura ambiente.

- Una vez transcurrido ese tiempo, añadimos 2 ml de RW₁ buffer y, tras esperar 5 minutos, centrifugamos a 3000 x g durante 5 minutos.

- Tras esto, tiramos la fase eluida y añadimos 3 ml de RPEr (buffer de lavado al que se le añadió previamente etanol), y se centrifugó durante 5 minutos a 3000 x g. La fase eluida se decanta y, tras añadir otros 3 ml de RPEr, centrifugamos a 3000 x g otros 5 minutos.

- Se tomó cuidadosamente la minicolumna del tubo recolector y fue transferida a un nuevo tubo añadiendo 150 µl de Rnase-free water directamente sobre la membrana, y posteriormente centrifugada durante 5 minutos a 3000 x g. Este último proceso se repitió de nuevo y guardamos la fase eluida en tubos eppendorf (Eppendorf Corp., Hamburg, Germany).

9.2. CUANTIFICACIÓN DE ARN

Se llevó a cabo a una longitud de onda entre 260 nm y 280 nm, mediante el espectrofotómetro Ultrospec 2000 de Pharma Biotech. La lectura en este intervalo permitió calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra mediante la relación entre la lectura (D.O. 260 nm/ D.O. 280 nm), teniendo en cuenta que 1 unidad de D.O. a 260 nm es igual a 40 mg/ml de ARN.

9.3. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ARN

Se chequeó 1 µg de ARN mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% durante 2 horas a 80 V. La visualización del ARN por transiluminación de ultravioleta se realizó en el densitómetro Molecular Imager Gel Doc XR System usando el software Quantity One 4.5.2 (Bio-Rad Laboratorios Inc., U.S.A.), y nos permitió comprobar que no se encontraba degradado.

9.4 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Una vez cuantificado y chequeada la integridad del ARN, se mandó 10 µg diluido en 3 volúmenes de etanol puro (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid para su análisis.

Brevemente el protocolo para el análisis fue:

- Al ARN recibido se le añadió NaAc pH5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) hasta 0,3M y 1 µl de carrier LPA (Ambion Inc., Austin, USA).
- Toda esta mezcla, se incubó a -80°C durante al menos 1 hora.
- Tras este tiempo, se centrifugó a 13000 x g (microcentrífuga Eppendorf p/n 5417R, Eppendorf Corp., Hamburg, Germany) durante 30 minutos y se recogió el botón.
- El botón se lavó con etanol al 80% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
- Antes del marcaje, el ARN se analizó con el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Tech., Santa Clara, CA., Usa), para comprobar su calidad.
- Una vez comprobado que las muestras tenían la suficiente calidad, se marcó el ARN con el kit Two-Color Microarray-Based Gene Expression Análisis (Agilent Tech., Santa Clara, CA., USA).
- Posteriormente, se realizó la hibridación al chip G4110B humano de Agilent con capacidad para 22 kb, y al G4130B de rata en el caso de la línea celular IEC-6 (Agilent Tech., Santa Clara, CA., USA).
- Por último, se procedió al escaneado de la imagen de hibridación.

El propio servicio de la Unidad de Genómica del CNIO realizó el análisis de las imágenes de hibridación, enviando, tras su procesamiento, los datos

brutos, normalizados y una relación completa de los genes diferencialmente expresados y su magnitud.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DATOS

El análisis de los datos de los diferentes ensayos fue realizado utilizando el programa estadístico Statgraphics plus para Windows v.5.1 (Statistical Graphics Corp, 2000). Las diferencias estadísticamente significativas se consideraron con valores de $p < 0,05$. La representación gráfica de los datos obtenidos se realizó mediante el empleo del software Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation).

RESULTADOS

1. CURVAS DE ABSORBANCIA

Con el fin de obtener curvas patrón que relacionaran la absorbancia con el número de células, se sembraron, por cuadruplicado y durante 24 horas, diferentes densidades de células de las líneas MCF-7, MCF10A, HT-29 e IEC-6. Los siguientes valores de densidad óptica fueron obtenidos tras tinción con SRB (tablas 9, 10, 11 y 12 respectivamente):

TABLA 9. NÚMERO DE CÉLULAS MCF-7 SEMBRADAS CON SU CORRESPONDIENTE VALOR DE DENSIDAD ÓPTICA RESULTANTE.

| Nº Células | D.O. | D.O. | D.O. | D.O. |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| 10000 | 0,056 | 0,064 | 0,054 | 0,059 |
| 20000 | 0,069 | 0,081 | 0,074 | 0,085 |
| 30000 | 0,093 | 0,102 | 0,085 | 0,092 |
| 40000 | 0,106 | 0,116 | 0,112 | 0,101 |
| 60000 | 0,140 | 0,130 | 0,144 | 0,135 |
| 120000 | 0,240 | 0,226 | 0,216 | 0,219 |

TABLA 10. NÚMERO DE CÉLULAS MCF-10A SEMBRADAS CON SU CORRESPONDIENTE VALOR DE DENSIDAD ÓPTICA RESULTANTE.

| Nº Células | D.O. | D.O. | D.O. | D.O. |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| 10000 | 0,060 | 0,057 | 0,061 | 0,065 |
| 20000 | 0,080 | 0,083 | 0,091 | 0,074 |
| 30000 | 0,093 | 0,108 | 0,089 | 0,091 |
| 40000 | 0,101 | 0,119 | 0,124 | 0,099 |
| 60000 | 0,143 | 0,133 | 0,137 | 0,149 |
| 120000 | 0,390 | 0,382 | 0,299 | 0,312 |

TABLA 11. NÚMERO DE CÉLULAS HT-29 SEMBRADAS CON SU CORRESPONDIENTE VALOR DE DENSIDAD ÓPTICA RESULTANTE.

| Nº Células | D.O. | D.O. | D.O. | D.O. |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| 10000 | 0,048 | 0,056 | 0,051 | 0,062 |
| 20000 | 0,060 | 0,079 | 0,064 | 0,084 |
| 30000 | 0,074 | 0,088 | 0,071 | 0,078 |
| 40000 | 0,089 | 0,090 | 0,091 | 0,097 |
| 60000 | 0,108 | 0,114 | 0,116 | 0,134 |
| 120000 | 0,206 | 0,159 | 0,208 | 0,211 |

TABLA 12. NÚMERO DE CÉLULAS IEC-6 SEMBRADAS CON SU CORRESPONDIENTE VALOR DE DENSIDAD ÓPTICA RESULTANTE.

| Nº Células | D.O. | D.O. | D.O. | D.O. |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| 10000 | 0,045 | 0,055 | 0,045 | 0,065 |
| 20000 | 0,054 | 0,057 | 0,051 | 0,073 |
| 30000 | 0,072 | 0,072 | 0,065 | 0,073 |
| 40000 | 0,083 | 0,071 | 0,085 | 0,082 |
| 60000 | 0,079 | 0,090 | 0,096 | 0,100 |
| 120000 | 0,129 | 0,124 | 0,149 | 0,137 |

Estos valores se representaron gráficamente y se realizó un análisis de regresión entre el número de células y la densidad óptica para cada línea celular (figuras 10, 11 ,12 y 13). Además, determinamos la expresión matemática de la recta de regresión que relacionaba ambas variables junto con los parámetros estadísticos más relevantes:

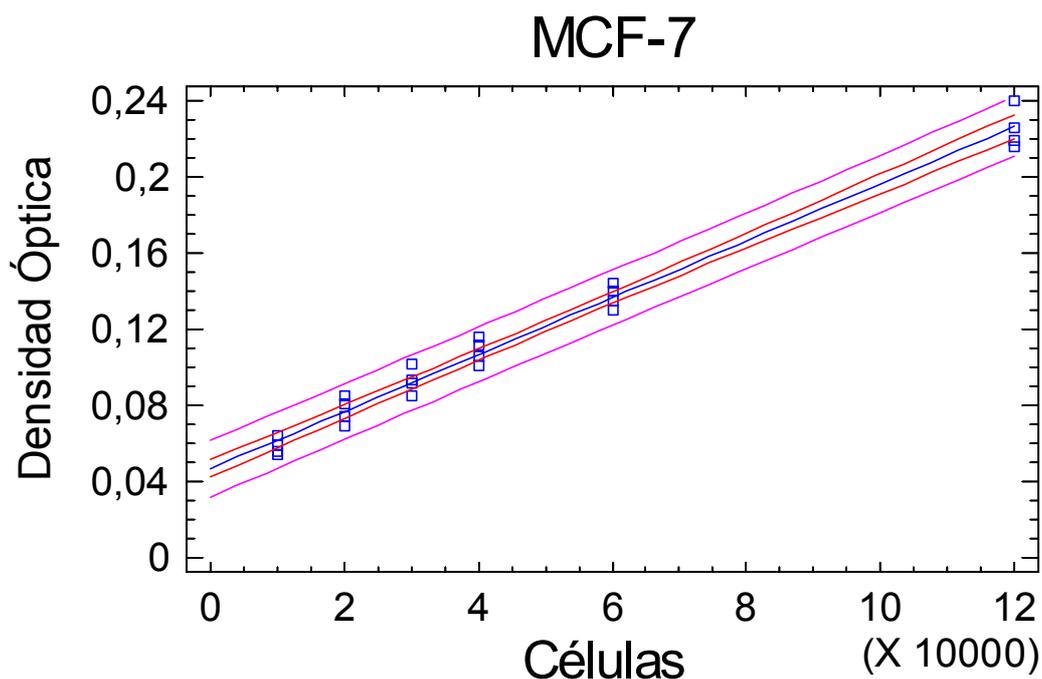


FIGURA 10. GRÁFICA DE REGRESIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

$$\text{Densidad Óptica MCF-7} = 0,0467574 + 0,00000149716 \times \text{n}^\circ \text{ células}$$

Análisis de la Varianza

| Fuente | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado medio | Cociente-F | P-Valor |
|---------------|-------------------|----|----------------|------------|---------|
| Modelo | 0,0711303 | 1 | 0,0711303 | 1532,12 | 0,0000 |
| Residuo | 0,00102137 | 22 | 0,0000464259 | | |
| Total (Corr.) | 0,0721516 | 23 | | | |

Coefficiente de Correlación = 0,992897

R-cuadrado = 98,5844 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,5201 porcentaje

Error estándar de est. = 0,00681366

Error absoluto medio = 0,00549781

Estadístico de Durbin-Watson = 1,52982 (P=0,1122)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,192091

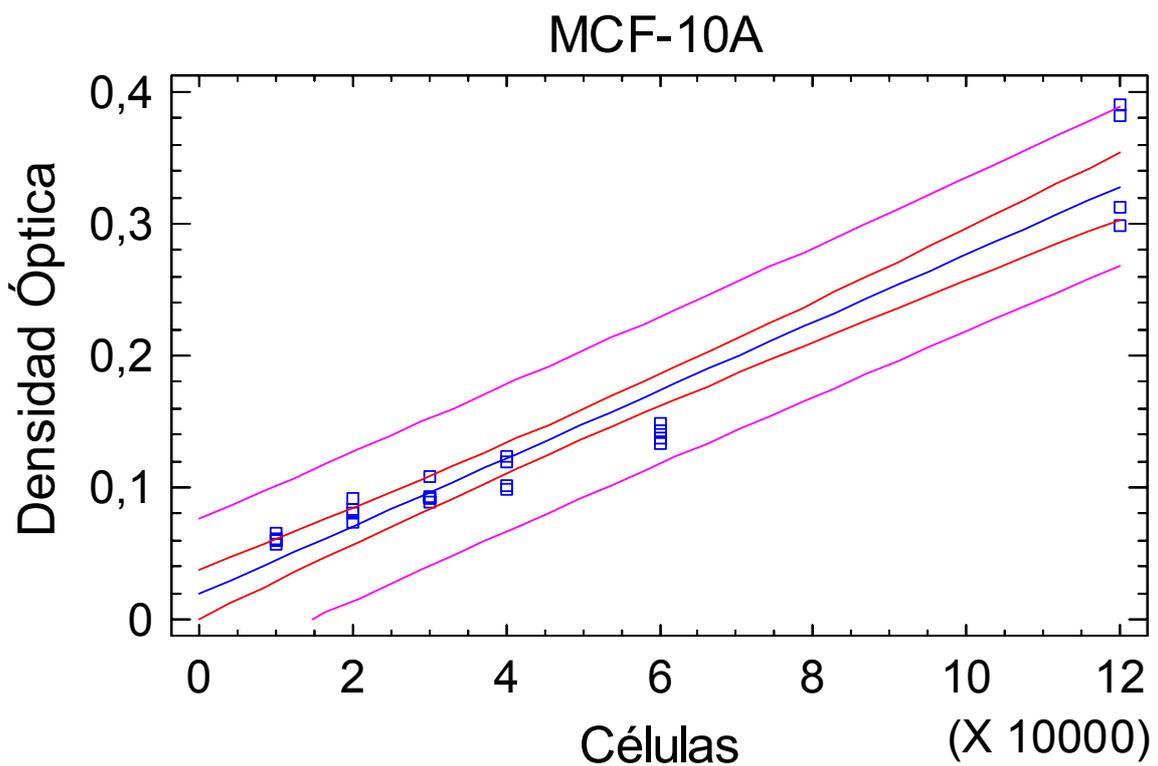


FIGURA 11. GRÁFICA DE REGRESIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MCF-10A.

$$\text{Densidad Óptica MCF-10A} = 0,0186471 + 0,00000258256 \times n^{\circ} \text{ células}$$

Análisis de la Varianza

| Fuente | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado medio | Cociente-F | P-Valor |
|---------------|-------------------|----|----------------|------------|---------|
| Modelo | 0,21165 | 1 | 0,21165 | 304,22 | 0,0000 |
| Residuo | 0,0153057 | 22 | 0,000695713 | | |
| Total (Corr.) | 0,226955 | 23 | | | |

Coefficiente de Correlación = 0,965692

R-cuadrado = 93,2561 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 92,9495 porcentaje

Error estándar de est. = 0,0263764

Error absoluto medio = 0,0200611

Estadístico de Durbin-Watson = 1,89436 (P=0,3830)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,0359929

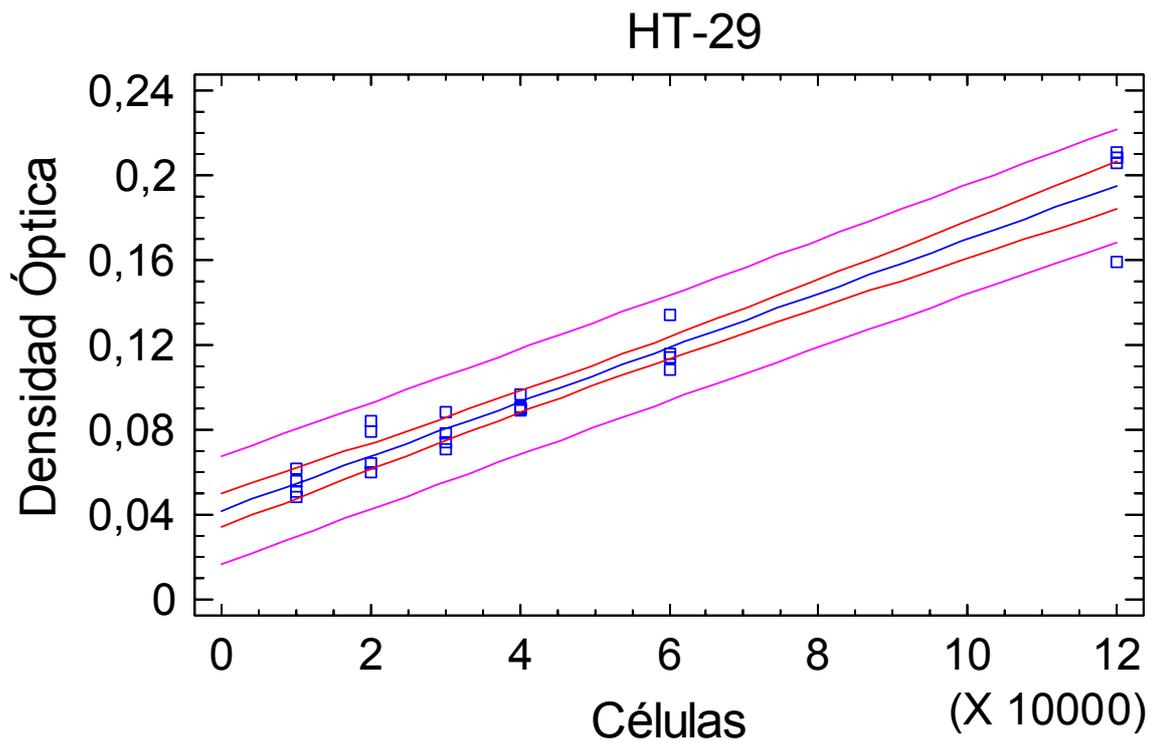


FIGURA 12. GRÁFICA DE REGRESIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HT-29.

$$\text{Densidad Óptica HT-29} = 0,0419559 + 0,00000127773 \times n^{\circ} \text{ células}$$

Análisis de la Varianza

| Fuente | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado medio | Cociente-F | P-Valor |
|---------------|-------------------|----|----------------|------------|---------|
| Modelo | 0,0518077 | 1 | 0,0518077 | 374,91 | 0,0000 |
| Residuo | 0,0030401 | 22 | 0,000138186 | | |
| Total (Corr.) | 0,0548478 | 23 | | | |

Coeficiente de Correlación = 0,971891
 R-cuadrado = 94,4572 porcentaje
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 94,2053 porcentaje
 Error estándar de est. = 0,0117553
 Error absoluto medio = 0,00855742
 Estadístico de Durbin-Watson = 1,26715 (P=0,0278)
 Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,318342

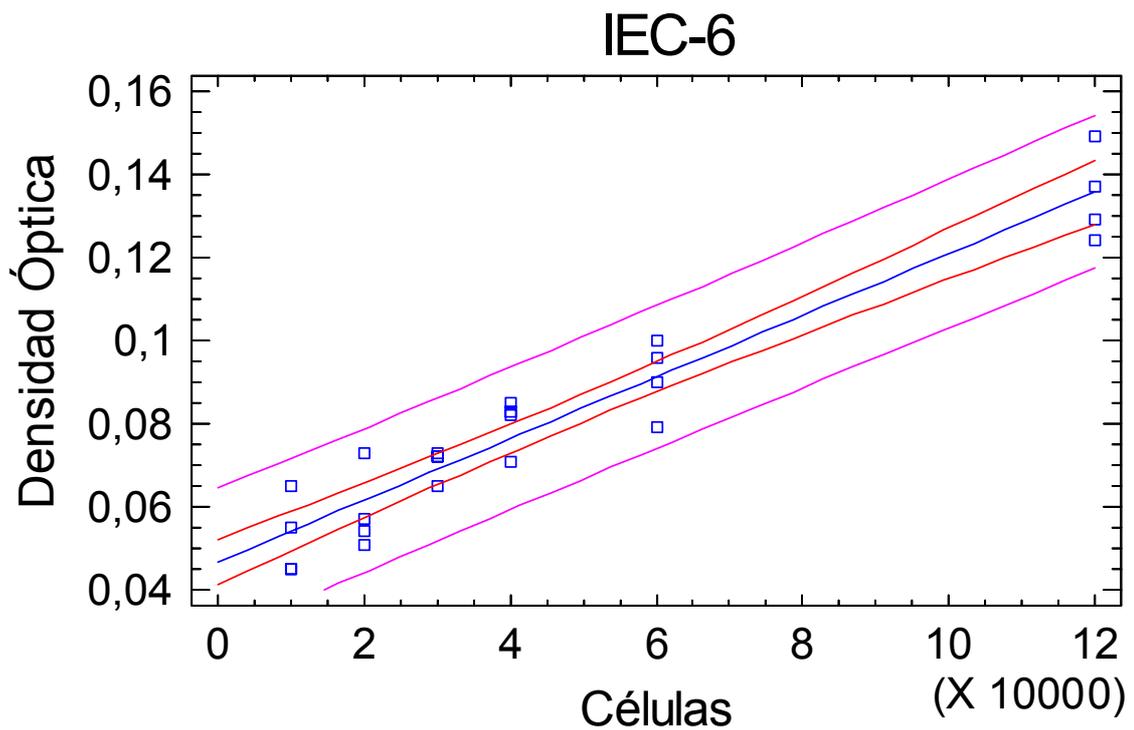


FIGURA 13. GRÁFICA DE REGRESIÓN DE LA LÍNEA CELULAR IEC-6.

$$\text{Densidad Óptica IEC-6} = 0,0466471 + 7,43277 \times 10^{-7} \times \text{n}^\circ \text{ células}$$

Análisis de la Varianza

| Fuente | Suma de cuadrados | GL | Cuadrado medio | Cociente-F | P-Valor |
|---------------|-------------------|----|----------------|------------|---------|
| Modelo | 0,0175314 | 1 | 0,0175314 | 266,75 | 0,0000 |
| Residuo | 0,0014459 | 22 | 0,0000657227 | | |
| Total (Corr.) | 0,0189773 | 23 | | | |

Coefficiente de Correlación = 0,96115

R-cuadrado = 92,3809 porcentaje

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 92,0346 porcentaje

Error estándar de est. = 0,00810695

Error absoluto medio = 0,00684909

Estadístico de Durbin-Watson = 0,889633 (P=0,0012)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,526209

Para los cuatro ajustes el valor de p es inferior a 0.01, por lo que existe relación estadísticamente significativa entre las variables “Densidad Óptica” y “Número de Células”, para un nivel de confianza del 99%.

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo explica un 98,58, 93,26, 94,46 y 92,38% de la variabilidad encontrada en “Densidad Óptica” para las líneas MCF-7, MCF-10A, HT-29 e IEC-6, respectivamente. El alto coeficiente de correlación en todos los casos estudiados indica una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar de la estimación puede usarse para construir límites de la predicción para nuevas observaciones que se quieran realizar.

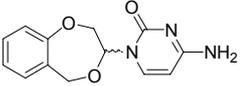
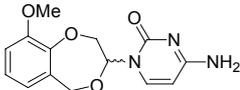
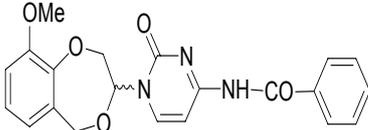
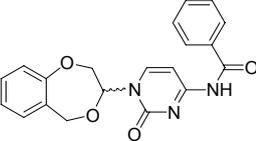
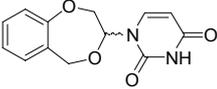
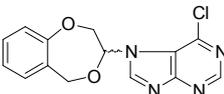
2. CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI₅₀) EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7

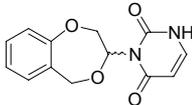
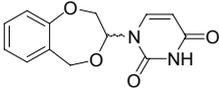
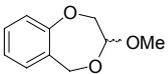
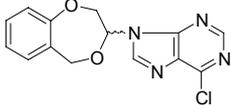
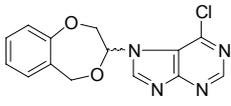
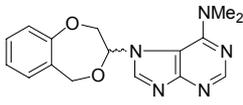
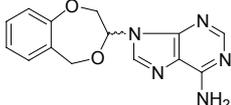
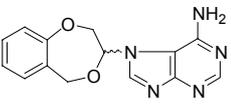
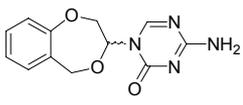
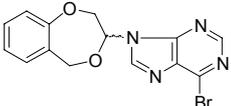
En los ensayos de citotoxicidad, la línea celular MCF-7 fue inducida con cada uno de los fármacos durante 6 días a concentraciones crecientes, tras lo cual calculamos la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de cada uno de ellos, como se describe en el apartado de material y métodos. Así, los valores de CI₅₀

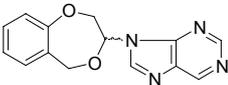
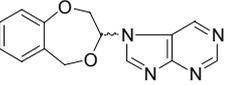
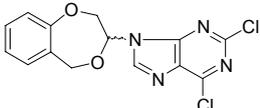
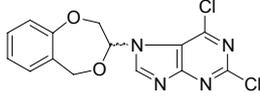
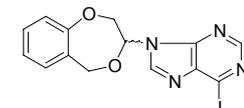
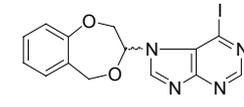
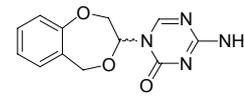
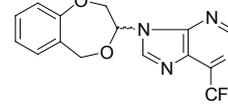
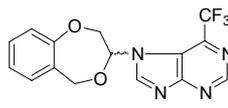
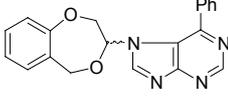
obtenidos, se representan como la media de cuatro réplicas junto con su desviación estándar:

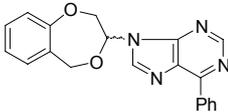
2.1. FAMILIA 1: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZODIOXEPÍNICA (tabla 13):

TABLA 13. Cl_{50} DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA “O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZODIOXEPÍNICA”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl_{50} (μ M) MCF-7 |
|--------------|------------------------|--|----------------------------|
| TRE | 259,26 |  | $24,36 \pm 2,08$ |
| MOC | 289,28 |  | $49,71 \pm 3,44$ |
| DAVID | 393,37 |  | $34,65 \pm 0,96$ |
| ESB-974BS/AS | 362,36 |  | $115,80 \pm 5,96$ |
| ESB-930A | 260,25 |  | $93,27 \pm 4,87$ |
| GP-1 | 302,50 |  | $2,74 \pm 0,31$ |

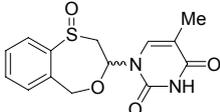
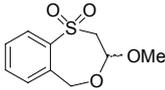
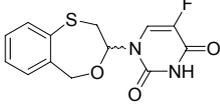
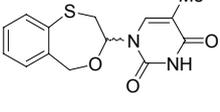
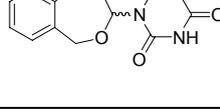
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|----------|------------------------|--|-----------------------------|
| GP-2 | 260,00 |  | 29,42 ± 0,93 |
| GP-3 | 260,00 |  | 30,62 ± 1,05 |
| MDG-752A | 180,20 |  | 151,28 ± 0,48 |
| MB-90A | 302,72 |  | 4.63 ± 0,02 |
| MB-90B | 302,72 |  | 2,74 ± 0,31 |
| MB-III A | 311,14 |  | 59,51 ± 8,78 |
| MB-III B | 283,11 |  | 45,75 ± 4,51 |
| MB-III C | 283,11 |  | 60,65 ± 2,58 |
| KS-89C | 260,13 |  | 33,84 ± 3,85 |
| BDM-69C | 347,13 |  | 3,43 ± 0,50 |

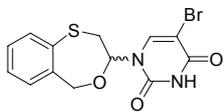
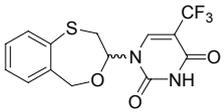
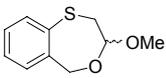
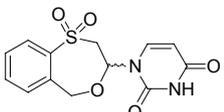
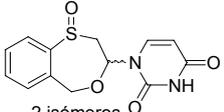
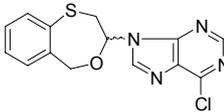
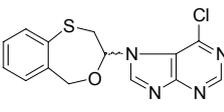
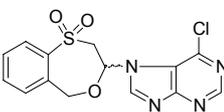
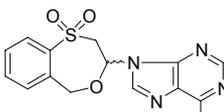
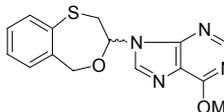
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|----------|------------------------|--|-----------------------------|
| KS-70A | 300,13 |  | 44,94 ± 9,83 |
| KS-70B | 300,13 |  | 40,39 ± 7,85 |
| KS-47A | 337,02 |  | 4,40 ± 0,88 |
| KS-47B | 337,02 |  | 1,28 ± 0,61 |
| BDM-185A | 394,03 |  | 6,75 ± 0,23 |
| KS-193B | 394,03 |  | 4,01 ± 0,33 |
| KS-89C | 261,26 |  | 46,16 ± 5,34 |
| KS-171C | 336,27 |  | 3,21 ± 0,40 |
| KS-171D | 336,27 |  | 24,94 ± 1,83 |
| KS-214D | 344,37 |  | 22,80 ± 0,19 |

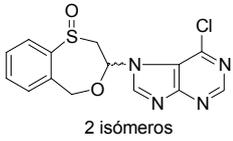
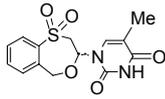
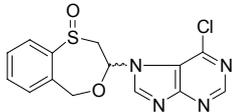
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|---------|------------------------|--|-----------------------------|
| KS-214B | 344,37 |  | 16,36 ± 0,26 |

2.2. FAMILIA 2: O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 4,1-BENZOXATIEPÍNICA (tabla 14):

TABLA 14. Cl₅₀ DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LOS “O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 4,1-BENZOXATIEPÍNICA”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

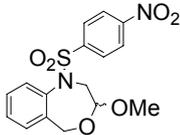
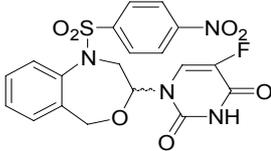
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|--------|------------------------|--|-----------------------------|
| MN-56B | 306,34 |  | 30,05 ± 0,10 |
| MN-64B | 228,27 |  | 87,91 ± 7,16 |
| MN-28D | 294,30 |  | 404,16 ± 6,83 |
| MN-40C | 290,34 |  | 123,53 ± 8,81 |
| MN-44B | 292,37 |  | 107,16 ± 4,72 |

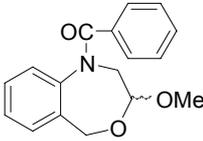
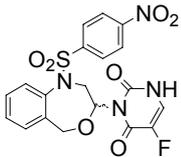
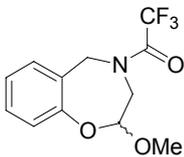
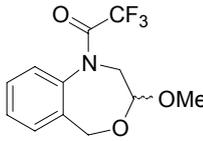
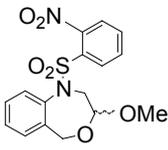
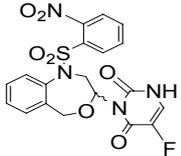
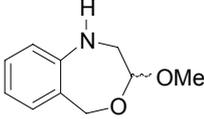
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | CI ₅₀ (μM) MCF-7 |
|---------|------------------------|--|-----------------------------|
| MN-48C | 355,21 |  | 44,08 ± 0,78 |
| MN-52B | 344,04 |  | 34,94 ± 1,47 |
| MN-24B | 196,26 |  | 52,28 ± 7,24 |
| MN-76C | 308,31 |  | 158,43 ± 9,38 |
| MN-72D | 292,31 |  2 isómeros | 173,32 ± 5,93 |
| MN-84D | 318,78 |  | 5,46 ± 0,02 |
| MN-116B | 318,45 |  | 3,55 ± 1,10 |
| MN-80C | 350,78 |  | 2,58 ± 0,08 |
| MN-92B | 350,78 |  | 16,53 ± 1,59 |
| MN-96B | 314,36 |  | 44,56 ± 0,50 |

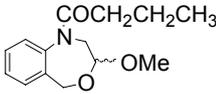
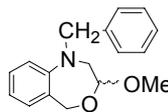
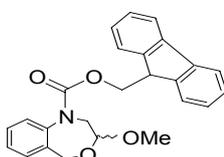
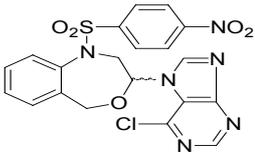
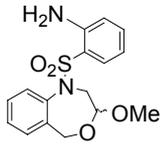
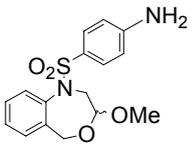
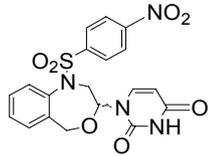
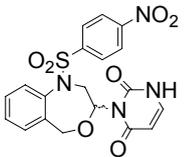
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|---------|------------------------|--|-----------------------------|
| MN-88C | 334,78 |  2 isómeros | 46,33 ± 0,03 |
| MN-170B | 322,34 |  | 12,74 ± 4,79 |
| MN-88B | 334,78 |  | 74,89 ± 3,76 |

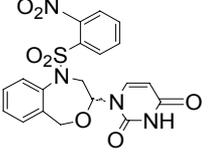
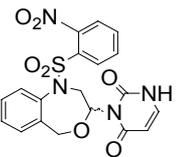
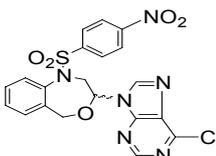
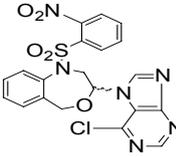
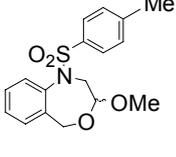
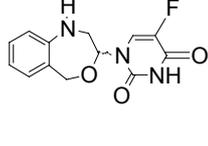
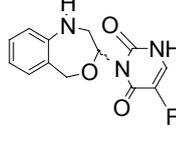
2.3. FAMILIA 3: O,O-ACETALES Y O,N-CETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZOXAZEPÍNICA (tabla 15):

TABLA 15. Cl₅₀ DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LOS “O,O-ACETALES Y O,N-CETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZOXAZEPÍNICA”, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

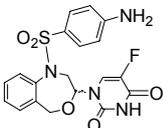
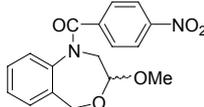
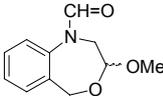
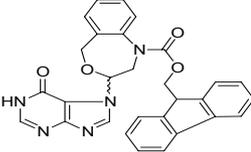
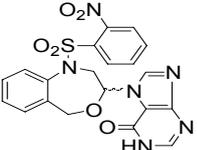
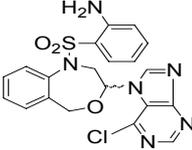
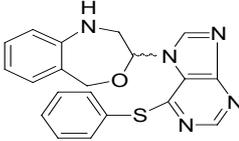
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|----------|------------------------|--|-----------------------------|
| MDG-430A | 364,37 |  | 44,80 ± 3,84 |
| MDG-612B | 462,40 |  | 19,33 ± 1,04 |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|----------|------------------------|--|-----------------------------|
| MDG-616A | 283,32 |  | 36,70 ± 2,22 |
| MDG-612C | 462,40 |  | 19,81 ± 0,08 |
| MDG-292A | 275,23 |  | 27,85 ± 0,64 |
| MDG-540A | 275,23 |  | 27,39 ± 0,71 |
| MDG-206A | 364,37 |  | 51,78 ± 0,21 |
| MDG-607F | 462,40 |  | 22,63 ± 0,11 |
| MDG-484D | 179,22 |  | 81,05 ± 2,86 |
| MDG-607B | 462,40 |  | 19,70 ± 0,15 |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|-----------|------------------------|--|-----------------------------|
| MDG-530B | 249,31 |  | 39,84 ± 5,35 |
| MDG-804B | 269,34 |  | 67,23 ± 5,32 |
| MDG-791D | 401,46 |  | 26,19 ± 0,60 |
| MDG-798D | 486,89 |  | 1,22 ± 0,12 |
| MDG-858B | 334,39 |  | 43,36 ± 4,20 |
| MDG-872B | 334,39 |  | 73,84 ± 6,71 |
| MDG-850B2 | 444,41 |  | 39,78 ± 2,60 |
| MDG-850C | 444,41 |  | 44,28 ± 4,65 |

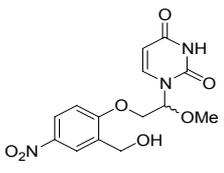
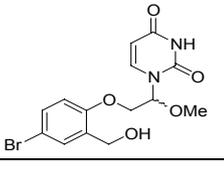
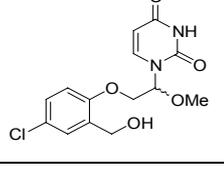
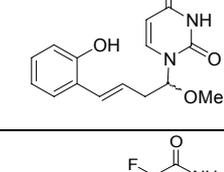
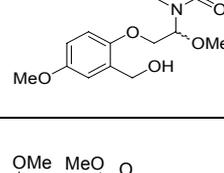
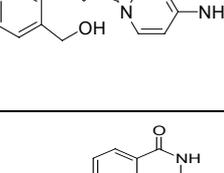
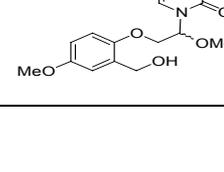
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|----------|------------------------|--|-----------------------------|
| MDG-864B | 444,41 |  | 45,17 ± 0,48 |
| MDG-864C | 444,41 |  | 50,90 ± 3,87 |
| MDG-878A | 432,43 |  | 54,82 ± 1,04 |
| MDG-798C | 486,89 |  | 2,73 ± 0,17 |
| MDG-884B | 486,89 |  | 0,92 ± 0,01 |
| MDG-904B | 333,4 |  | 3,10 ± 0,05 |
| MDG-924C | 277,25 |  | 102,26 ± 13,41 |
| MDG-936B | 277,25 |  | 72,40 ± 11,28 |

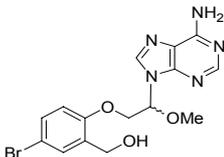
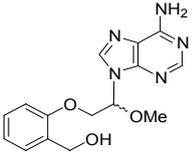
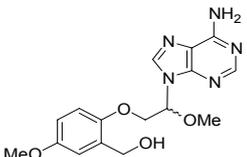
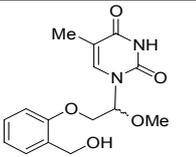
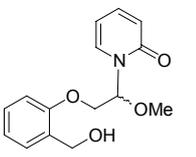
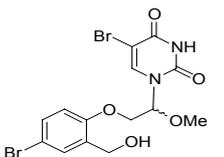
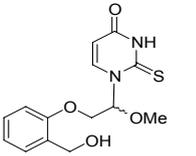
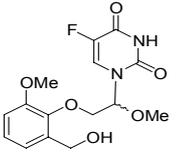
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|-------------|------------------------|------------|-----------------------------|
| MDG-892A | 432,43 | | 43,70 ± 0,09 |
| MDG-828B | 523,97 | | 0,67 ± 0,18 |
| MDG-828C | 523,97 | | 0,84 ± 0,09 |
| MDG-884A2-2 | 486,89 | | 2,10 ± 0,69 |
| MDG-942B | 560,61 | | 2,59 ± 0,57 |
| MDG-958A | 560,61 | | 0,86 ± 0,12 |
| MDG-798D2 | 468,44 | | 132,95 ± 4,72 |
| MDG-964B | 298,34 | | 31,87 ± 5,43 |
| MDG-310A | 147,17 | | 22,90 ± 3,95 |

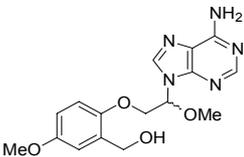
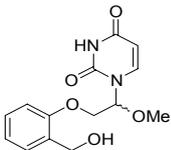
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | CI ₅₀ (μM) MCF-7 |
|-----------|------------------------|--|-----------------------------|
| MDG-930B2 | 432,43 |  | 14,37 ± 0,69 |
| MDG-946C | 328,32 |  | 27,14 ± 5,20 |
| MDG-918C2 | 207,23 |  | 9,13 ± 1,24 |
| MDG-828F | 505,18 |  | 53,57 ± 13,07 |
| MDG-884B2 | 486,89 |  | 19,66 ± 5,27 |
| MDG-953C3 | 456,91 |  | 9,14 ± 1,24 |
| MDG-940C | 375,45 |  | 48,91 ± 9,89 |

2.4. FAMILIA 4: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL SALICÍLICO (tabla 16):

TABLA 16. Cl_{50} DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LOS "O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL SALICÍLICO", EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7

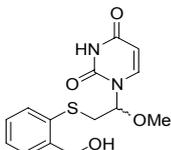
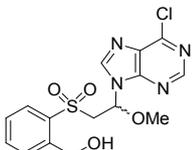
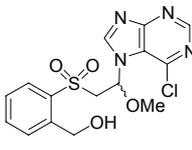
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl_{50} (μ M) MCF-7 |
|-----------|------------------------|--|----------------------------|
| ESB-946C | 337,28 |  | $20,00 \pm 0,74$ |
| ESB-948A | 371,18 |  | $25,07 \pm 3,85$ |
| ESB-950C | 326,73 |  | $23,53 \pm 2,87$ |
| ESB-954B | 288,11 |  | $165,84 \pm 6,77$ |
| ESB-912C | 340,31 |  | $55,49 \pm 2,85$ |
| COOP | 425,43 |  | $36,40 \pm 2,89$ |
| ESB-966D1 | 425,16 |  | $234,95 \pm 8,97$ |

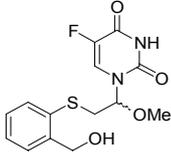
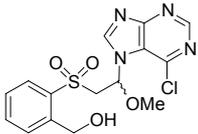
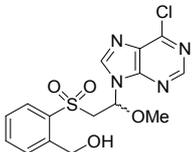
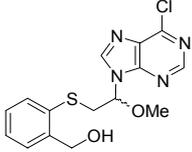
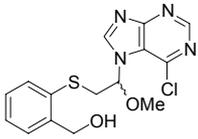
| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|-------------|------------------------|--|-----------------------------|
| ESB-958CS | 393,04 |  | 67,90 ± 1,73 |
| ESB-960D | 315,13 |  | 88,90 ± 2,84 |
| ESB-968AD-S | 345,14 |  | 82,15 ± 4,78 |
| ESB-976AS | 306,12 |  | 127,40 ± 1,99 |
| ESB-982C1 | 275,11 |  | 130,71 ± 4,46 |
| ESB-980AS | 368,04 |  | 124,00 ± 2,65 |
| ESB-984D | 308,08 |  | 62,80 ± 4,81 |
| ESB-540ES | 340,30 |  | 68,50 ± 2,81 |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|---------|------------------------|--|-----------------------------|
| ESB-968 | 313,12 |  | 32,40 ± 1,80 |
| GP-4 | 292,29 |  | 73,45 ± 10,21 |

2.5. FAMILIA 5: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL TIOSALICÍLICO (tabla 17):

TABLA 17. Cl₅₀ DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LOS O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL TIOSALICÍLICO, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|--------|------------------------|--|-----------------------------|
| MN-32C | 276,31 |  | 27,50 ± 0,18 |
| MN-80D | 382,82 |  | 63,76 ± 6,42 |
| MN-80E | 382,82 |  | 81,87 ± 11,94 |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|---------|------------------------|--|-----------------------------|
| MN-36D | 322,38 |  | 80,21 ± 6,70 |
| MN-80E | 382,82 |  | 81,87 ± 11,94 |
| MN-80D | 382,82 |  | 63,76 ± 6,42 |
| MN-84C | 318,78 |  | 48,58 ± 5,14 |
| MN-116C | 318,45 |  | 40,03 ± 3,57 |

2.6. FAMILIA 6: O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL ANTRANÍLICO (tabla 18):

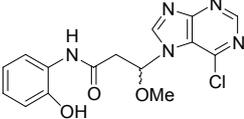
TABLA 18. Cl₅₀ DE LOS COMPUESTOS DE LA FAMILIA DE LOS "O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL ANTRANÍLICO", EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|-----------|------------------------|------------|-----------------------------|
| MDG-464E | 494,45 | | 48,50 ± 3,19 |
| MDG-310B | 405,08 | | 24,29 ± 0,75 |
| MDG-718C4 | 413,40 | | 16,14 ± 0,77 |
| MDG-708B | 309,29 | | 35,97 ± 0,40 |
| MDG-607G | 494,45 | | 90,99 ± 6,06 |
| MDG-798E | 518,93 | | 18,70 ± 0,08 |
| MDG-680G | 381,36 | | 10,49 ± 3,08 |

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl ₅₀ (μM) MCF-7 |
|----------|------------------------|------------|-----------------------------|
| MDG-850D | 476,46 | | 45,76 ± 2,45 |
| MDG-850E | 476,46 | | 55,22 ± 12,14 |
| MDG-884C | 518,93 | | 11,30 ± 1,27 |
| MDG-884D | 518,93 | | 3,25 ± 0,23 |
| MDG-864D | 476,46 | | 64,81 ± 0,05 |
| MDG-898D | 464,47 | | 1,09 ± 0,03 |
| MDG-568D | 323,32 | | 21,17 ± 2,34 |
| MDG-568F | 367,33 | | 19,56 ± 3,63 |

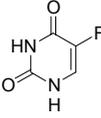
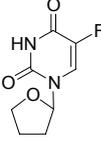
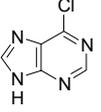
2.7. FAMILIA 7: O,N-ACETAL ACÍCLICO CON EL GRUPO AMIDA (tabla 19):

TABLA 19. Cl_{50} DEL "O,N-ACETAL ACÍCLICO CON EL GRUPO AMIDA", EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl_{50} (μ M) MCF-7 |
|---------|------------------------|--|----------------------------|
| MN-184D | 347,76 |  | $32,75 \pm 1,05$ |

2.8. FAMILIA 8: OTROS COMPUESTOS (tabla 20):

TABLA 20. Cl_{50} DE OTROS COMPUESTOS, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| NOMBRE | PESO MOLECULAR (g/mol) | ESTRUCTURA | Cl_{50} (μ M) MCF-7 |
|-------------|------------------------|---|----------------------------|
| 5-FU | 130,10 |  | $1,90 \pm 0,32$ |
| FTORAFUR | 200,16 |  | $0,87 \pm 0,03$ |
| CLOROPURINA | 154,56 |  | $83,89 \pm 14,47$ |

3. CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI₅₀) Y DEL ÍNDICE TERAPÉUTICO (IT) *IN VITRO* DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS SOBRE LAS CUATRO LÍNEAS CELULARES

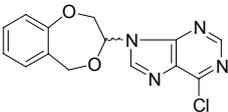
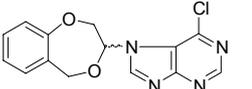
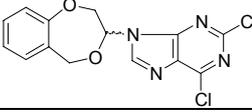
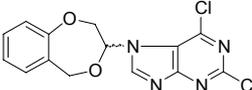
A continuación, y debido al gran volumen de fármacos estudiados, seleccionamos una serie de compuestos para los posteriores ensayos biológicos, utilizando los siguientes criterios por orden de prioridad:

- Capacidad citotóxica.
- Parejas de isómeros.
- Rendimiento de su síntesis química.

Una vez seleccionados, probamos su efecto citotóxico sobre las líneas celulares MCF-10A, HT-29 e IEC-6. Los fármacos elegidos, agrupados por familias con su CI₅₀ junto con su respectiva desviación estándar, fueron:

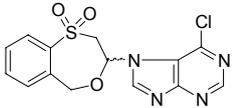
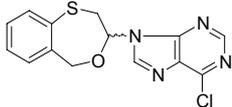
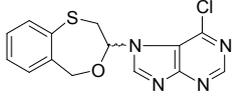
3.1. CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI₅₀) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 1 (tabla 21).

TABLA 21. CI₅₀ DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA DE LOS "O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZODIOXEPÍNICA" EN LAS 4 LÍNEAS CELULARES.

| NOMBRE | ESTRUCTURA | CI ₅₀ (µM) | | | |
|--------|---|-----------------------|-------------|-------------|--------------|
| | | MCF-7 | MCF-10A | HT-29 | IEC-6 |
| MB-90A |  | 4,63 ± 0,02 | 4,17 ± 0,03 | 1,90 ± 0,01 | 11,47 ± 3,2 |
| MB-90B |  | 2,74 ± 0,31 | 9,63 ± 1,60 | 3,01 ± 0,19 | 11,70 ± 0,03 |
| KS-47A |  | 4,40 ± 0,88 | 0,55 ± 0,01 | 0,59 ± 0,11 | 8,2 ± 1,04 |
| KS-47B |  | 1,28 ± 0,61 | 0,81 ± 0,01 | 2,41 ± 0,75 | 3,76 ± 1,01 |

3.2. CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI₅₀) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 2 (tabla 22).

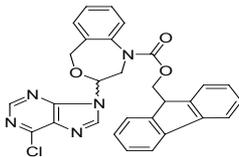
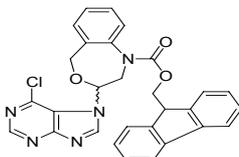
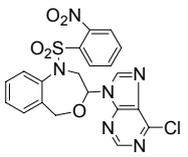
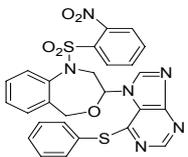
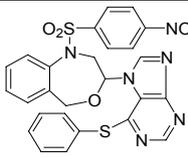
TABLA 22. CI₅₀ DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA DE LOS “O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 4,1-BENZOXATIEPÍNICA” EN LAS 4 LÍNEAS CELULARES.

| NOMBRE | ESTRUCTURA | CI ₅₀ (μM) | | | |
|---------|---|-----------------------|-------------|--------------|--------------|
| | | MCF-7 | MCF-10A | HT-29 | IEC-6 |
| MN-80C |  | 2,58 ± 0,08 | 5,84 ± 0,48 | 10,48 ± 1,03 | 10,36 ± 0,01 |
| MN-84D |  | 5,46 ± 0,02 | 1,85 ± 0,10 | 0,92 ± 0,04 | 11,7 ± 2,40 |
| MN-116B |  | 3,55 ± 1,10 | 1,68 ± 0,12 | 2,85 ± 0,26 | 5,46 ± 0,34 |

3.3. CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI₅₀) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 3 (tabla 23).

Las CI₅₀ de los compuestos MDG-884A2-2 para la línea celular IEC-6 y MDG-958A para las líneas celulares MCF-10A e IEC-6 no se calcularon debido a la falta de solución stock de las mismas, consecuencia del bajo rendimiento y dificultad en la síntesis de estos fármacos.

TABLA 23. Cl_{50} DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA DE LOS "O,O-ACETALES Y O,N-CETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZOXAZEPÍNICA" EN LAS 4 LÍNEAS CELULARES

| NOMBRE | ESTRUCTURA | Cl_{50} (μ M) | | | |
|-------------|---|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | | MCF-7 | MCF-10A | HT-29 | IEC-6 |
| MDG-828B |  | 0,67 \pm 0,18 | 2,14 \pm 1,10 | 3,38 \pm 0,61 | 10,07 \pm 1,67 |
| MDG-828C |  | 0,84 \pm 0,09 | 5,90 \pm 1,48 | 38,17 \pm 9,85 | 0,94 \pm 0,10 |
| MDG-884A2-2 |  | 2,10 \pm 0,69 | 4,76 \pm 0,30 | 0,77 \pm 0,30 | - |
| MDG-942B |  | 2,59 \pm 0,57 | 9,05 \pm 2,12 | 5,97 \pm 1,65 | 12,17 \pm 0,80 |
| MDG-958A |  | 0,86 \pm 0,12 | - | 31,07 \pm 3,11 | - |

3.4. CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (CI_{50}) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 6 (tabla 24).

TABLA 24. CI_{50} DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA DE LOS "O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL ANTRANÍLICO" EN LAS 4 LÍNEAS CELULARES.

| NOMBRE | ESTRUCTURA | CI_{50} (μM) | | | |
|----------|------------|-----------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | MCF-7 | MCF-10A | HT-29 | IEC-6 |
| MDG-884D | | 3,25 \pm 0,23 | 6,23 \pm 1,90 | 3,28 \pm 0,80 | 12,09 \pm 1,20 |
| MDG-898D | | 1,09 \pm 0,03 | 37,67 \pm 6,50 | 52,14 \pm 3,57 | 11,36 \pm 3,10 |

3.5. COMPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS 50 (IC_{50}) DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS SOBRE LAS CUATRO LÍNEAS CELULARES

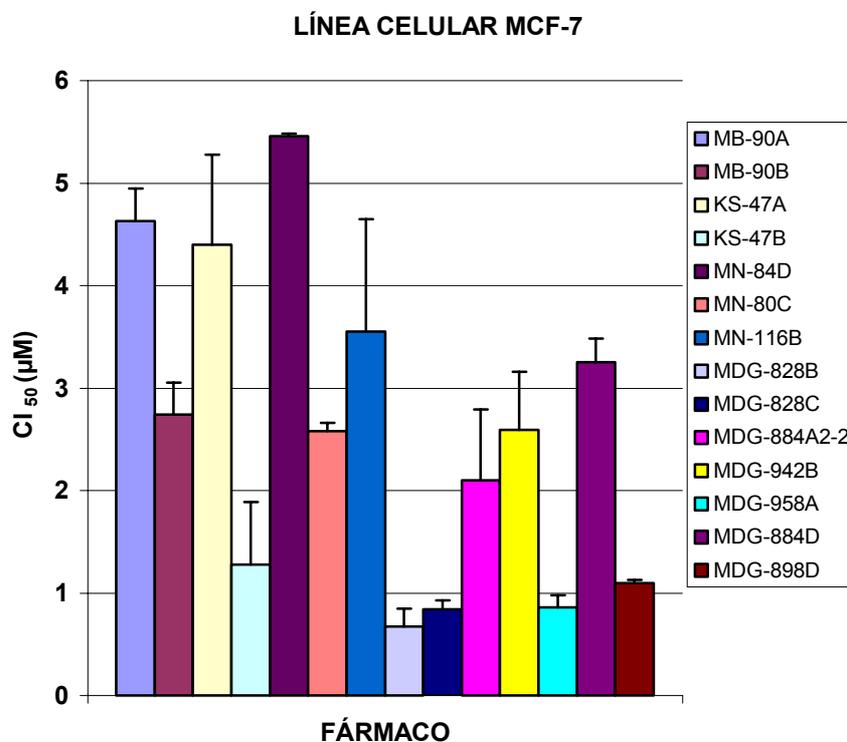


FIGURA 14. HISTOGRAMA COMPARATIVO DE LA CI_{50} DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7. REPRESENTAMOS EL VALOR MEDIO DE 4 DETERMINACIONES Y LA BARRA VERTICAL EN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

Las cuatro familias seleccionadas mostraron valores muy homogéneos de citotoxicidad sobre la línea celular MCF-7. Los compuestos de la familia 3 fueron los que mostraron un mayor efecto sobre las células de esta línea y, por el contrario, la familia 2 fue la que mostró menor capacidad tóxica, aunque siempre dentro de un rango de IC_{50} menor a $6 \mu\text{M}$ (figura 14).

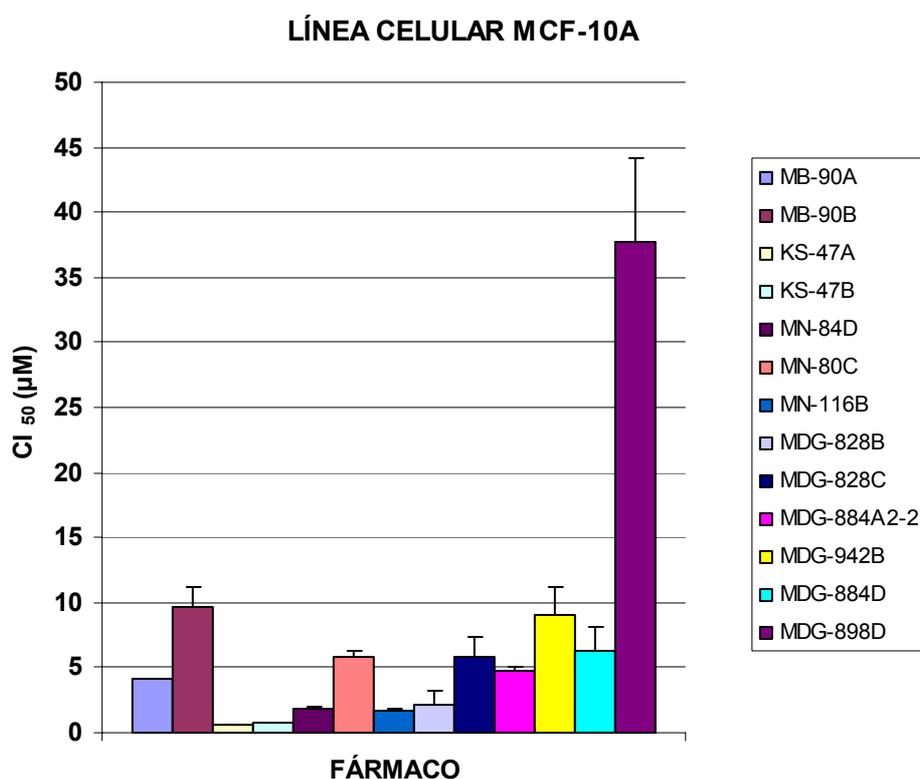


FIGURA 15. HISTOGRAMA COMPARATIVO DE LA CI_{50} DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A. REPRESENTAMOS EL VALOR MEDIO DE 4 DETERMINACIONES Y EN LA BARRA VERTICAL LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

Al contrario de lo que ocurrió en la línea celular MCF-7, en las células MCF-10A los compuestos de la familia 2 fueron los que mostraron tener mayor efecto nocivo para esta línea celular. También fue destacable el efecto citotóxico que se observó en la familia 1, donde vimos que la segunda pareja de isómeros tuvo un efecto muy tóxico mientras que la primera mostró una actividad más leve. En la familia 6 fue donde encontramos los valores más elevados de CI_{50} , hasta el extremo de $37,67 \mu\text{M}$ en el fármaco MDG-898D (figura 15)

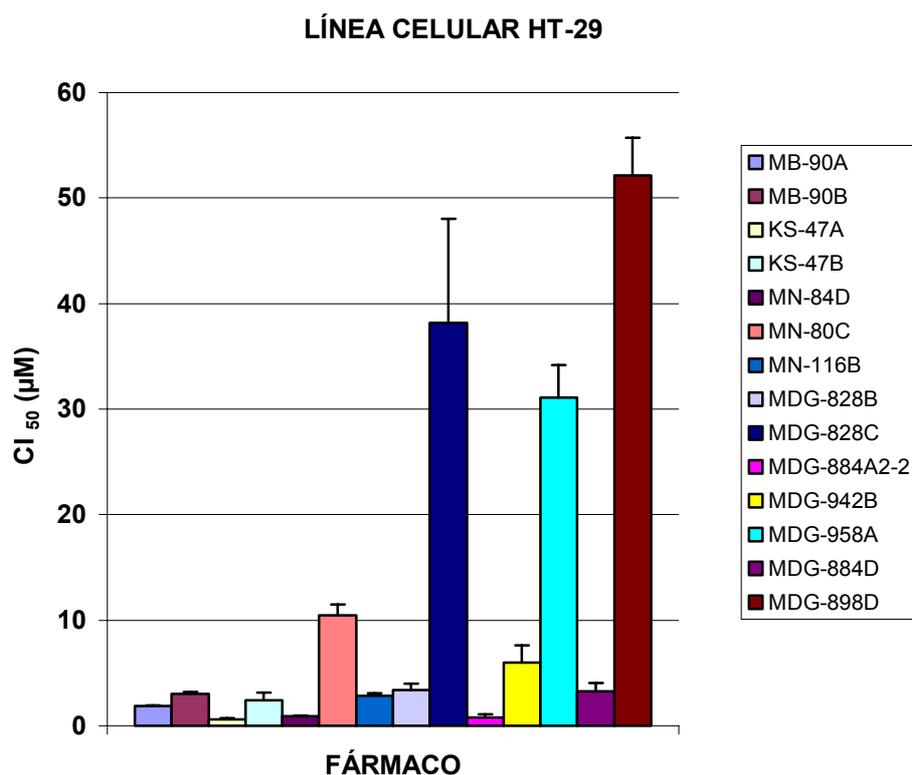


FIGURA 16. HISTOGRAMA COMPARATIVO DE LA CI₅₀ DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS EN LA LÍNEA CELULAR HT-29. REPRESENTAMOS EL VALOR MEDIO DE 4 DETERMINACIONES Y LA BARRA VERTICAL LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

En caso de la línea celular HT-29 fue la familia 1 fue la que mostró mayor capacidad de inducción de citotoxicidad, llegando hasta valores de 0,59 µM en el caso del compuesto KS-47A. El caso opuesto lo encontramos en los fármacos de la familia 6 que mostraron valores mucho más elevados de CI₅₀. Dentro de las familias 2 y 3 encontramos tanto compuestos con gran actividad citotóxica como otros que mostraron un efecto más moderado (figura 16).

Sobre las células IEC-6, salvo el compuesto MDG-828C perteneciente a la familia 3, todas las familias de fármacos mostraron valores muy similares de citotoxicidad (figura 17).

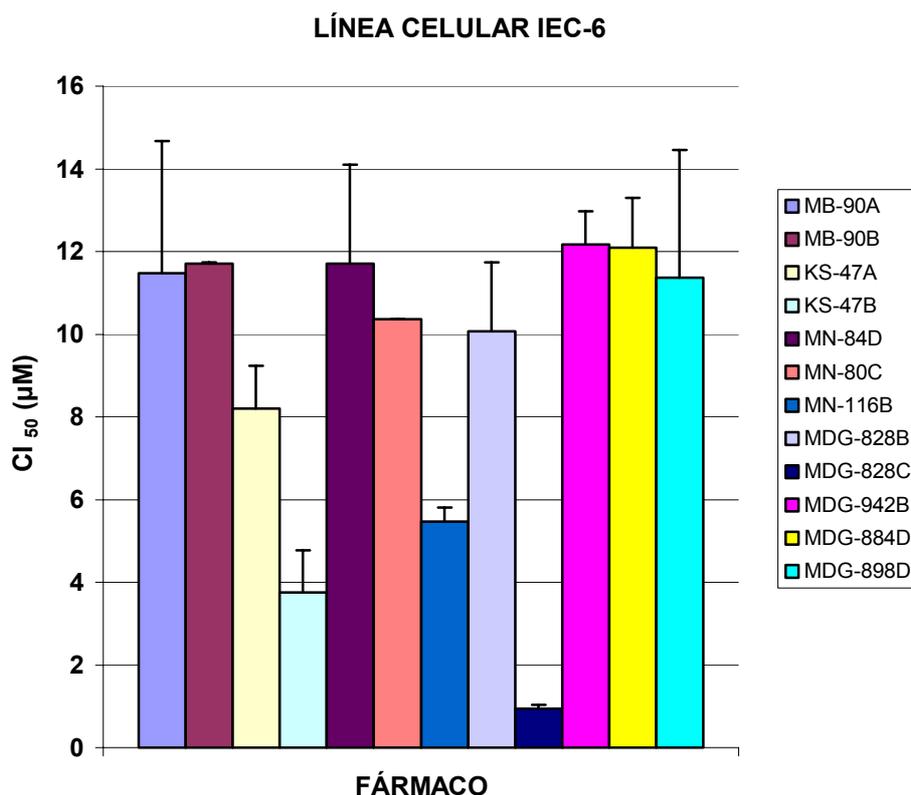


FIGURA 17. HISTOGRAMA COMPARATIVO DE LA CI_{50} DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6. REPRESENTAMOS EL VALOR MEDIO DE 4 DETERMINACIONES Y EN LA BARRA VERTICAL LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

3.6. ÍNDICES TERAPÉUTICOS (IT) *IN VITRO* DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 1

El índice terapéutico ó IT constituye una medida del margen de seguridad de un medicamento. Se expresa numéricamente como una relación entre la dosis del medicamento que causa la muerte (dosis letal o DL) o un efecto nocivo en una proporción "x" de la muestra y la dosis que causa el efecto terapéutico deseado (dosis efectiva o DE) en la misma o mayor proporción "y" de la muestra.

Este concepto se puede formular como:

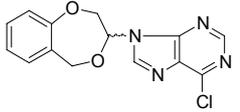
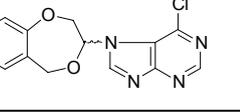
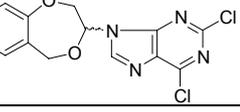
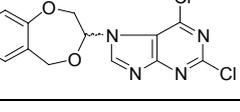
$$IT = DL_{50}/DE_{50}$$

donde el número 50 significa el 50% de la población. El margen de seguridad es tanto mayor cuanto mayor es el valor del índice, siendo extremadamente reducido, y por tanto muy peligroso, el consumo del medicamento cuando el valor se aproxima a 1.

De forma análoga, en nuestro caso hemos definido el índice terapéutico *in vitro* o experimental de un fármaco como el cociente entre la CI_{50} de la línea celular normal y la CI_{50} de ese mismo compuesto en la respectiva línea celular tumoral. Nuestro interés se centró en comprobar la selectividad y especificidad de los compuestos sobre células tumorales frente a las normales, destacando aquellos compuestos que presentaron una menor actividad citotóxica frente a células normales. Del mismo modo, el IT *in vitro* fue de utilidad para comparar la mayor o menor efectividad de los fármacos sobre las líneas de estirpe mamaria e intestinal.

Comprobamos como todos los compuestos de esta familia mostraban valores elevados de IT cuando se probaron sobre líneas de estirpe intestinal, lo cual nos indica una mayor efectividad de éstos sobre ésta comparada con la de mama. Además, en el caso de la estirpe mamaria los valores de IT fueron, en algunos compuestos, menores a 1 lo cual nos mostró que estos fármacos poseían una mayor toxicidad sobre las células epiteliales mamarias normales (tabla 25).

TABLA 25. ÍNDICE TERAPÉUTICO DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA DE LOS "O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZODIOXEPÍNICA" EN LAS LÍNEAS DE ESTIRPE MAMARIA Y DE COLON.

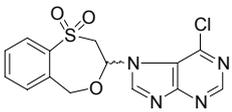
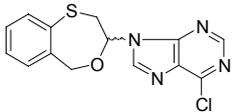
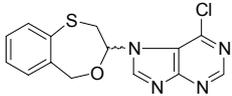
| NOMBRE | ESTRUCTURA | IT ^a | |
|--------|---|-----------------|--------------------|
| | | ESTIRPE MAMARIA | ESTIRPE INTESTINAL |
| MB-90A |  | 0,9 | 6,04 |
| MB-90B |  | 3,51 | 3,89 |
| KS-47A |  | 0,125 | 13,9 |
| KS-47B |  | 0,63 | 1,56 |

^a *In vitro* IT mamaria = Cl_{50} MCF-10A/ Cl_{50} MCF-7; *In vitro* TI intestinal = Cl_{50} IEC-6/ Cl_{50} HT-29.

3.7. ÍNDICES TERAPÉUTICOS (IT) *IN VITRO* DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 2

Dos de los compuestos de esta familia, los isómeros MN-84D y MN-116B, al igual que en el caso anterior mostraron ser muy selectivos sobre las células tumorales intestinales y, por el contrario, nada selectivos cuando se trataba de células de estirpe mamaria. El otro representante de esta familia, MN-80C, tuvo un comportamiento totalmente contrario a los anteriores, es decir, mostró una mayor selectividad sobre las células tumorales de mama en comparación con las intestinales (tabla 26).

TABLA 26. ÍNDICE TERAPÉUTICO DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA DE LOS "O,O-ACETALES Y O,N-ACETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 4,1-BENZOXATIEPÍNICA" EN LAS LÍNEAS DE ESTIRPE MAMARIA E INTESTINAL.

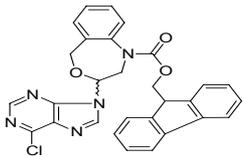
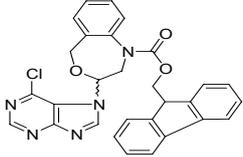
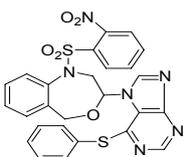
| NOMBRE | ESTRUCTURA | IT ^a | |
|---------|---|-----------------|--------------------|
| | | ESTIRPE MAMARIA | ESTIRPE INTESTINAL |
| MN-80C |  | 2,26 | 0,99 |
| MN-84D |  | 0,34 | 12,7 |
| MN-116B |  | 0,47 | 1,90 |

^a *In vitro* IT mamaria = Cl_{50} MCF-10A/ Cl_{50} MCF-7; *In vitro* TI intestinal = Cl_{50} IEC-6/ Cl_{50} HT-29.

3.8. ÍNDICES TERAPÉUTICOS (IT) *IN VITRO* DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 3

En esta familia encontramos los compuestos MDG-828B y MDG-942B que mostraron sobre las 2 estirpes estudiadas valores muy similares de IT, siendo en ambos casos, además, selectivos frente a la línea celular tumoral. Por otro lado, el fármaco MDG- 828C se manifestó como un compuesto muy efectivo frente a células tumorales de mama, pero por el contrario muy tóxico para las células intestinales normales si lo comparamos con las tumorales (tabla 27).

TABLA 27. ÍNDICE TERAPÉUTICO DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA DE LOS “O,O-ACETALES Y O,N-CETALES CÍCLICOS DERIVADOS DE LA ESTRUCTURA 1,4-BENZOXAZEPÍNICA” EN LAS LÍNEAS DE ESTIRPE MAMARIA E INTESTINAL.

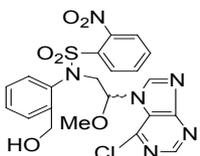
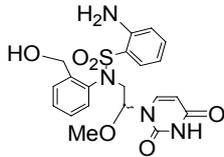
| NOMBRE | ESTRUCTURA | IT ^a | |
|----------|--|-----------------|--------------------|
| | | ESTIRPE MAMARIA | ESTIRPE INTESTINAL |
| MDG-828B |  | 3,2 | 2,98 |
| MDG-828C |  | 7,02 | 0,02 |
| MDG-942B |  | 3,5 | 2,04 |

^a *In vitro* IT mamaria = CI_{50} MCF-10A/ CI_{50} MCF-7; *In vitro* TI intestinal = CI_{50} IEC-6/ CI_{50} HT-29.

3.9. ÍNDICES TERAPÉUTICOS (IT) *IN VITRO* DE LOS FÁRMACOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA 6

Los dos compuestos pertenecientes a esta familia tuvieron un comportamiento diferente, pero en ambos casos interesante. Así, MDG-884D se mostró más citotóxico cuando se empleó frente a células tumorales intestinales, aunque sobre las de mama también manifestó cierto efecto citotóxico selectivo de células tumorales. Por otro lado, MDG-898D se comportó como un fármaco altamente selectivo y efectivo cuando se trataba de células mamarias, mientras que tuvo un efecto totalmente contrario cuando se trataban de líneas celulares intestinales (tabla 28).

TABLA 28. ÍNDICE TERAPÉUTICO DE LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS DE LA FAMILIA DE LOS "O,N-ACETALES ACÍCLICOS DERIVADOS DEL ALCOHOL ANTRANÍLICO" EN LAS LÍNEAS DE ESTIRPE MAMARIA E INTESTINAL.

| NOMBRE | ESTRUCTURA | IT ^a | |
|----------|---|-----------------|--------------------|
| | | ESTIRPE MAMARIA | ESTIRPE INTESTINAL |
| MDG-884D |  | 1,92 | 3,68 |
| MDG-898D |  | 34,5 | 0,22 |

^a *In vitro* IT mamaria = Cl_{50} MCF-10A/ Cl_{50} MCF-7; *In vitro* TI intestinal = Cl_{50} IEC-6/ Cl_{50} HT-29.

Para posteriores análisis los compuestos MDG-828C y MDG-942 B fueron descartados en el primer caso por presentar un índice terapéutico bajo y la dificultad de su síntesis y en el segundo caso por mostrar los valores de IC_{50} muy elevados.

4. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR

Para el estudio de las modificaciones en el ciclo celular, las 4 líneas celulares se indujeron con los compuestos seleccionados a sus respectivas Cl_{50} durante 48 horas, usando como control la línea parental sin adición de fármaco.

Para cada línea celular mostramos a continuación los valores resultantes de la media de dos ensayos junto su desviación estándar asociada.

4.1. LÍNEA CELULAR MCF-7

En esta línea celular las cuatro familias mostraron patrones similares de modulación en la distribución de las células a lo largo de las distintas fases del ciclo celular. Aún así, encontramos pequeñas diferencias en el comportamiento

de cada familia de compuestos. De este modo, la familia 6 acumuló una mayor cantidad de células en las fases G_0/G_1 y G_2/M del ciclo celular, las familias 1, 2 y 3 lo hicieron mayoritariamente en la fase G_2/M (tabla 29).

TABLA 29. MEDIA DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR JUNTO CON SU RESPECTIVA DESVIACIÓN ESTÁNDAR, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

| | G_0/G_1 (%) | S (%) | G_2/M (%) |
|-----------------|---------------------------------|--------------|-------------------------------|
| CONTROL | 57,26 ± 5,13 | 37,25 ± 6,35 | 5,5 ± 0,67 |
| MB-90A | 62,97 ± 5,67 | 30,02 ± 0,74 | 7,01 ± 1,94 |
| MB-90B | 60,06 ± 2,51 | 28,09 ± 3,20 | 11,85 ± 3,71 |
| KS-47A | 65,84 ± 2,59 | 13,77 ± 0,06 | 20,39 ± 2,66 |
| KS-47B | 58,61 ± 4,75 | 25,22 ± 6,39 | 16,17 ± 1,64 |
| MN-80C | 62,72 ± 3,80 | 30,19 ± 4,94 | 7,10 ± 1,14 |
| MN-84D | 60,9 ± 4,26 | 28,51 ± 6,94 | 10,59 ± 2,19 |
| MN-116B | 60,82 ± 3,69 | 21,36 ± 0,06 | 17,83 ± 3,67 |
| MDG-828B | 64,39 ± 0,34 | 22,43 ± 2,69 | 13,18 ± 2,35 |
| MDG-884D | 65,09 ± 0,11 | 23,94 ± 4,87 | 10,98 ± 2,76 |
| MDG-898D | 64,19 ± 0,64 | 22,68 ± 0,63 | 13,14 ± 0,01 |

A nivel individual, los datos más destacados se obtuvieron con el compuesto KS-47A, en el que se observó una disminución en el porcentaje de células de la fase S con respecto al control hasta valores de un 13,77% a costa de un incremento significativo de los valores de G_2/M (figura 19 B). Por el contrario, los fármacos MN-80 C y KS-47B (figura 19 C) fueron los que mostraron un patrón más parecido al control (figura 18; tabla 29).

LÍNEA CELULAR MCF-7

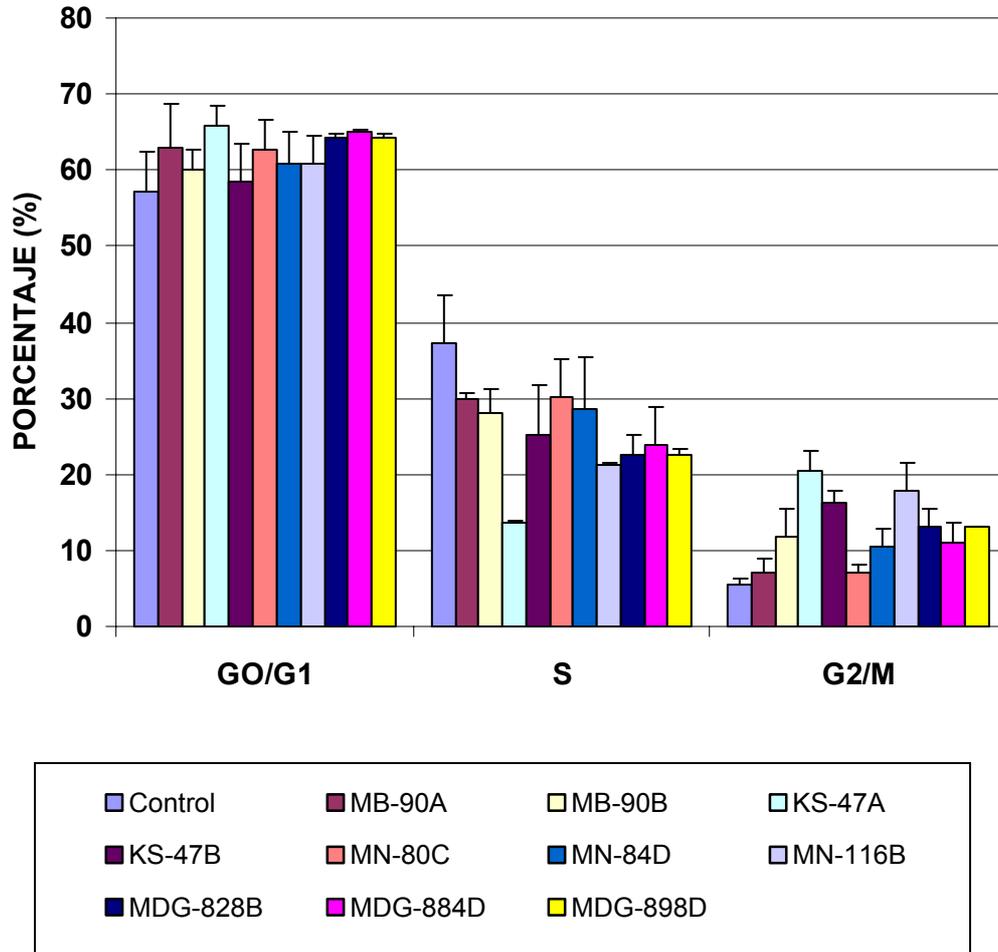


FIGURA 18. PORCENTAJES DE CÉLULAS MCF-7 ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR DEBIDO AL EFECTO DE LOS DISTINTOS FÁRMACOS. REPRESENTAMOS EL VALOR MEDIO DE 2 DETERMINACIONES Y EN LA BARRA VERTICAL LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

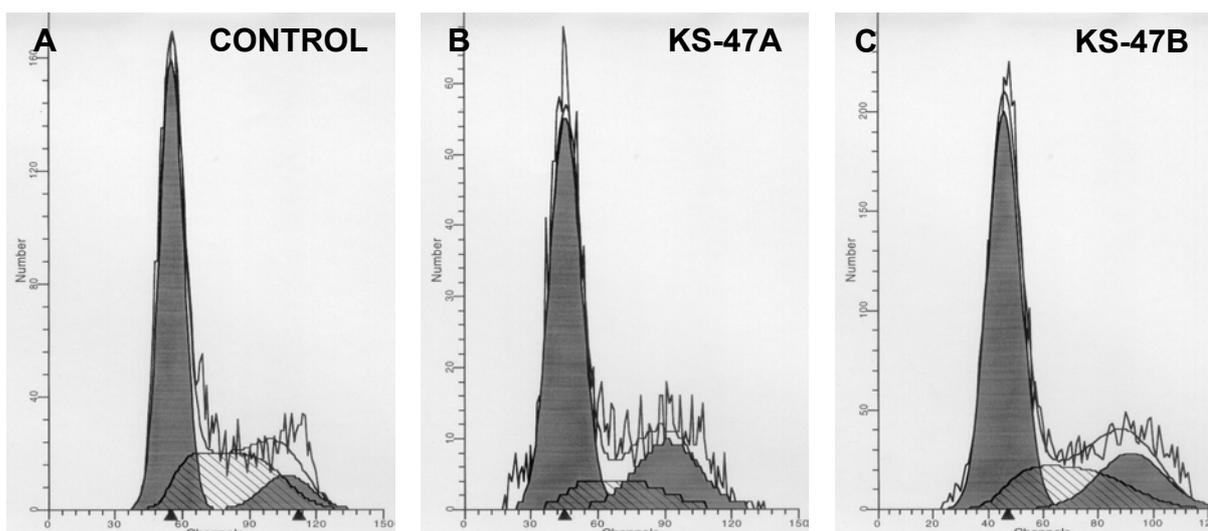


FIGURA 19. ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE FACSCAN. NÚMERO DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN. A) CÉLULAS MCF-7 NO INDUCIDAS CON FÁRMACOS, B) CÉLULAS INDUCIDAS CON KS-47A, C) CÉLULAS INDUCIDAS CON KS-47B.

4.2 LÍNEA CELULAR MCF-10A

En general, las cuatro familias de compuestos acumularon células en la fase G_0/G_1 del ciclo celular, a excepción del compuesto de la familia 3 que no presentó modificaciones significativas con respecto al control (tabla 30).

TABLA 30. MEDIA DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR JUNTO CON SU RESPECTIVA DESVIACIÓN ESTÁNDAR, EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A.

| | G_0/G_1 (%) | S (%) | G_2/M (%) |
|-----------------|---------------|--------------|--------------|
| CONTROL | 57,83 ± 5,35 | 10,45 ± 0,23 | 31,72 ± 0,15 |
| MB-90A | 80,93 ± 5,34 | 6,83 ± 1,95 | 12,69 ± 0,94 |
| MB-90B | 65,35 ± 2,2 | 0,5 ± 0,12 | 34,15 ± 3,85 |
| KS-47A | 61,55 ± 4,84 | 7,87 ± 1,58 | 30,58 ± 6,77 |
| KS-47B | 67,56 ± 4,01 | 7,91 ± 1,00 | 24,53 ± 2,05 |
| MN-80C | 67,94 ± 4,56 | 0,82 ± 0,32 | 31,24 ± 3,33 |
| MN-84D | 64,62 ± 7,73 | 8,9 ± 0,02 | 26,48 ± 3,33 |
| MN-116B | 64,00 ± 2,95 | 6,42 ± 1,31 | 29,57 ± 0,23 |
| MDG-828B | 59,16 ± 5,67 | 12,56 ± 3,85 | 28,28 ± 2,68 |
| MDG-884D | 66,12 ± 0,05 | 12,33 ± 1,04 | 21,56 ± 0,84 |
| MDG-898D | 66,91 ± 6,83 | 4,65 ± 0,02 | 28,44 ± 2,22 |

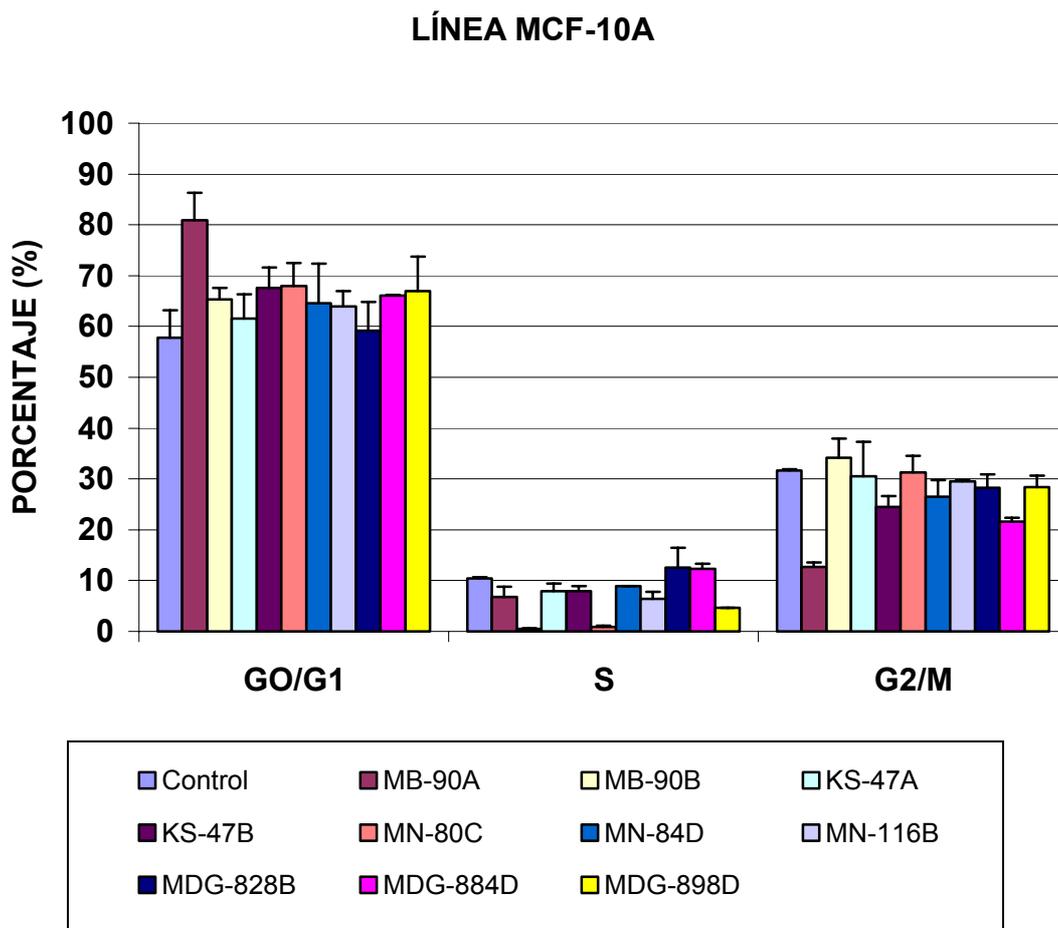


FIGURA 20. PORCENTAJES DE CÉLULAS MCF-10A ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR DEBIDO AL EFECTO DE LOS DISTINTOS FÁRMACOS. REPRESENTAMOS EL VALOR MEDIO DE 2 DETERMINACIONES Y EN LA BARRA VERTICAL LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

Podemos comprobar como el compuesto MB-90A (figura 21 B) acumuló más del 80 % de sus células dentro de la fase G_0/G_1 , asociado a una gran disminución en la cantidad dentro de la fase G_2/M . Por el contrario, el fármaco MDG-828B (figura 21 E) disminuyó la fase G_0/G_1 hasta un 59,16%, mientras que la fase G_2/M mostró valores casi concordantes con el control (figura 21 A). También cabe destacar los compuestos MB-90B y MN-80C (figura 21 C y 21 D) en las que se obtuvieron un porcentaje de eventos dentro de la fase S que descendían hasta valores de casi cero. El resto de los fármacos mostraron un patrón muy similar dentro de las diferentes fases de ciclo celular (tabla 30; figura 20).

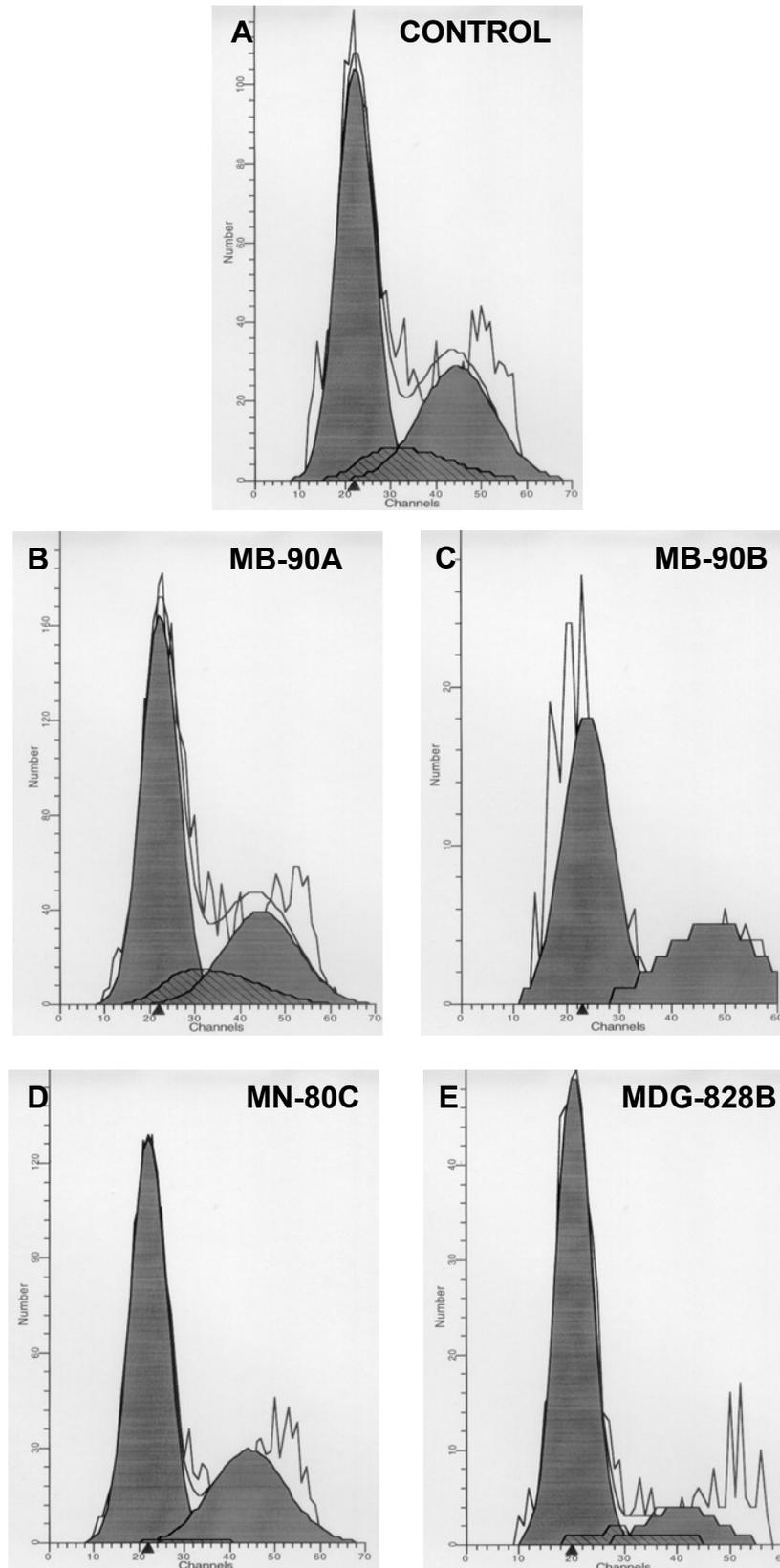


FIGURA 21. ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE FACSCAN. NÚMERO DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN. A) CÉLULAS MCF-10A NO INDUCIDAS CON FÁRMACOS, B) CÉLULAS INDUCIDAS CON KS-47A, C) CÉLULAS INDUCIDAS CON KS-47B, D) CÉLULAS INDUCIDAS CON MN-80C, E) CÉLULAS INDUCIDAS CON MDG-828B.

4.3 LÍNEA CELULAR HT-29

En esta ocasión todas las familias de compuestos se comportaron de modo similar sobre el ciclo celular, deteniendo las células en la fase S. La familia 6 fue la que provocó una mayor disminución de células en la fase G_0/G_1 del ciclo y la familia 1 la que mayor aumento de células en fase S evidenció. Como en los casos anteriores, las familias 2 y 3 tuvieron una acción más suave sobre la modulación en la distribución dentro del ciclo (tabla 31).

TABLA 31. MEDIA DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR JUNTO CON SU RESPECTIVA DESVIACIÓN ESTÁNDAR, EN LA LÍNEA CELULAR HT-29.

| | G_0/G_1 (%) | S (%) | G_2/M (%) |
|-----------------|---------------------------------|--------------|-------------------------------|
| CONTROL | 77,36 ± 1,45 | 7,96 ± 2,64 | 14,69 ± 4,09 |
| MB-90A | 76,37 ± 0,43 | 20,56 ± 1,21 | 3,08 ± 0,78 |
| MB-90B | 74,84 ± 1,81 | 7,77 ± 3,64 | 17,40 ± 1,83 |
| KS-47A | 74,69 ± 3,05 | 10,33 ± 4,97 | 15,00 ± 4,03 |
| KS-47B | 74,12 ± 3,29 | 14,95 ± 5,51 | 10,94 ± 2,80 |
| MN-80C | 76,37 ± 1,05 | 9,17 ± 0,77 | 14,46 ± 3,72 |
| MN-84D | 73,70 ± 4,43 | 19,78 ± 0,03 | 6,53 ± 0,46 |
| MN-116B | 74,76 ± 0,61 | 7,81 ± 2,32 | 17,43 ± 2,93 |
| MDG-828B | 74,68 ± 0,64 | 14,87 ± 1,63 | 10,46 ± 0,98 |
| MDG-884D | 71,58 ± 0,86 | 12,71 ± 3,90 | 15,73 ± 4,76 |
| MDG-898D | 75,96 ± 0,50 | 6,60 ± 0,83 | 17,46 ± 1,34 |

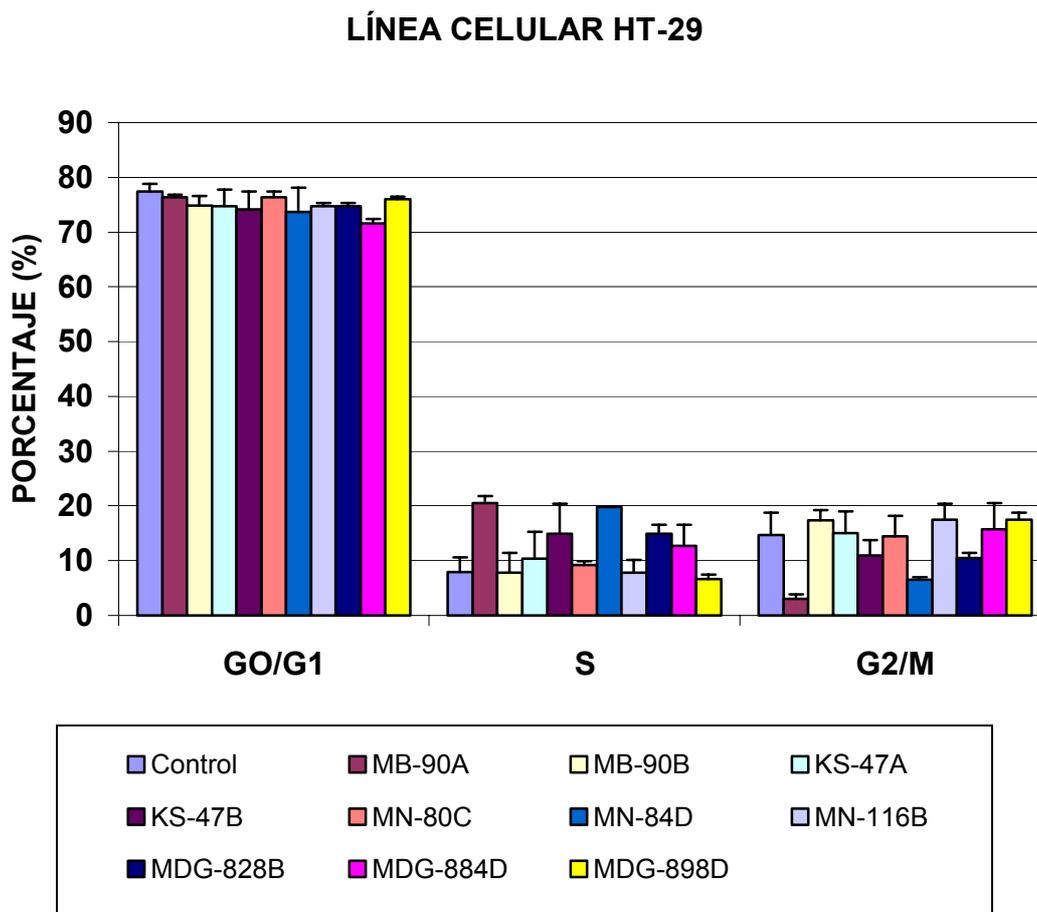


FIGURA 22. PORCENTAJES DE CÉLULAS HT-29 ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR DEBIDO AL EFECTO DE LOS DISTINTOS FÁRMACOS. REPRESENTAMOS EL VALOR MEDIO DE 2 DETERMINACIONES Y EN LA BARRA VERTICAL LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

Como se observa en la figura 22 destaca la acción de los compuestos MB-90A y MN-84 D (figuras 23 B y 23 C, respectivamente) que acumularon un gran porcentaje de las células dentro de la fase S, acompañado de una disminución considerable de la fase G₂/M. Los demás fármacos mostraron unos valores muy similares a los obtenidos en el control sin inducir (tabla 31; figura 22).

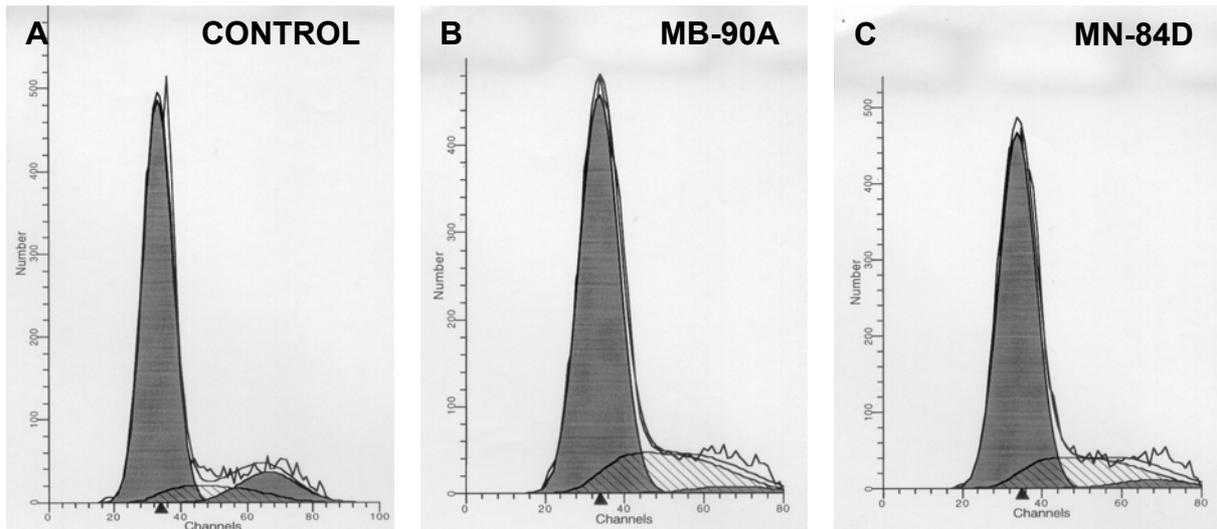


FIGURA 23. ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE FACSCAN. NÚMERO DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR TRAS 48 HORAS INDUCCIÓN. A) CÉLULAS MCF-7 NO INDUCIDAS CON FÁRMACOS, B) CÉLULAS INDUCIDAS CON MB-90A, C) CÉLULAS INDUCIDAS CON MN-84D.

4.4 LÍNEA CELULAR IEC-6

Sobre la línea celular IEC-6 el efecto de las diferentes familias de fármacos fue más heterogéneo. En términos generales, la familia 2, salvo en el caso de MN-84D, fue la que mayor cantidad de células acumuló en la fase G_0/G_1 y la familia 3 la que menos. Dentro de las familias 1 y 6 encontramos tanto compuestos que provocan aumento de esta fase como otros que tiene el efecto contrario. La mayoría de los compuestos provocó aumento de la fase S siendo el representante de la familia 3 el que provocó mayor acúmulo, y los dos isómeros de la familia 2 los que menos. La fase G_2/M tuvo un comportamiento muy variable, incluso si comparamos fármacos de la misma familia; así, encontramos que en la familia 3 el número de células en esta fase aumento considerablemente mientras que en la familia 2 la tendencia fue a que ésta disminuyera (tabla 32).

TABLA 32. MEDIA DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR JUNTO CON SU RESPECTIVA DESVIACIÓN ESTÁNDAR, EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6.

| | G₀/G₁ (%) | S (%) | G₂/M (%) |
|-----------------|--|--------------|----------------------------|
| CONTROL | 81,42 ± 1,99 | 4,51 ± 1,70 | 14,07 ± 2,72 |
| MB-90A | 70,39 ± 6,00 | 7,54 ± 2,00 | 22,07 ± 4,49 |
| MB-90B | 78,13 ± 4,83 | 8,01 ± 3,38 | 13,86 ± 2,39 |
| KS-47A | 89,31 ± 1,17 | 3,53 ± 0,25 | 7,16 ± 0,43 |
| KS-47B | 78,11 ± 2,09 | 0,98 ± 0,26 | 20,92 ± 2,35 |
| MN-80C | 84,19 ± 1,00 | 9,3 ± 0,54 | 6,51 ± 0,47 |
| MN-84D | 70,08 ± 6,18 | 2,91 ± 0,73 | 27,02 ± 2,45 |
| MN-116B | 90,5 ± 1,83 | 2,98 ± 0,48 | 6,52 ± 2,39 |
| MDG-828B | 64,94 ± 0,47 | 9,18 ± 2,39 | 25,89 ± 7,86 |
| MDG-884D | 81,19 ± 2,74 | 4,79 ± 1,24 | 14,04 ± 3,98 |
| MDG-898D | 84,02 ± 2,72 | 9,84 ± 2,06 | 6,14 ± 1,50 |

LÍNEA CELULAR IEC-6

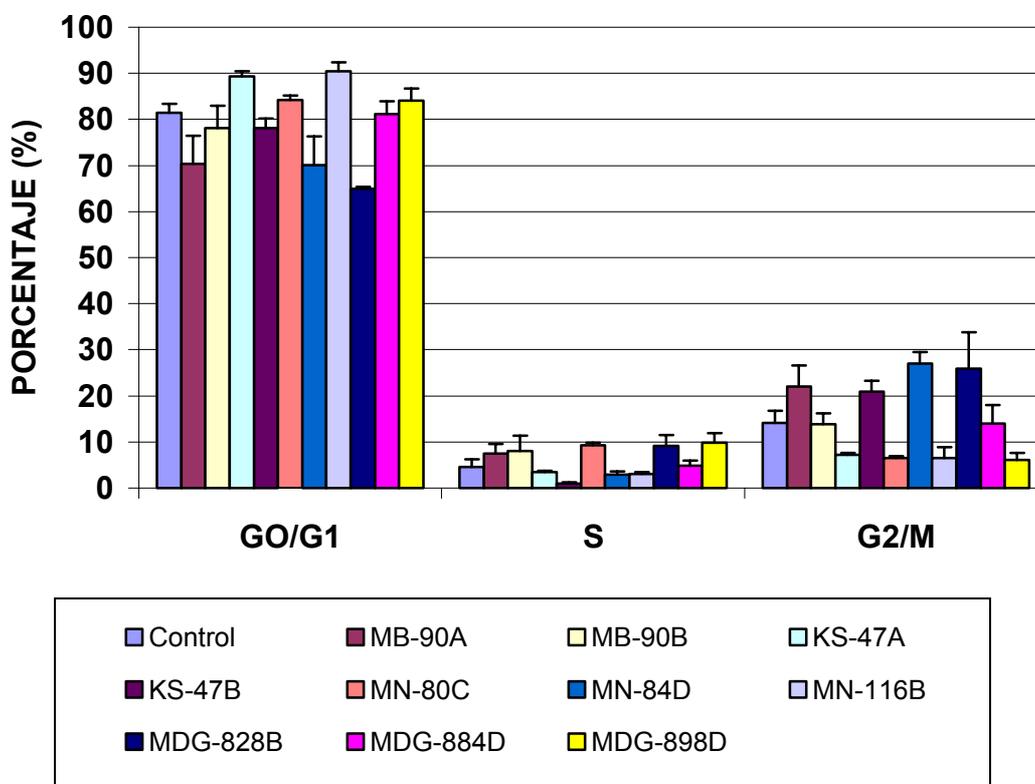


FIGURA 24. PORCENTAJES DE CÉLULAS IEC-6 ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR DEBIDO AL EFECTO DE LOS DISTINTOS FÁRMACOS. REPRESENTAMOS EL VALOR MEDIO DE 2 DETERMINACIONES Y EN LA BARRA VERTICAL LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

A nivel individual, como comentamos anteriormente, esta línea celular fue la que mostró una mayor variabilidad en la distribución de los porcentajes de células dentro de cada fase del ciclo celular. De este modo, encontramos fármacos que producían un aumento de la fase G_0/G_1 como el KS-47A (figura 25 B), MN-80C, MN116B y MDG-898D. Otros, sin embargo, produjeron arresto de las células en la fase G_2/M del ciclo, como fue el caso del MB-90A, KS-47B (figura 25 C), MN-84D y MDG-828B. Otros compuestos, el MB-90B, MN-80C, MDG-828B y MDG-898D incrementaron hasta el doble los valores de células en la fase S del ciclo con respecto al control (figura 24; tabla 32).

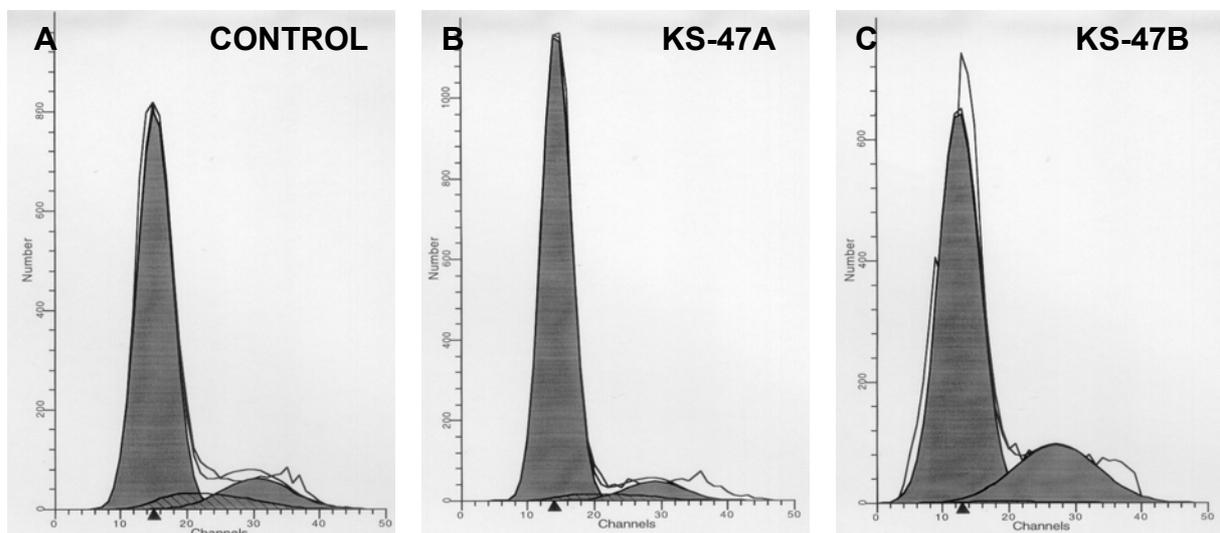


FIGURA 25. ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE FACSCAN. PORCENTAJE DE CÉLULAS ACUMULADAS EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO CELULAR TRAS 48 HORAS. DE INDUCCIÓN. A) CÉLULAS IEC-6 NO INDUCIDAS CON FÁRMACOS, B) CÉLULAS INDUCIDAS CON KS-47A, C) CÉLULAS INDUCIDAS CON KS-47B.

4.5. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR ENTRE LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

Para una mejor comprensión de la modulación que producían los diferentes compuestos seleccionados sobre el ciclo celular representamos, para cada línea celular, el porcentaje de células acumuladas en cada una de las fases del ciclo celular (figuras 26-37):

- Porcentaje de células acumuladas en la fase G_0/G_1 :

- Línea celular MCF-7 (figura 26):

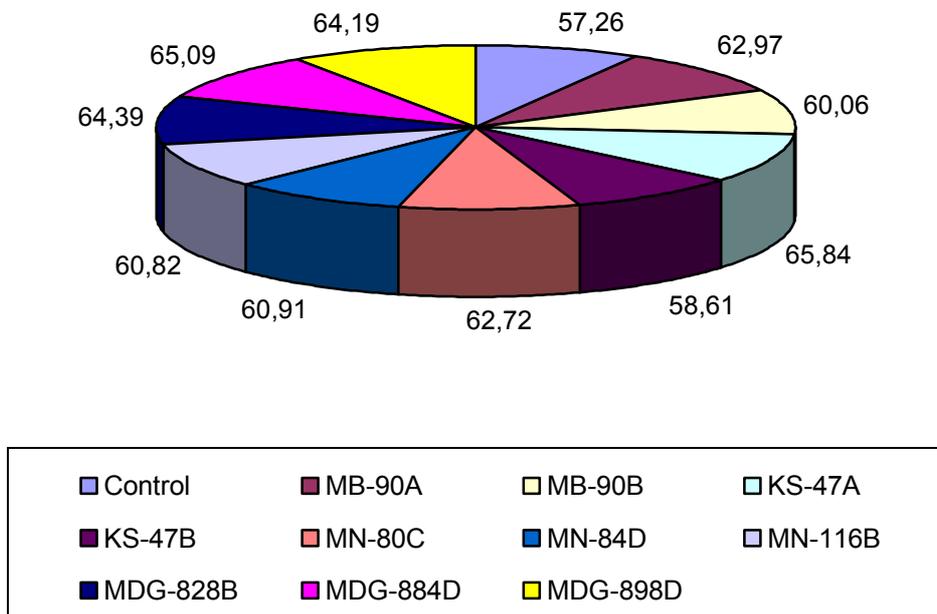


FIGURA 26. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS MCF-7 ACUMULADAS EN LA FASE G_0/G_1 DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular MCF-10A (figura 27):

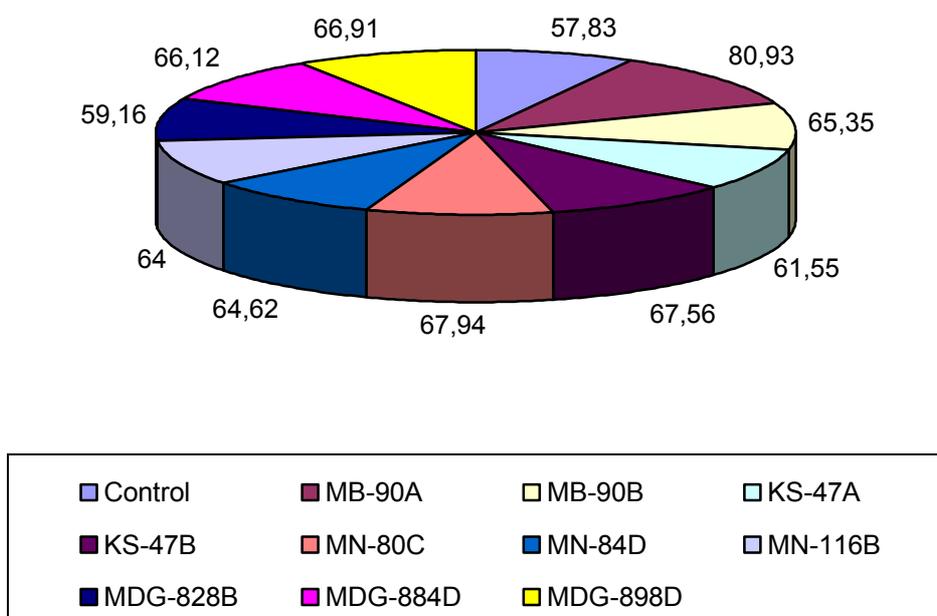


FIGURA 27. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS MCF-10A ACUMULADAS EN LA FASE G_0/G_1 DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular HT-29 (figura 28):

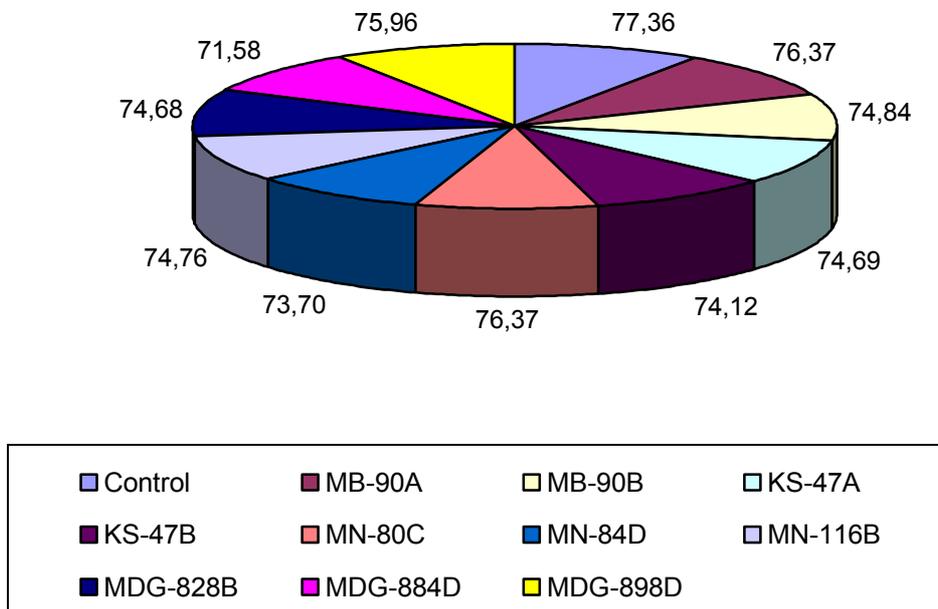


FIGURA 28. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS HT-29 ACUMULADAS EN LA FASE G₀/G₁ DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular IEC-6 (figura 29):

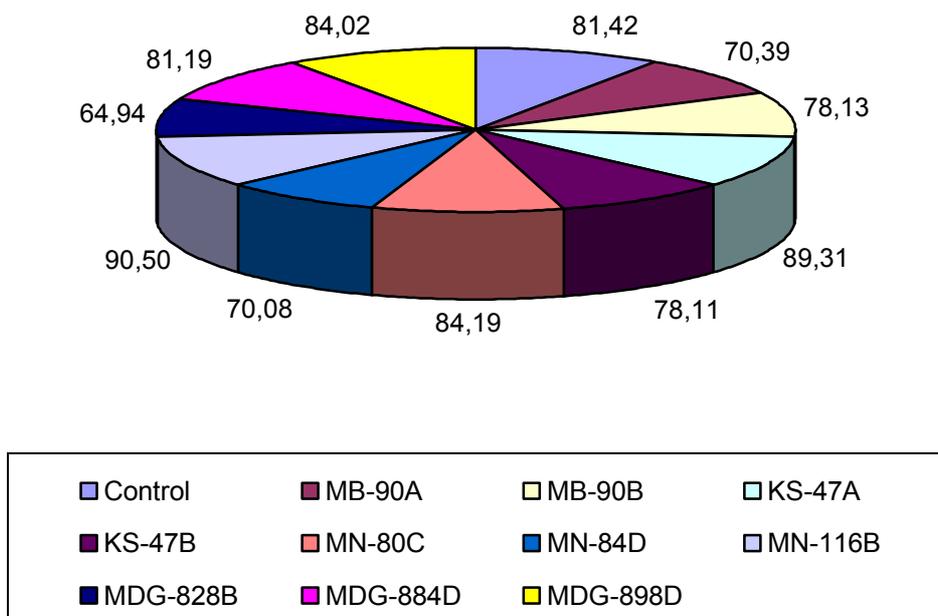


FIGURA 29. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS IEC-6 ACUMULADAS EN LA FASE G₀/G₁ DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Porcentaje de células acumuladas en la fase S:

- Línea celular MCF-7 (figura 30):

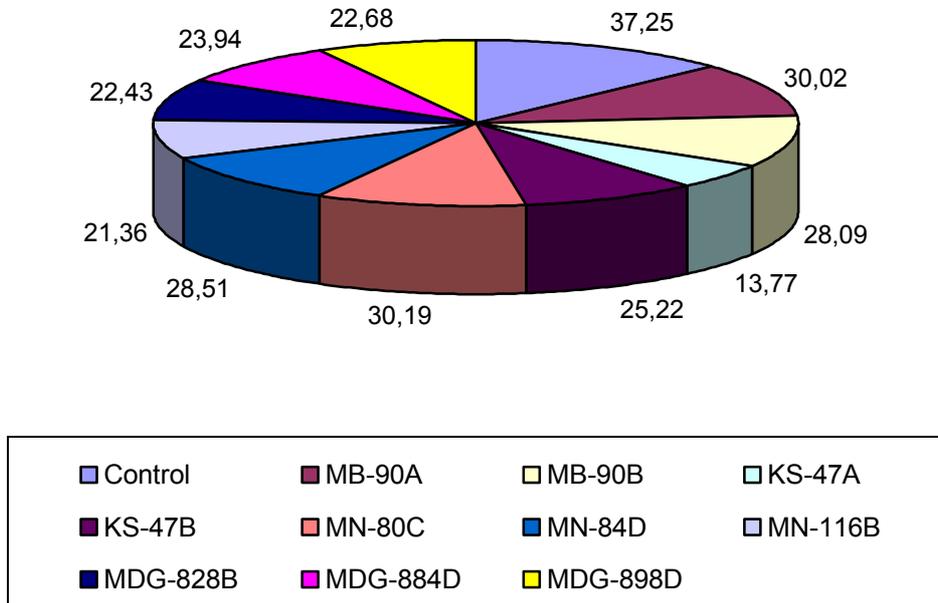


FIGURA 30. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS MCF-7 ACUMULADAS EN LA FASE G₂/M DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular MCF-10A (figura 31):

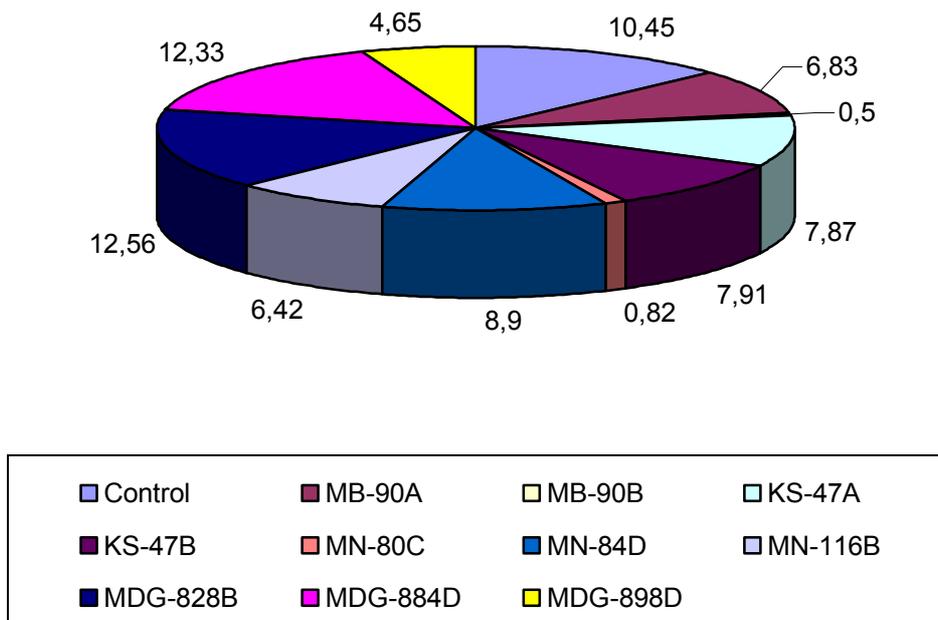


FIGURA 31. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR MCF-10A ACUMULADAS EN LA FASE S DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular HT-29 (figura 32):

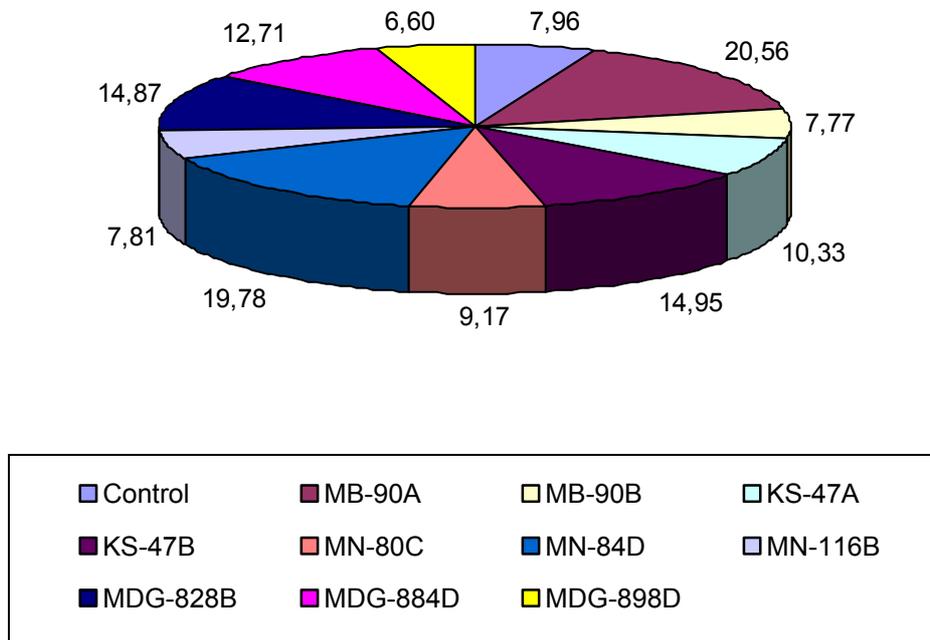


FIGURA 32. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR HT-29 ACUMULADAS EN LA FASE S DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular IEC-6 (figura 33):

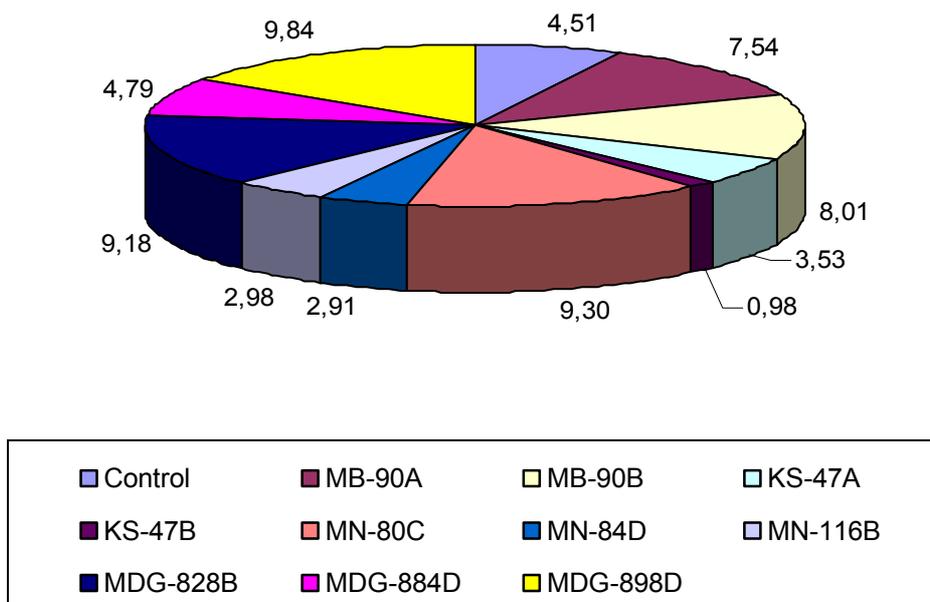


FIGURA 33. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS IEC-6 ACUMULADAS EN LA FASE S DEL CICLO CELULAR POR LOS DISTINTOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Porcentaje de células acumuladas en la fase G₂/M:
 - Línea celular MCF-7 (figura 34):

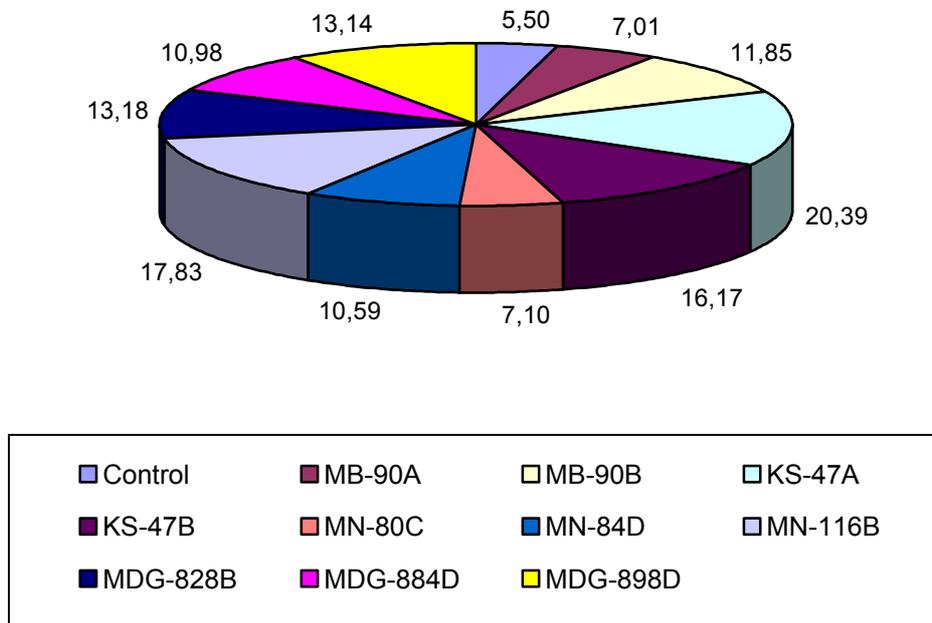


FIGURA 34. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS MCF-7 ACUMULADAS EN LA FASE G₂/M DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular MCF-10A (figura 35):

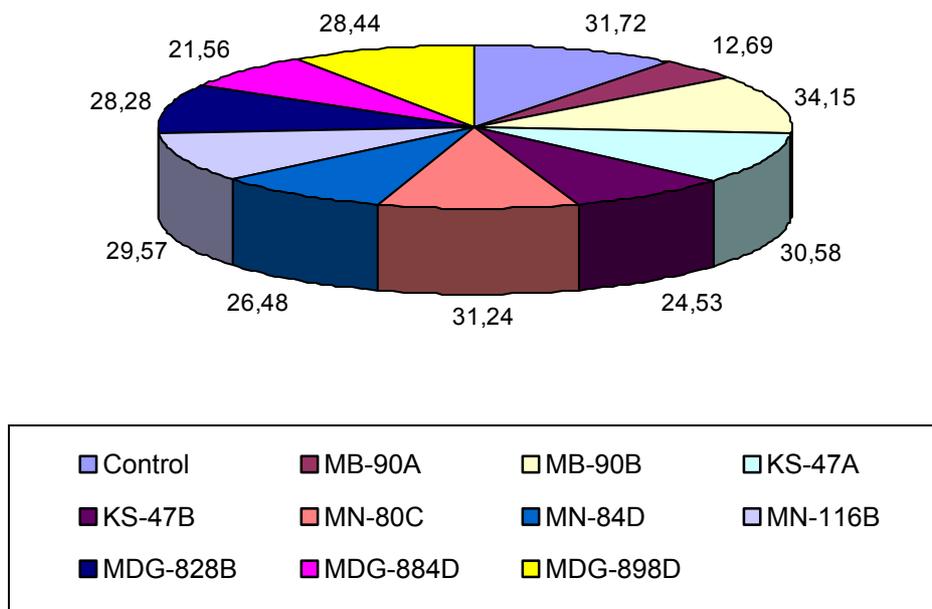


FIGURA 35. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS MCF-10A ACUMULADAS EN LA FASE G₂/M DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular HT-29 (figura 36):

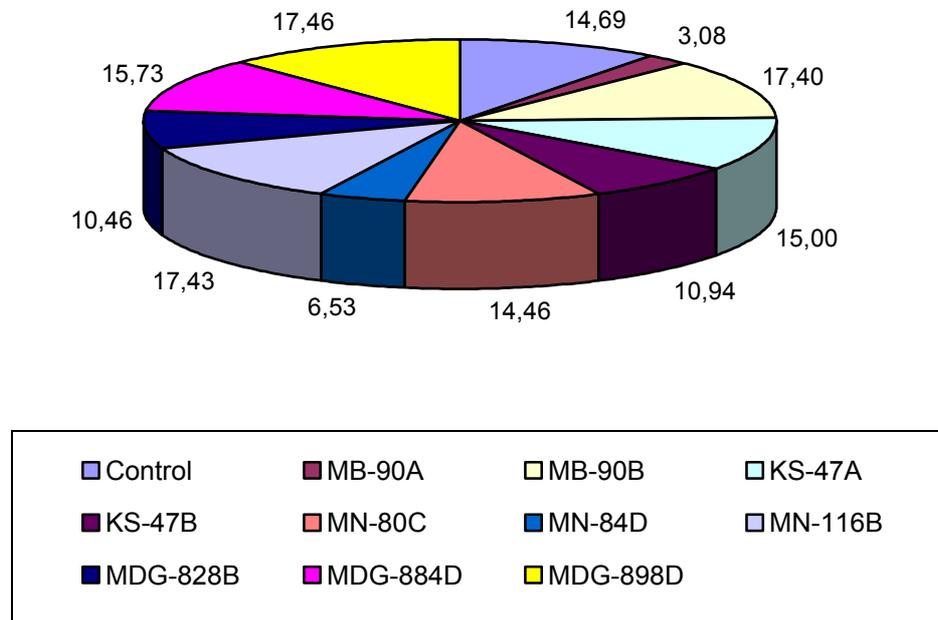


FIGURA 36. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS HT-29 ACUMULADAS EN LA FASE G₂/M DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

- Línea celular IEC-6 (figura 37):

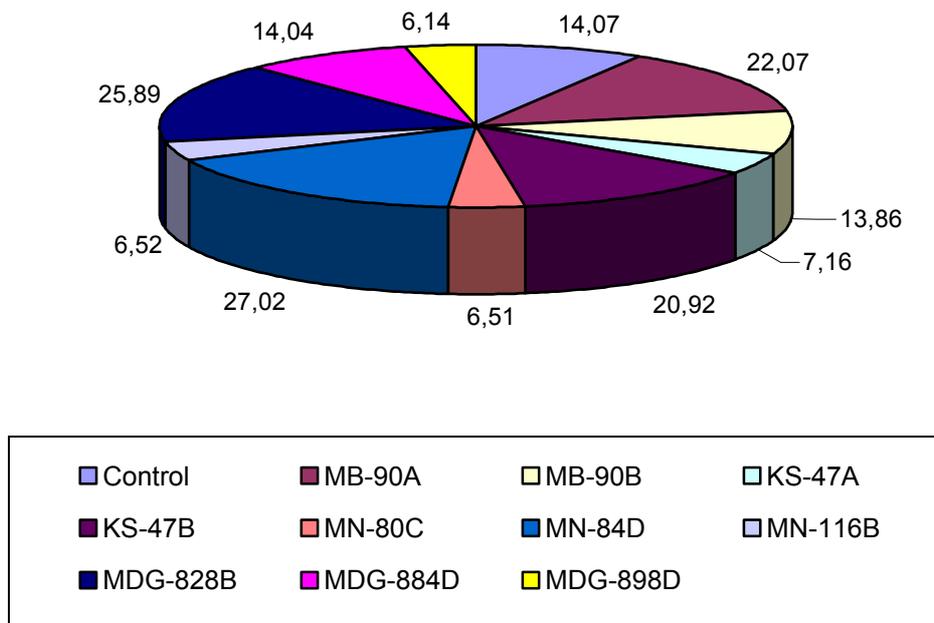


FIGURA 37. GRÁFICA DE LOS PORCENTAJES DE CÉLULAS IEC-6 ACUMULADAS EN LA FASE G₂/M DEL CICLO CELULAR POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS SELECCIONADOS.

5. ENSAYO DE VIABILIDAD, NECROSIS Y APOPTOSIS

5.1 ESTUDIO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Tras la inducción con los fármacos seleccionados durante 24 y 48 horas, se determinó mediante citometría de flujo, usando ioduro de propidio (IP) y anexina V conjugada con fluoresceína (FITC), el porcentaje de células viables (sin teñir), necróticas (teñidas con IP), apoptóticas tempranas (teñidas con anexina V-FITC) y apoptóticas tardías (doble tinción IP y anexina V-FITC), en las 4 líneas celulares. Se usó un control de cada línea parental sin inducir con fármacos y, además, un control sin fármacos y sin teñir, con objeto de poder discernir posibles fenómenos de autofluorescencia celular. Los resultados, agrupados por líneas celulares, fueron los siguientes:

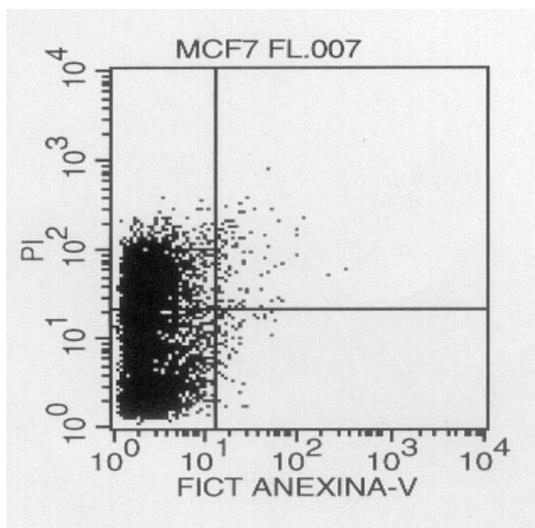
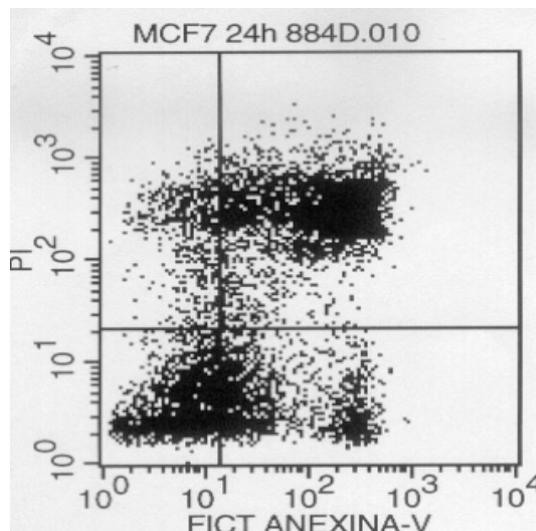
5.1.1 LÍNEA CELULAR MCF-7

Como se puede observar en la tabla 33 y la figura 38 A, las células MCF-7 sin tratar mostraron unos índices de apoptosis prácticamente nulos. Del mismo modo, observamos un alto porcentaje de células necróticas debido a la intensa actividad proliferativa y la alta agresividad que presenta esta línea tumoral.

Por el contrario, tras su inducción durante 24 horas con los diferentes agentes farmacológicos, se pudo comprobar como todos ellos producían un aumento significativo, respecto al control, del porcentaje de células teñidas sólo con FITC, es decir, las apoptóticas tempranas, siendo MB-90A el más efectivo. Este aumento fue incluso mayor en las apoptóticas tardías, con valores que rondaban el 60% como fue en el caso del compuesto MDG-884D (figura 38 B). Todos los fármacos disminuyeron la viabilidad, salvo cuando tratamos las células tumorales de mama humanas MCF-7 con el fármaco KS-47A donde, curiosamente, ésta aumentó. También es destacable el hecho de que todos los compuestos disminuyeron significativamente la cantidad de eventos necróticos respecto al control tras las 24 horas de tratamiento (tabla 33).

TABLA 33. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES, NECRÓTICAS Y APOPTÓTICAS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 TRAS 24 HORAS DE INDUCCIÓN.

| | VIABLES (%) | A. TEMP. (%) | A. TARD. (%) | NECRÓT. (%) |
|------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| CONT. NEG | 99,28 | 0,55 | 0,04 | 0,13 |
| CONTROL | 61,46 | 0,64 | 0,93 | 36,97 |
| MB-90A | 35,98 | 28,96 | 29,89 | 5,17 |
| MB-90B | 34,34 | 21,60 | 33,02 | 11,04 |
| KS-47A | 76,81 | 2,78 | 2,62 | 17,79 |
| KS-47B | 44,40 | 16,75 | 30,04 | 8,81 |
| MN-80C | 27,82 | 26,56 | 36,63 | 8,98 |
| MN-84D | 29,17 | 9,03 | 46,82 | 14,98 |
| MN-116B | 33,35 | 13,91 | 37,24 | 15,50 |
| MDG-828B | 28,69 | 9,87 | 55,75 | 5,69 |
| MDG-884D | 19,84 | 16,03 | 57,62 | 6,51 |
| MDG-898D | 48,26 | 4,22 | 22,74 | 24,78 |

A) CONTROL (24 HORAS)**B) MDG-884D (24 HORAS)****FIGURA 38.** APOPTOSIS EN CÉLULAS MCF-7 TRAS 24 HORAS DE CULTIVO CON FÁRMACOS. A) CITOGRAMA DE CÉLULAS CONTROL, B) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MDG-884D.

Después de 48 horas de inducción con los compuestos, se observó que en la línea MCF-7 el patrón de acción de los fármacos era parecido al caso anterior, pero con un incremento significativo en el porcentaje de células apoptóticas tardías, como en el caso del MB-90A (figura 39 A), MDG-828B y

MDG-898D (figura 39 B). Es de destacar la disminución en el porcentaje de células viables, con respecto a las 24 horas, que se observó para todos los compuestos (tabla 34).

TABLA 34. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES, NECRÓTICAS Y APOPTÓTICAS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN.

| | VIABLES (%) | A. TEMP. (%) | A. TARD. (%) | NECRÓT (%) |
|------------------|-------------|--------------|--------------|------------|
| CONT. NEG | 99,01 | 0,48 | 0,04 | 0,47 |
| CONTROL | 53,52 | 1,24 | 1,57 | 43,67 |
| MB-90A | 13,86 | 11,89 | 56,77 | 17,48 |
| MB-90B | 48,29 | 3,89 | 30,05 | 17,77 |
| KS-47A | 11,91 | 11,64 | 58,86 | 17,59 |
| KS-47B | 14,64 | 12,54 | 60,70 | 12,13 |
| MN-80C | 22,64 | 8,43 | 43,16 | 25,77 |
| MN-84D | 32,09 | 5,91 | 41,62 | 20,39 |
| MN-116B | 11,83 | 13,03 | 59,80 | 15,34 |
| MDG-828B | 5,07 | 7,27 | 72,81 | 14,85 |
| MDG-884D | 20,36 | 6,36 | 48,49 | 24,79 |
| MDG-898D | 6,35 | 13,73 | 77,40 | 2,52 |

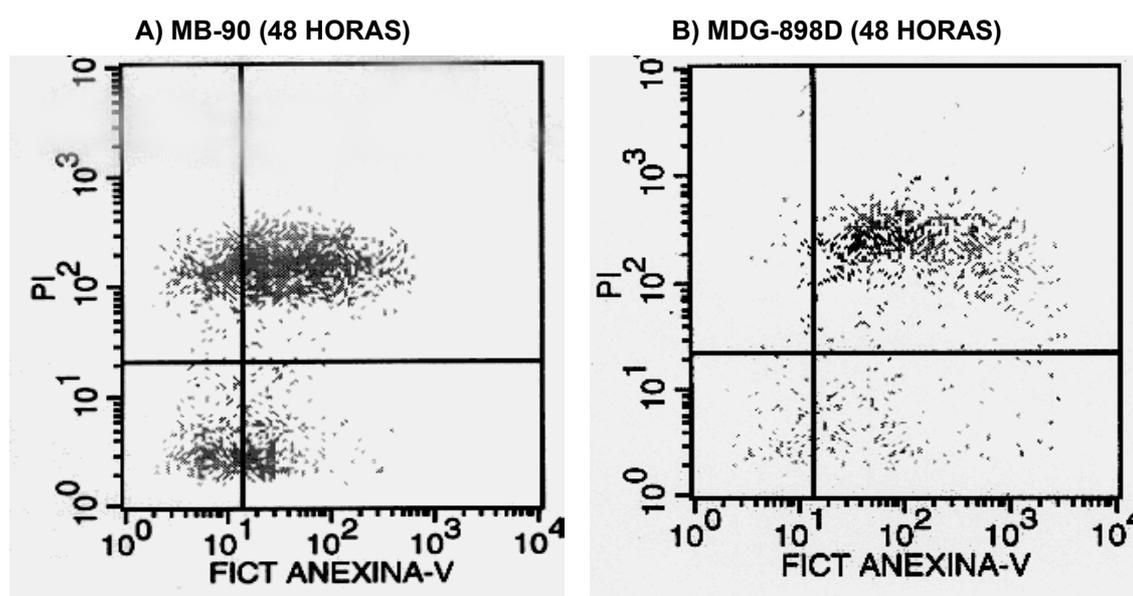


FIGURA 39. APOPTOSIS EN CÉLULAS MCF-7 TRAS 48 HORAS DE CULTIVO CON FÁRMACOS. A) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MB-90A, B) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MDG-898D.

Como se observa en la figura 40 existe un patrón de comportamiento diferente dependiendo del tiempo de tratamiento. De este modo, observamos como a las 48 h se produce una disminución de la apoptosis temprana en comparación con los efectos vistos a las 24 horas. Asociado a esto, la apoptosis tardía mostró un incremento sustancial cuando el tiempo de tratamiento con los diferentes fármacos fue de 48 horas.

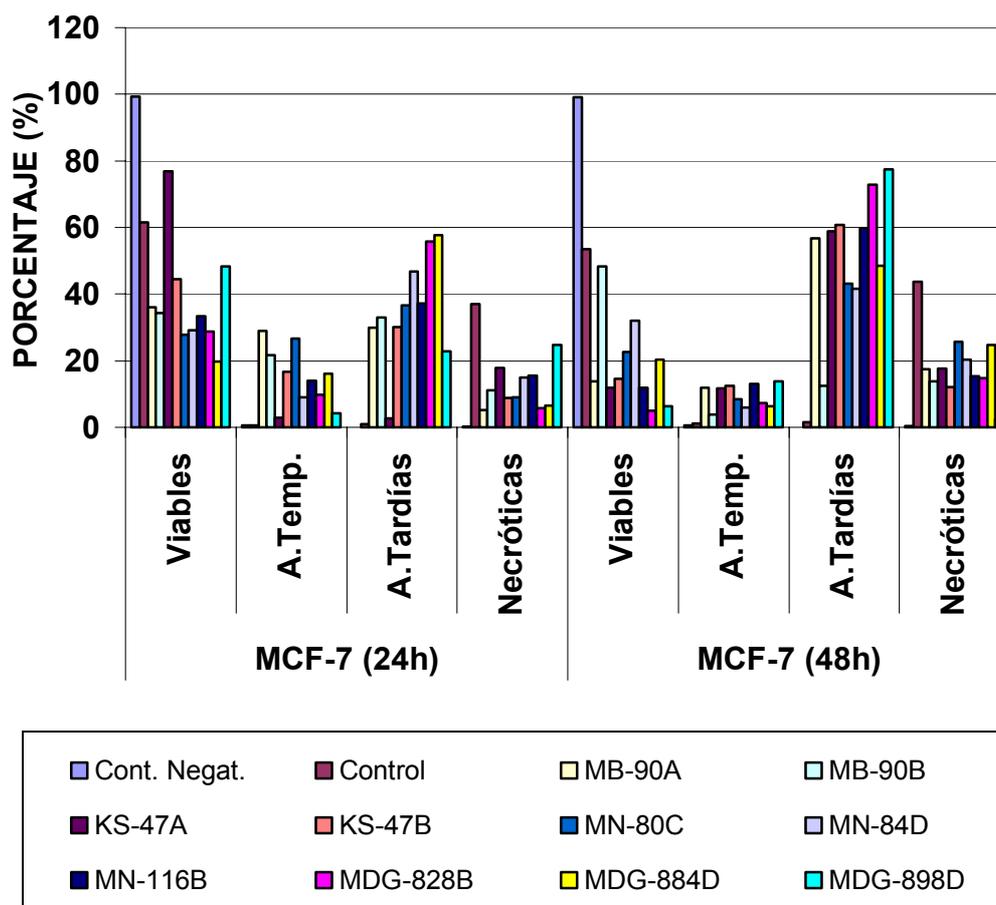


FIGURA 40. HISTOGRAMA COMPARATIVO DE LAS 24 Y 48 HORAS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

5.1.2 LÍNEA CELULAR MCF-10A

Tras 24 horas de inducción, todos los compuestos produjeron sobre la línea celular MCF-10A una disminución, respecto al control, en el porcentaje de células viables, llegando hasta valores de tan solo el 24,73% viables en el caso de MB-90B (figura 41 A). Acompañando a esto, se observó como también todas las drogas aumentaban, de manera muy sustancial, los porcentajes de células que sufrían procesos de apoptosis, tanto temprana como tardía, llegando a valores de casi el 50% en compuestos como MB-90A y MDG898-D

(figuras 41 B y 41 C, respectivamente). Todo esto se tradujo en una marcada disminución, dentro de todos los fármacos, de la cantidad de eventos necróticos observados (tabla 35).

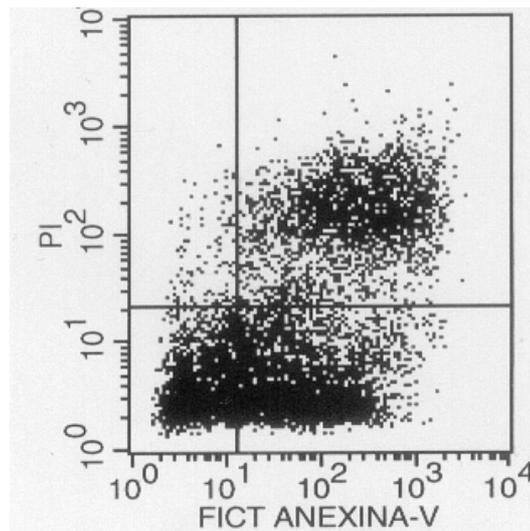
TABLA 35. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES, NECRÓTICAS Y APOPTÓTICAS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A TRAS 24 HORAS DE INDUCCIÓN.

| | VIABLES (%) | A. TEMP. (%) | A. TARD. (%) | NECRÓT. (%) |
|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| CONT. NEG | 98,85 | 0,55 | 0,05 | 0,55 |
| CONTROL | 74,05 | 17,74 | 2,20 | 6,01 |
| MB-90A | 32,41 | 40,40 | 26,01 | 1,18 |
| MB-90B | 24,73 | 47,48 | 26,57 | 1,22 |
| KS-47A | 39,17 | 41,68 | 18,36 | 0,78 |
| KS-47B | 69,95 | 21,62 | 7,89 | 0,54 |
| MN-80C | 58,05 | 29,43 | 11,46 | 1,06 |
| MN-84D | 51,35 | 35,18 | 12,28 | 1,19 |
| MN-116B | 57,95 | 28,40 | 12,32 | 1,33 |
| MDG-828B | 59,54 | 25,82 | 13,40 | 1,23 |
| MDG-884D | 66,72 | 20,98 | 11,03 | 1,27 |
| MDG-898D | 29,86 | 49,39 | 19,74 | 1,01 |

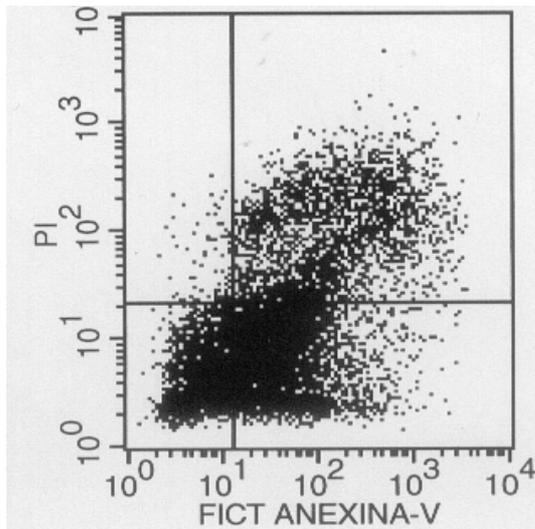
Es evidente que en esta línea celular, y a diferencia de la acción de los fármacos sobre la línea celular tumoral MCF-7, que existe una mayor proporción de células viables y un incremento del porcentaje de células en apoptosis temprana a las 24 horas, con una disminución de la tardía.

También es de destacar la disminución significativa en el porcentaje de células necróticas, en comparación a los valores que encontramos en la línea celular MCF-7 a las 24 horas (tabla 35).

A) MB-90B (24 HORAS)



B) MB-90A (24 HORAS)



C) MDG-898D (24 HORAS)

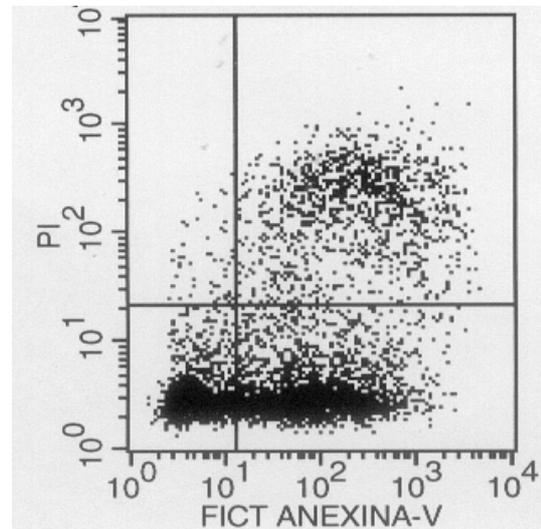


FIGURA 41. APOPTOSIS EN CÉLULAS MCF-10A TRAS 24 HORAS DE INDUCCIÓN. A) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MB-90B, B) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MB-90A, C) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MDG-898D.

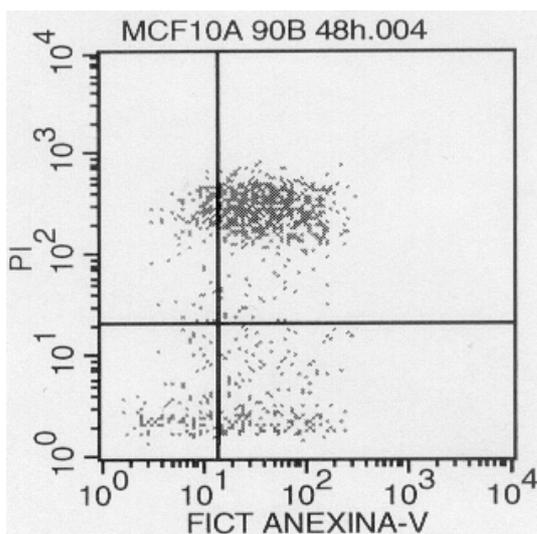
Cuando la línea celular MCF-10A fue tratada con los diferentes compuestos durante 48 horas, se apreció como la necrosis aumentó de manera clara en todos los casos, llegando al valor extremo de 49,24 % en el caso de MDG-898D. La apoptosis mostró un patrón diferente, según fuera temprana o tardía. Así, la primera apenas mostró diferencias respecto al control e incluso disminuyó en algunos casos. Por el contrario, la tardía experimentó un considerable aumento, llegando a valores máximos de hasta el 61,13 % cuando se indujo con MB-90B (figura 42 A), salvo en el caso del MN-116B en el

que este dato disminuyó respecto al control. La cantidad de células viables se vio considerablemente reducida, exceptuando el caso antes comentado de MN-116B (figura 42 B) (tabla 36).

TABLA 36. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES, NECRÓTICAS Y APOPTÓTICAS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN.

| | VIABLES (%) | A. TEMP. (%) | A. TARD. (%) | NECRÓT. (%) |
|------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| CONT. NEG | 96,35 | 3,27 | 0,11 | 0,27 |
| CONTROL | 70,17 | 16,50 | 4,87 | 8,46 |
| MB-90A | 11,27 | 15,59 | 57,55 | 15,59 |
| MB-90B | 9,81 | 16,71 | 61,13 | 12,35 |
| KS-47A | 11,08 | 15,92 | 54,10 | 18,90 |
| KS-47B | 8,22 | 16,25 | 61,96 | 13,57 |
| MN-80C | 17,51 | 6,71 | 46,40 | 29,38 |
| MN-84D | 11,35 | 10,07 | 54,44 | 24,15 |
| MN-116B | 82,59 | 2,82 | 1,66 | 12,94 |
| MDG-828B | 12,86 | 18,78 | 53,22 | 15,15 |
| MDG-884D | 47,11 | 2,18 | 24,82 | 25,89 |
| MDG-898D | 30,90 | 2,57 | 17,29 | 49,24 |

A) MB-90B (48 HORAS)



B) MN-116B (48 HORAS)

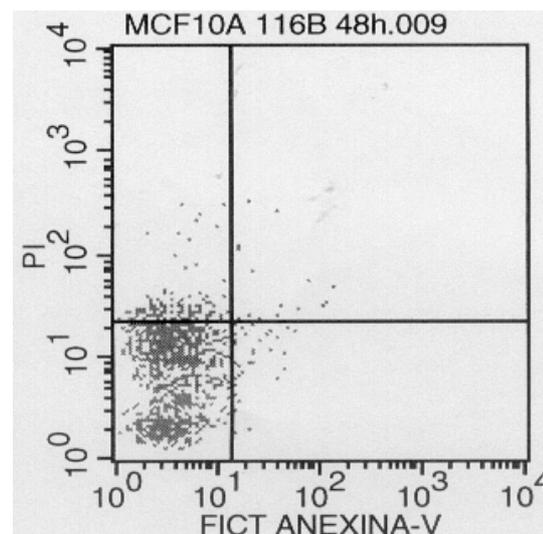


FIGURA 42. APOPTOSIS EN CÉLULAS MCF-10A TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON FÁRMACOS. A) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MB-90B, B) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MN-116B.

Como cabía esperar, en términos generales pudimos comprobar como la cantidad de células viables disminuyó cuando el tratamiento con los diferentes compuestos pasó de las 24 a las 48 horas. También descubrimos como un mayor tiempo de exposición a los diferentes fármacos desembocó en el incremento de eventos necróticos, alcanzando valores de hasta casi el 50%. En cuanto a los fenómenos de apoptosis, tras 48 h de tratamiento la apoptosis tardía incremento ostensiblemente, con valores máximos de un 61%. Este fenómeno se produjo a costa de la disminución de la apoptosis temprana que llegó a disminuir hasta tres veces sus valores a las 24 horas, no obstante manteniéndose siempre en valores similares a los del control (figura 42).

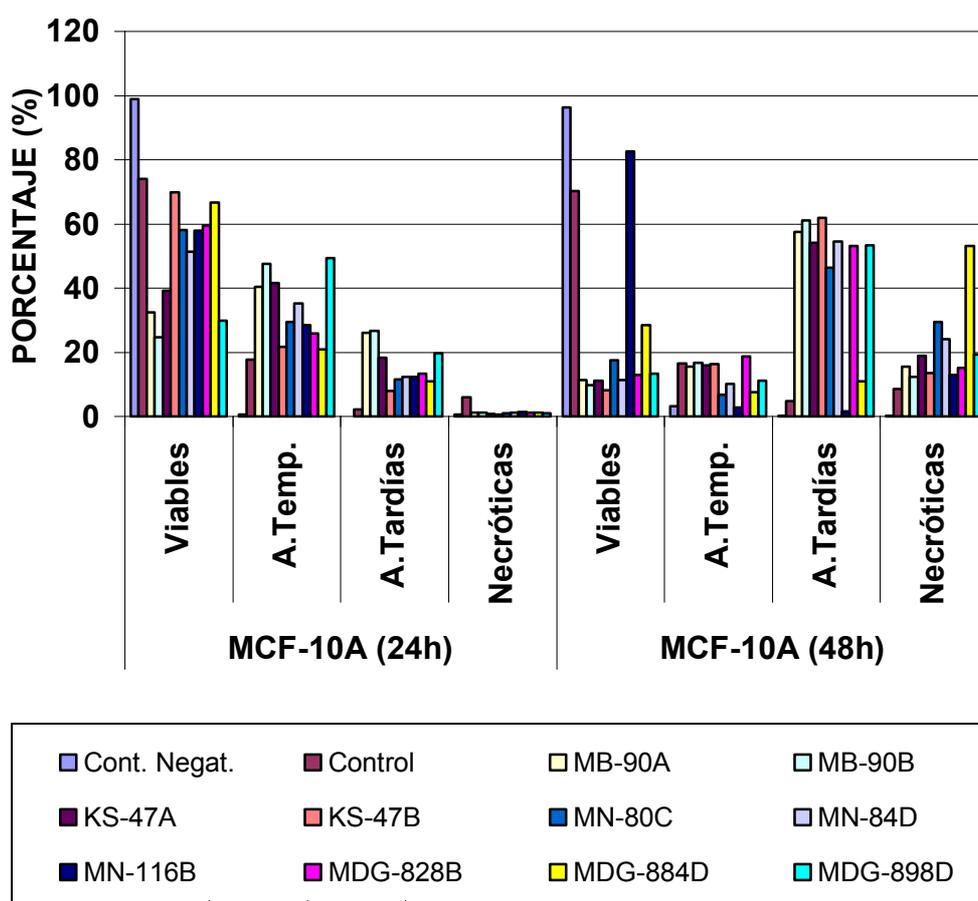


FIGURA 43. HISTOGRAMA COMPARATIVO DE LAS 24 Y 48 HORAS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A.

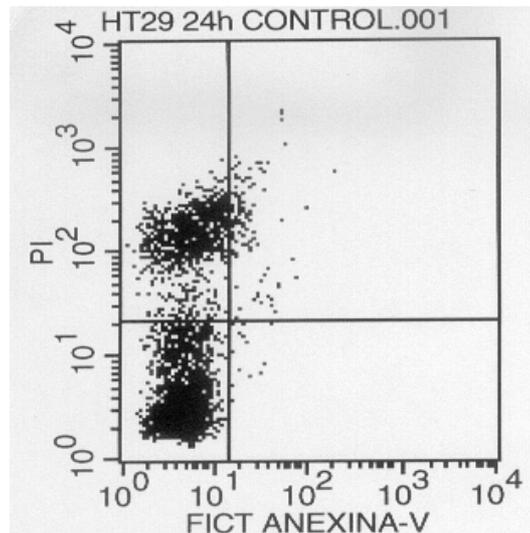
5.1.3 LÍNEA CELULAR HT-29

En la línea celular HT-29, tras su inducción durante 24 horas con los diferentes agentes farmacológicos, se pudo comprobar como todos ellos produjeron un aumento del porcentaje de células apoptóticas tempranas. Este aumento fue bastante significativo, en relación con el control, en el caso de las apoptóticas tardías, siendo el efecto del compuesto MN-80C (figura 44 A) el más sobresaliente. En todos los casos la viabilidad se vio reducida respecto al control, salvo cuando se indujo con los fármacos MN-84D y MB-90A (figura 44 B) donde, curiosamente, ésta aumenta, disminuyendo significativamente la necrosis celular. El resto de los compuestos también disminuyeron la cantidad de necrosis pero con valores más moderados que el caso anterior (tabla 37).

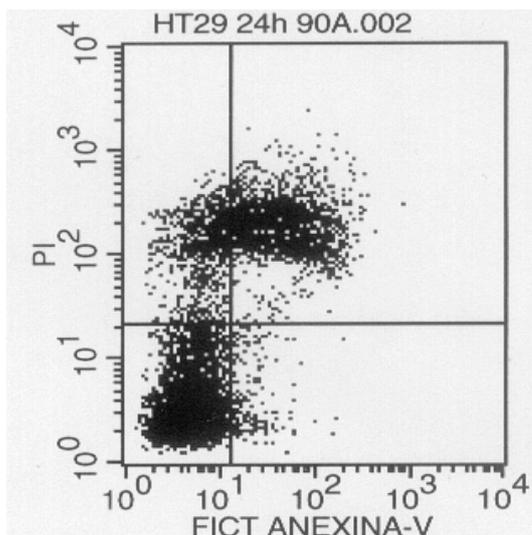
TABLA 37. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES, NECRÓTICAS Y APOPTÓTICAS EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 TRAS 24 HORAS DE INDUCCIÓN.

| | VIABLES (%) | A. TEMP. (%) | A. TARD. (%) | NECRÓT. (%) |
|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| CONT. NEG | 99,28 | 0,68 | 0,03 | 0,01 |
| CONTROL | 66,95 | 0,56 | 4,21 | 28,28 |
| MB-90A | 70,89 | 2,18 | 17,98 | 8,95 |
| MB-90B | 40,95 | 2,65 | 19,97 | 36,43 |
| KS-47A | 59,15 | 0,99 | 16,07 | 23,79 |
| KS-47B | 50,19 | 2,18 | 20,48 | 27,15 |
| MN-80C | 38,87 | 6,80 | 28,21 | 26,12 |
| MN-84D | 75,81 | 1,98 | 13,10 | 9,11 |
| MN-116B | 53,86 | 2,60 | 19,28 | 24,26 |
| MDG-828B | 64,82 | 3,03 | 17,74 | 14,41 |
| MDG-884D | 47,11 | 2,18 | 24,82 | 25,89 |
| MDG-898D | 30,90 | 2,57 | 17,29 | 49,24 |

A) CONTROL (24 HORAS)



B) MB-90A (24 HORAS)



C) MN-80C (24 HORAS)

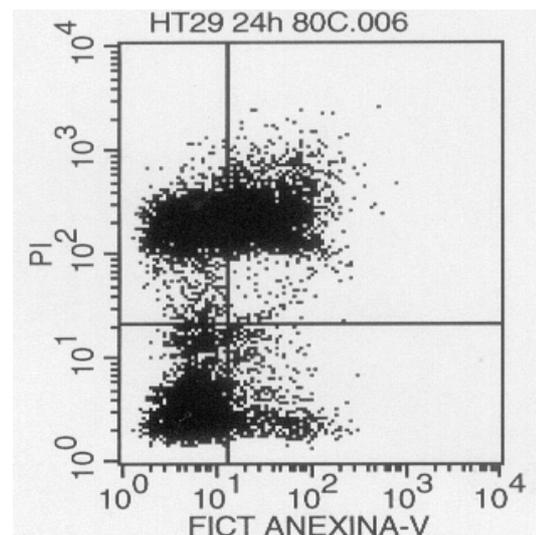


FIGURA 44. APOPTOSIS EN CÉLULAS HT-29 TRAS 24 H DE INDUCCIÓN CON FÁRMACOS. A) CITOGRAMA DE CÉLULAS CONTROL, B) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MB-90A, C) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MN-80C.

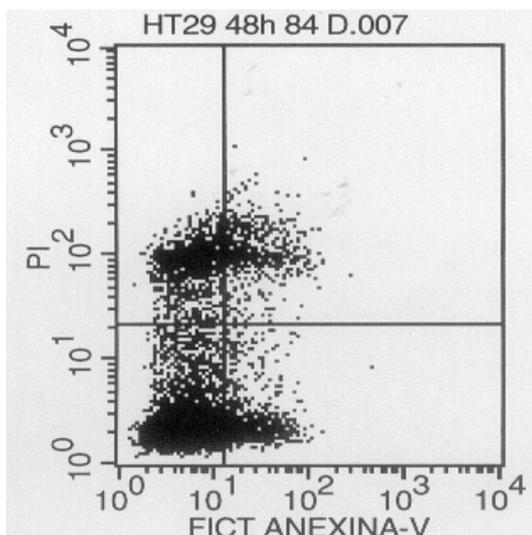
En esta misma línea celular se observó un gran aumento en el porcentaje de células apoptóticas cuando la inducción pasó de las 24 a las 48 horas. Así, el porcentaje de células apoptóticas tempranas se incrementó de manera significativa para todos los fármacos, siendo el caso más evidente el de MDG-828B y MDG-884D (figura 45 A). La apoptosis tardía, sin llegar a valores tan altos como la temprana, también se elevó en todos los casos. La viabilidad

disminuyó, salvo cuando se trataron las células con MN-84D (figura 45 B), a costa de una acusada disminución el número de células necróticas (tabla 38).

TABLA 38. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES, NECRÓTICAS Y APOPTÓTICAS EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN.

| | VIABLES (%) | A. TEMP. (%) | A. TARD. (%) | NECRÓT. (%) |
|------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| CONT. NEG | 99,58 | 0,39 | 0,03 | 0,00 |
| CONTROL | 67,18 | 0,56 | 3,76 | 28,50 |
| MB-90A | 57,73 | 15,80 | 16,30 | 10,17 |
| MB-90B | 51,75 | 8,82 | 10,20 | 29,23 |
| KS-47A | 65,04 | 13,52 | 10,37 | 11,07 |
| KS-47B | 69,31 | 6,94 | 8,62 | 15,13 |
| MN-80C | 62,44 | 16,42 | 14,37 | 6,77 |
| MN-84D | 72,54 | 9,12 | 5,87 | 12,47 |
| MN-116B | 59,60 | 16,43 | 15,30 | 8,67 |
| MDG-828B | 59,69 | 18,07 | 13,63 | 8,61 |
| MDG-884D | 54,93 | 21,10 | 15,64 | 8,33 |
| MDG-898D | 69,20 | 3,39 | 6,04 | 21,37 |

A) MN-84D (48 HORAS)



B) MDG-884D (48 HORAS)

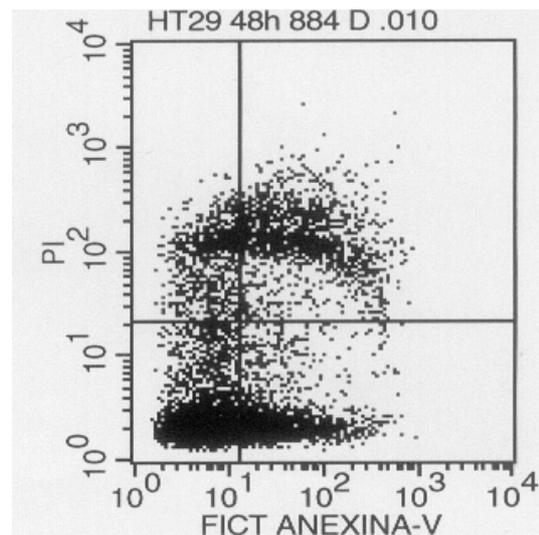


FIGURA 45. APOPTOSIS EN CÉLULAS HT-29 TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON FÁRMACOS. A) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MN-84D, B) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MDG-884D.

En la figura 46 se observa gráficamente como evoluciona la línea celular HT-29 a lo largo del tiempo. Así, el rasgo más característico fue la presencia de una mayor apoptosis tardía con respecto a la temprana, a las 24 horas de tratamiento. Sin embargo, a las 48 horas observamos un incremento de la apoptosis temprana y una disminución en la tardía alcanzando valores similares. Del mismo modo, resultó sorprendente la disminución para todos los fármacos de la necrosis tras el tratamiento de las células durante 48 horas (figura 46).

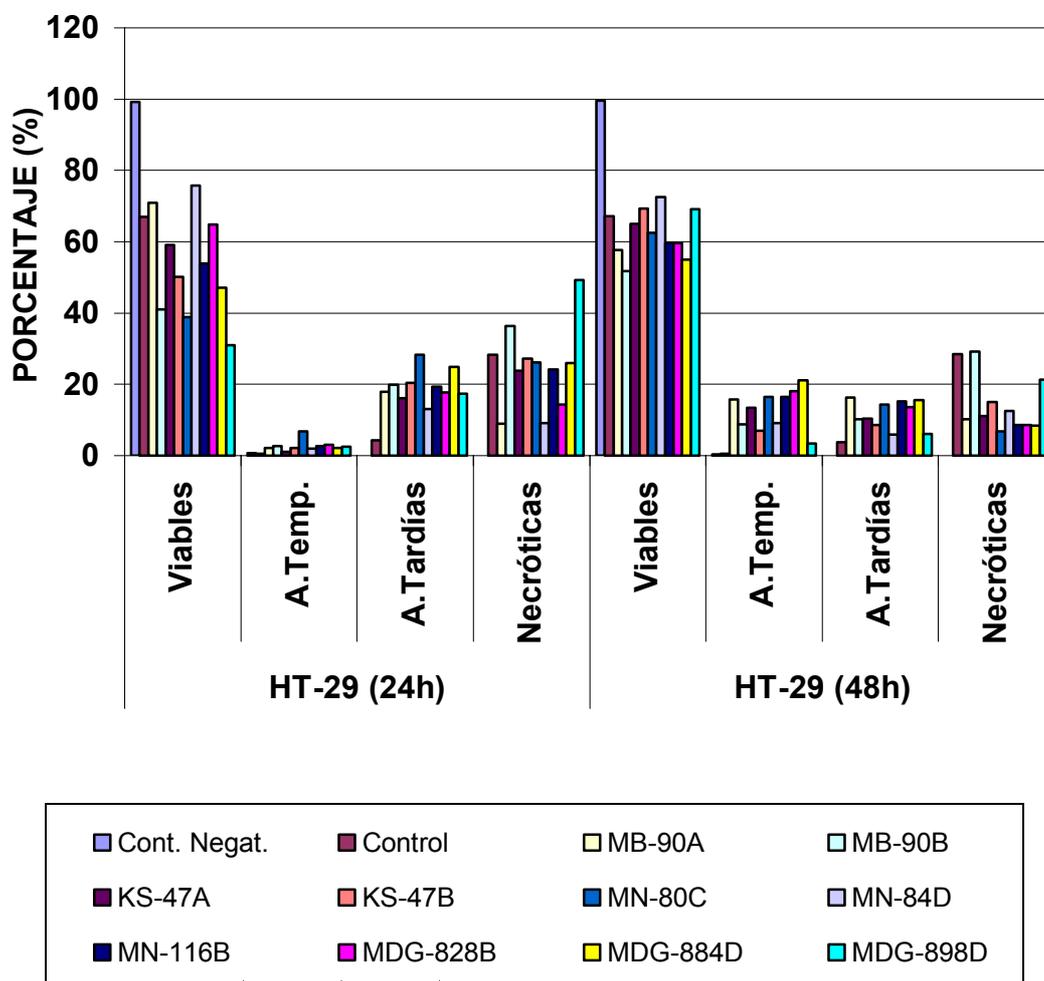


FIGURA 46. HISTOGRAMA COMPARATIVO DE LAS 24 Y 48 HORAS EN LA LÍNEA CELULAR HT-29.

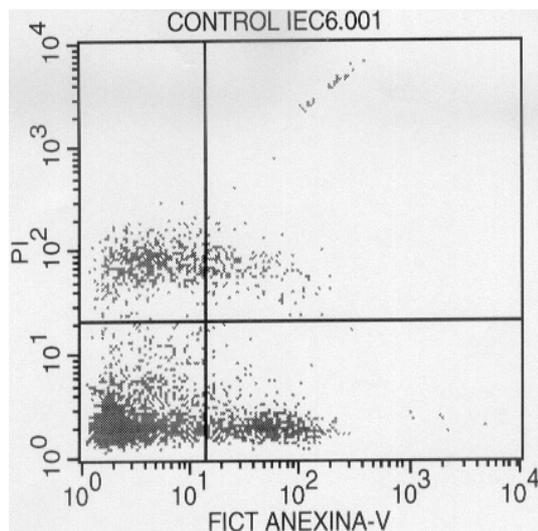
5.1.4 LÍNEA CELULAR IEC-6

En esta línea celular, y tras su inducción con los agentes farmacológicos durante 24 horas, se apreció, en todos los casos, una disminución de la cantidad de células viables respecto al control. En algunos compuestos esta caída era muy acusada, como en MN-116B ó MDG-828B (figuras 47 A y 47 B, respectivamente), sin embargo en otros era más leve, como es el caso del fármaco MDG-884D. Así mismo, las cantidades de células necróticas eran sensiblemente menores, excepto en los compuestos KS-47A y MDG-884D, en los que ésta aumentó, asociado a una disminución de la apoptosis. Salvo en estos dos casos mencionados, la apoptosis sufrió un aumento, moderado en el caso de la temprana, y bastante marcado en el de la tardía, siendo los más destacados los fármacos KS-47B, KS-116B y MDG-898D (tabla 39).

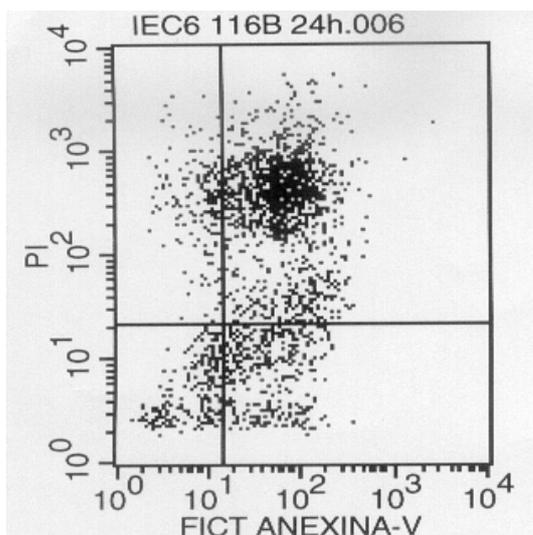
TABLA 39. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES, NECRÓTICAS Y APOPTÓTICAS EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 TRAS 24 HORAS DE INDUCCIÓN.

| | VIABLES (%) | A. TEMP. (%) | A. TARD. (%) | NECRÓT. (%) |
|------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| CONT. NEG | 97,89 | 0,82 | 0,24 | 1,05 |
| CONTROL | 66,56 | 14,63 | 4,58 | 14,23 |
| MB-90A | 31,16 | 17,41 | 44,56 | 6,86 |
| MB-90B | 20,60 | 15,01 | 55,47 | 8,92 |
| KS-47A | 32,02 | 1,44 | 8,25 | 58,29 |
| KS-47B | 14,53 | 19,83 | 58,79 | 6,85 |
| MN-80C | 24,58 | 19,68 | 49,10 | 6,64 |
| MN-84D | 24,21 | 16,87 | 51,63 | 7,29 |
| MN-116B | 11,58 | 16,21 | 62,97 | 9,23 |
| MDG-828B | 17,81 | 21,38 | 56,10 | 4,71 |
| MDG-884D | 52,65 | 5,56 | 8,42 | 33,38 |
| MDG-898D | 28,92 | 22,13 | 42,96 | 5,99 |

A) CONTROL (24 HORAS)



B) MN-116B (24 HORAS)



C) MDG-828B (24 HORAS)

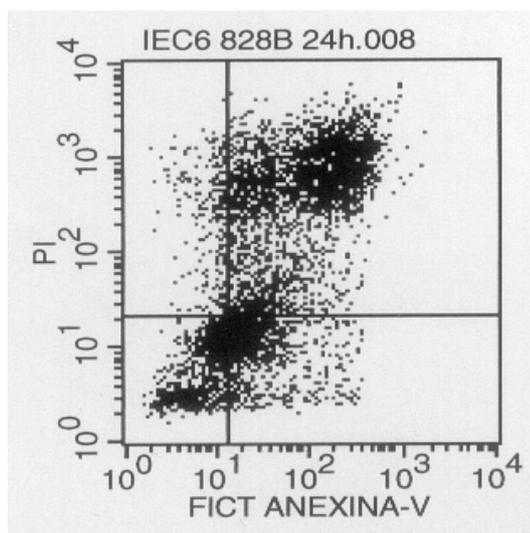


FIGURA 47. APOPTOSIS EN CÉLULAS IEC-6 TRAS 24 HORAS DE INDUCCIÓN CON FÁRMACOS. A) CITOGRAMA DE CÉLULAS CONTROL, B) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MN-116B, C) CITOGRAMA DE CÉLULAS INDUCIDAS CON MDG-828B.

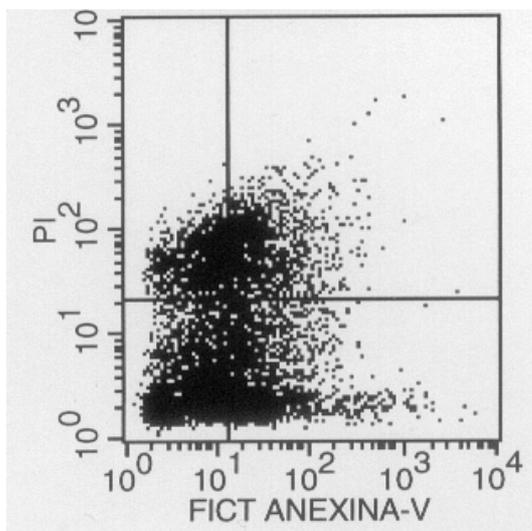
Cuando la inducción con las drogas se realizó durante 48 horas, se observó, al igual que sucedía a las 24 horas, una gran disminución en el porcentaje de células viables y necróticas respecto al control, salvo en el caso del compuesto KS-47B (figura 48 A), que mostró unos valores en ambos casos muy cercanos a los de este último. Por el contrario, se observó un marcado aumento de los niveles de apoptosis, principalmente en la temprana, en las células tratadas con los diferentes fármacos, mostrándose los compuestos KS-

47A, MN-116B y MDG-898D (figura 48 B) como los más proapoptóticos (tabla 40).

TABLA 40. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES, NECRÓTICAS Y APOPTÓTICAS EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN.

| | VIABLES (%) | A. TEMP. (%) | A. TARDÍAS (%) | NECRÓT. (%) |
|------------------|-------------|--------------|----------------|-------------|
| CONT. NEG | 97,89 | 0,82 | 0,24 | 1,05 |
| CONTROL | 65,13 | 15,23 | 5,53 | 14,11 |
| MB-90A | 28,81 | 47,48 | 21,28 | 2,43 |
| MB-90B | 26,81 | 48,61 | 21,15 | 3,44 |
| KS-47A | 25,15 | 50,34 | 23,09 | 1,42 |
| KS-47B | 40,24 | 28,19 | 16,82 | 14,75 |
| MN-80C | 32,88 | 50,78 | 14,87 | 1,47 |
| MN-84D | 25,47 | 41,82 | 27,57 | 5,14 |
| MN-116B | 22,67 | 51,00 | 23,87 | 2,46 |
| MDG-828B | 35,49 | 44,47 | 18,70 | 1,34 |
| MDG-884D | 20,44 | 49,81 | 28,65 | 1,10 |
| MDG-898D | 18,24 | 39,82 | 39,22 | 2,72 |

A) KS-47B (48 HORAS)



B) MDG-898D (48 HORAS)

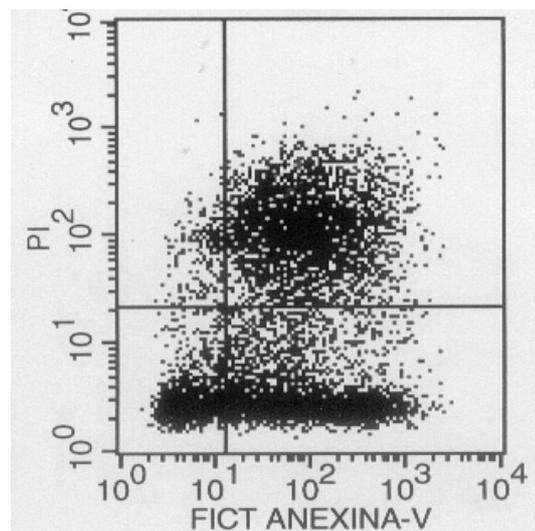


FIGURA 48. APOPTOSIS EN CÉLULAS IEC-6 TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON FÁRMACOS. A) APOPTOSIS INDUCIDA POR KS-47B, B) APOPTOSIS INDUCIDA POR MDG-898D.

Al igual que lo observado en la línea celular HT-29, la apoptosis temprana fue mayor y el porcentaje de células necróticas disminuyó a las 48 horas de tratamiento. La apoptosis tardía también sufrió una disminución en sus valores conforme avanzó el tiempo de tratamiento, sin alteración significativa en la población de células viables (figura 49).

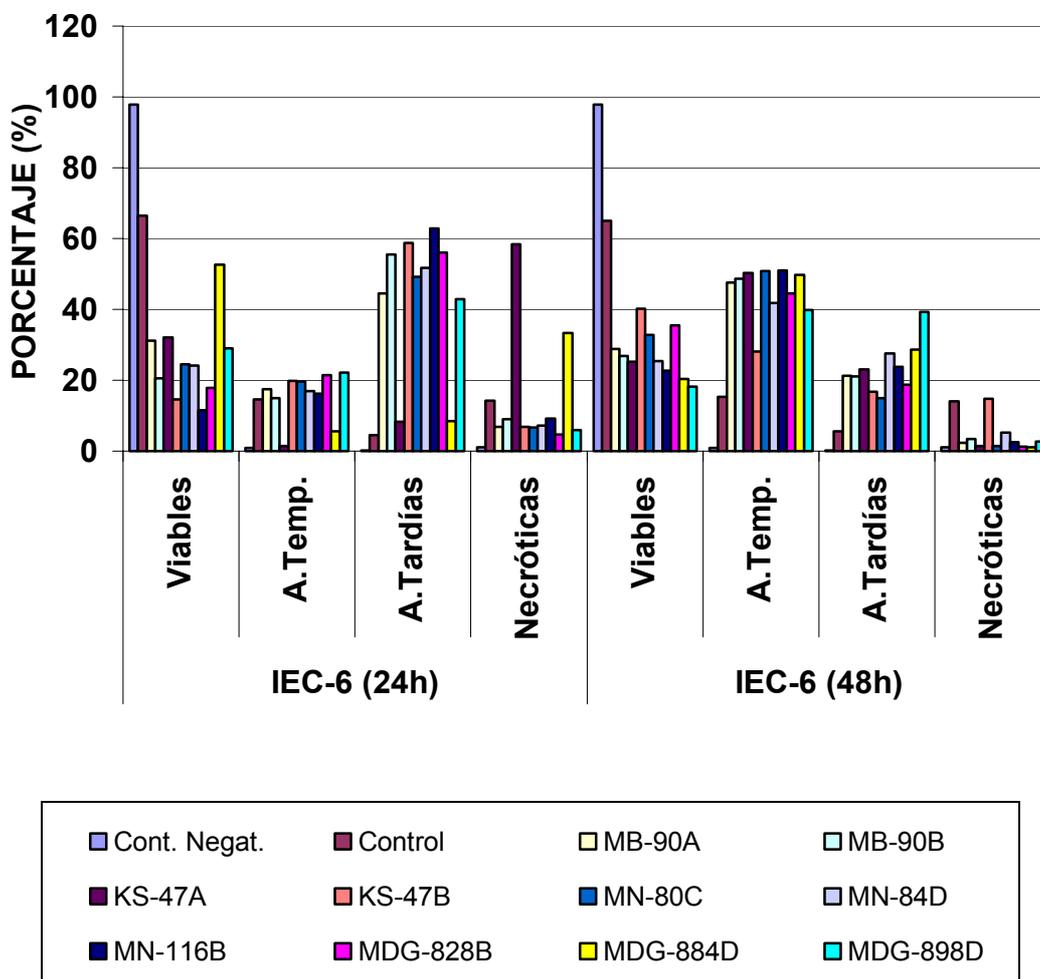


FIGURA 49. HISTOGRAMA COMPARATIVO DE LAS 24 Y 48 HORAS EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6.

5.1.5. COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS FÁRMACOS SOBRE LA VIABILIDAD, APOPTOSIS Y NECROSIS ENTRE LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

Observamos como casi todos los compuestos tuvieron mayor efecto citotóxico sobre las diferentes líneas celulares estudiadas a las 48 horas si lo comparamos con su efecto a las 24 horas de tratamiento. La única excepción la encontramos en la serie HT-29, donde la viabilidad aumentó pasadas las 24 horas (figura 50).

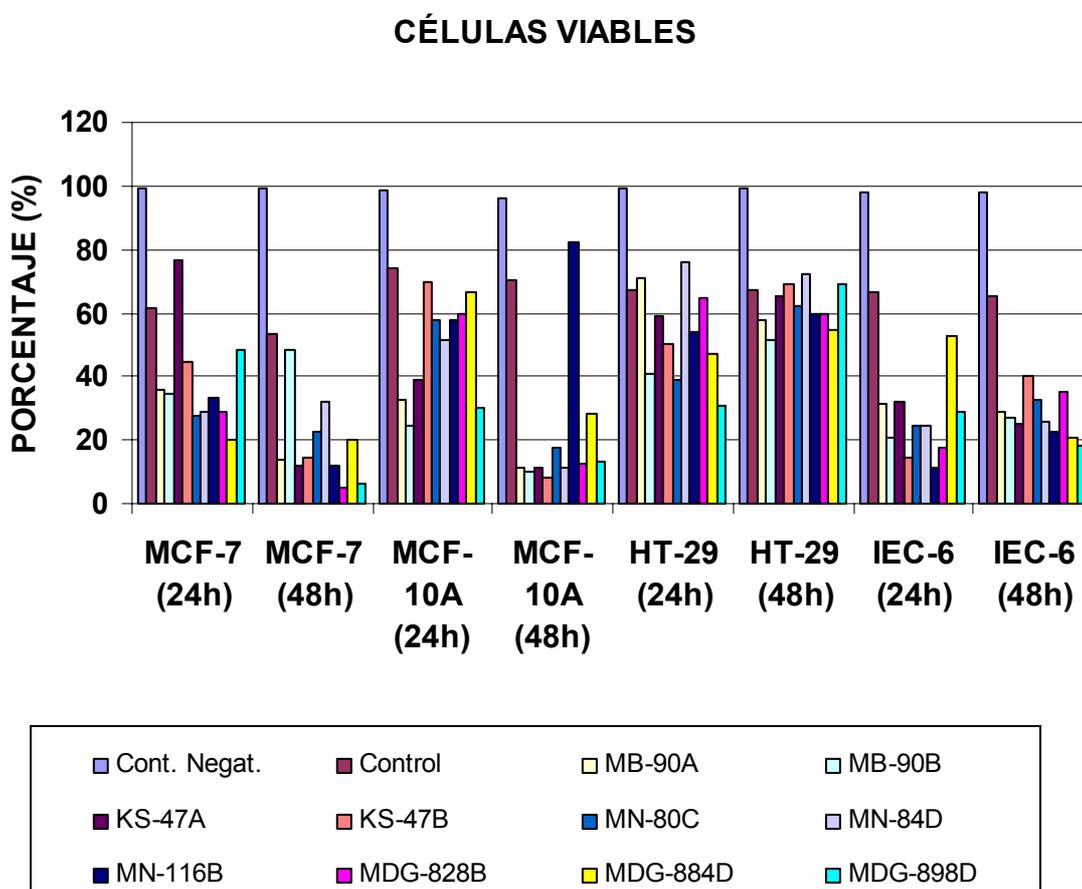


FIGURA 50. PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES SEGÚN FÁRMACO.

De las células apoptóticas tempranas destacó la gran diferencia que se observaban dependiendo del tiempo de tratamiento. De este modo, en la línea celular MCF-7 la apoptosis temprana disminuyó en las 48 respecto a las 24 horas. Este mismo efecto, pero con diferencias más acusadas, lo pudimos comprobar cuando se trató de la línea celular MCF-10A. En las de origen intestinal curiosamente ocurrió el fenómeno inverso, encontramos mayor apoptosis temprana cuanto más tiempo de tratamiento estuvieron. Lo que sí se repitió fue la selectividad mucho más alta en líneas celulares normales (figura 51).

CÉLULAS APOPTÓTICAS TEMPRANAS

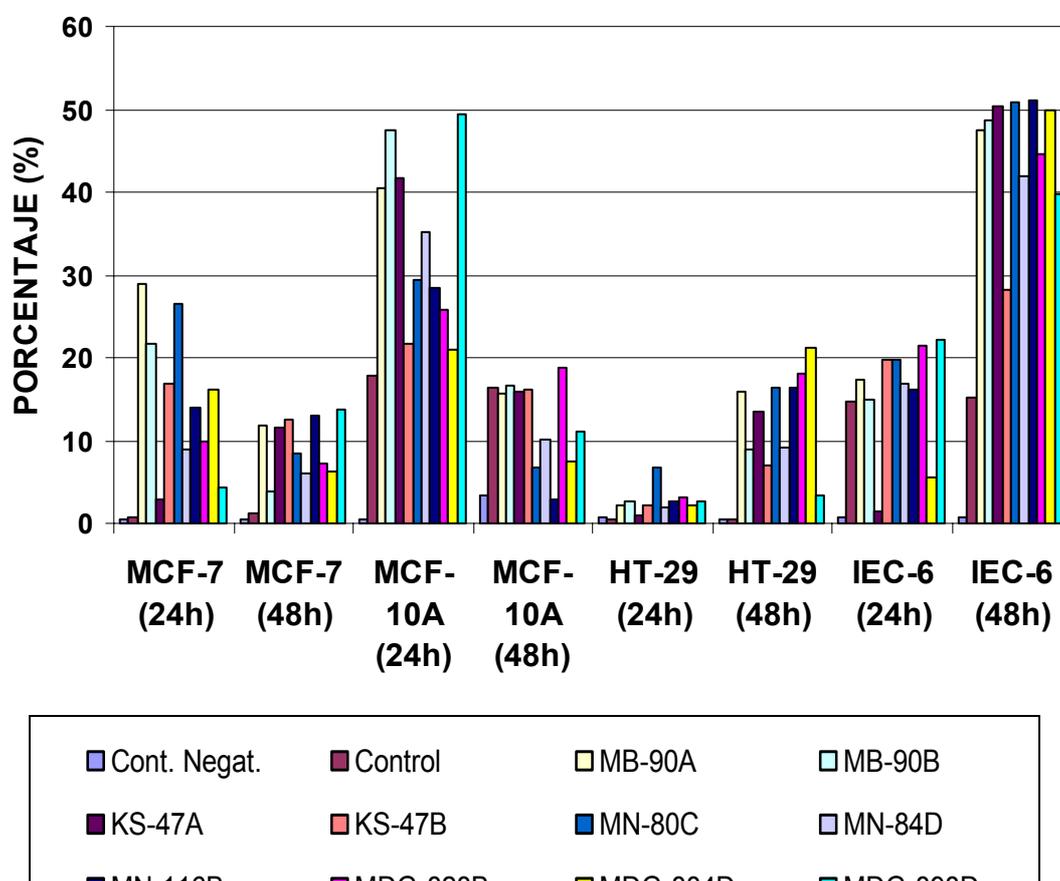


FIGURA 51. PORCENTAJE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS TEMPRANAS SEGÚN FÁRMACO.

Comprobamos como en esta ocasión ocurría el fenómeno opuesto al caso anterior. La apoptosis tardía aumentó conforme incrementaba el tiempo en las células de estirpe mamaria, y en las de estirpe intestinal el efecto contrario, encontramos menores porcentajes de células en esta situación a las 48 horas (figura 52).

CÉLULAS APOPTÓTICAS TARDÍAS

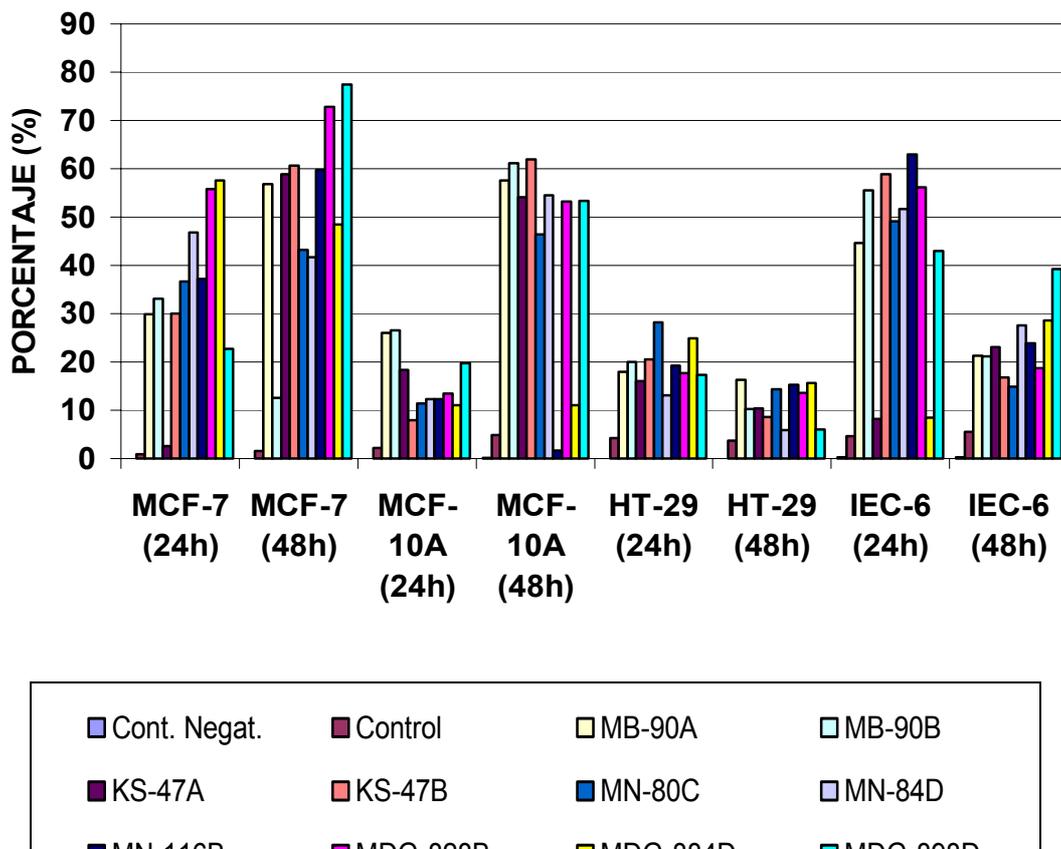


FIGURA 52. PORCENTAJE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS TARDÍAS SEGÚN FÁRMACO.

El porcentaje de células necróticas aumento conforme avanzaba el tiempo en las células tumorales y normales mamarias, mientras que en ambos tipos de células intestinales observamos el fenómeno contrario, el porcentaje de células necróticas fue mayor a las 24horas. Este último fenómeno pudo deberse a que, tras 48 horas de tratamiento, la cantidad de células era mucho menor debido a la gran actividad citotóxica que mostraron los compuestos (figura 53).

CÉLULAS NECRÓTICAS

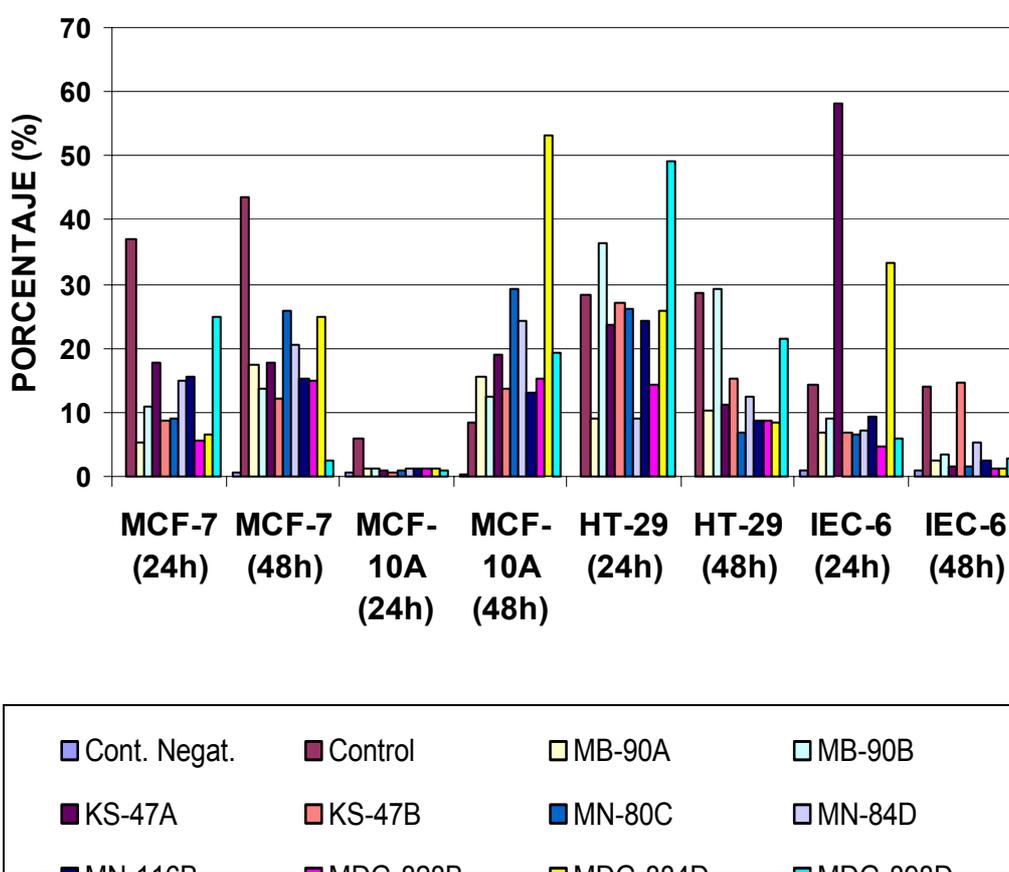


FIGURA 53. PORCENTAJE DE CÉLULAS NECRÓTICAS SEGÚN FÁRMACO.

5.2 ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Los resultados obtenidos por citometría de flujo fueron corroborados con un análisis mediante microscopía confocal. De este modo, tras la inducción de las cuatro líneas celulares con los diferentes fármacos seleccionados se

podieron observar fenómenos de apoptosis temprana y tardía, y, en menor medida, necrosis celular (figuras 54, 55 y 56).

En las células apoptóticas, se observa la membrana citoplasmática con un intenso marcaje con Anexina V (color verde) y el núcleo desestructurado con condensación de cromatina en su interior. Por el contrario, en las necróticas se observa ruptura de la membrana citoplasmática y el núcleo aparece expandido pero no desorganizado. En los controles, al no teñirse las células viables, tan solo se observó un pequeño porcentaje de las células teñidas con ioduro de propidio que se correspondía con las células necróticas.

En la figura 54 se aprecian células apoptóticas tempranas con membrana poco desorganizada y núcleo desestructurado con escasa tinción roja, lo cual indica un estadio temprano de apoptosis.

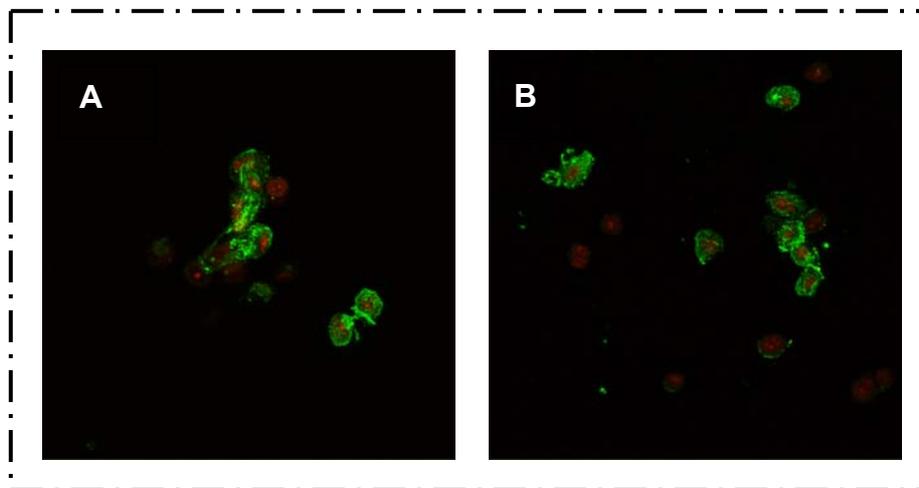


FIGURA 54. CÉLULAS DESPUÉS DE 48 HORAS DE TRATAMIENTO CON EL FÁRMACO MDG-828B (x 100). A) LÍNEA CELULAR MCF-7, B) LÍNEA CELULAR HT-29.

En la figura 55 se observa apoptosis tardía con fluorescencia verde en la membrana, núcleo desestructurado y cromatina distribuida por todo el citoplasma, característico de la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos.

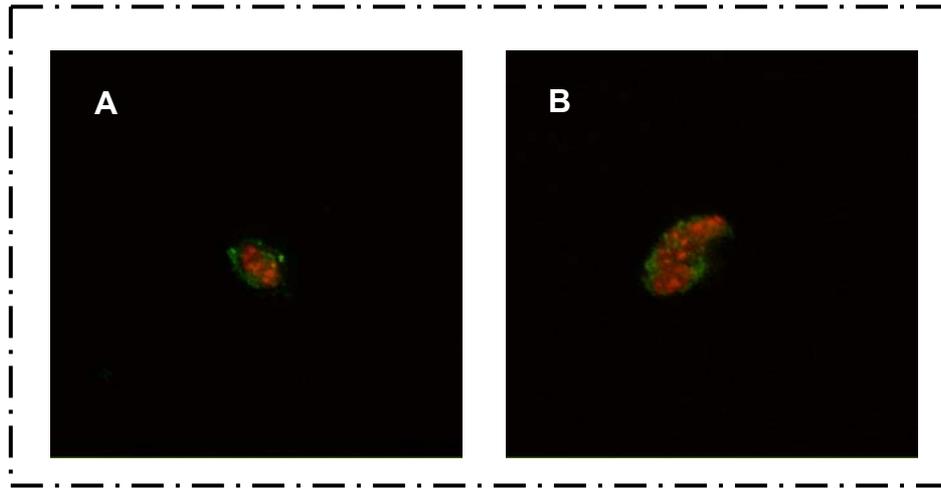


FIGURA 55. CÉLULAS DESPUÉS DE 48 HORAS DE TRATAMIENTO CON EL FÁRMACO KS-47A (x 100). A) LÍNEA CELULAR MCF-7, B) LÍNEA CELULAR MCF-10A.

En parte superior de la figura 56 encontramos un grupo de células necróticas, sin marcaje verde, dispuestas en forma circular con el núcleo expandido pero no desorganizado. El resto se correspondió con células apoptóticas tempranas y tardías.

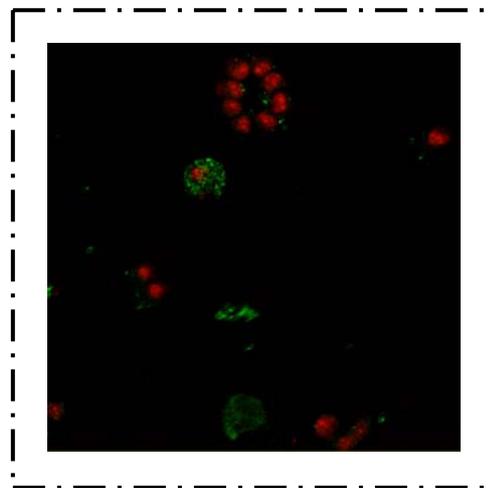


FIGURA 56. CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR IEC-6 DESPUÉS DE 48 HORAS DE TRATAMIENTO CON EL FÁRMACO KS-47B (x 100).

6. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS LÍNEAS CÉLULARES MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

Las diferentes líneas celulares fueron estudiadas en busca de cambios morfológicos producidos por la inducción de diferentes fármacos a lo largo de

72 horas en cultivo. Para ello, se usó un microscopio óptico invertido de contraste de fase.

Las cuatro líneas celulares, tanto las tumorales como las normales, al poseer todas un origen epitelial, mostraron características muy similares, aunque si pudimos observar ciertas diferencias. Así, cada línea celular se caracterizó por:

- La línea MCF-7 presentó una morfología epitelial y poligonal con células mono y multinucleadas. Su crecimiento se produjo en monocapa, como agregados irregulares (figura 57 A).

- La línea celular MCF-10A mostró características morfológicas de células epiteliales mamarias normales, creciendo en monocapa como islotes de células en estrecho contacto (figura 57 B).

- Las células de la línea HT-29 presentaron una clara morfología epitelial, creciendo en monocapa con colonias celulares de diversas formas redondeadas (figura 57 C).

- La línea celular IEC-6 consistió en una población homogénea de células con tipología epitelial, con un largo núcleo oval, y que creció en monocapa formando colonias compactas de células poligonales fuertemente cohesionadas (figura 57 D).

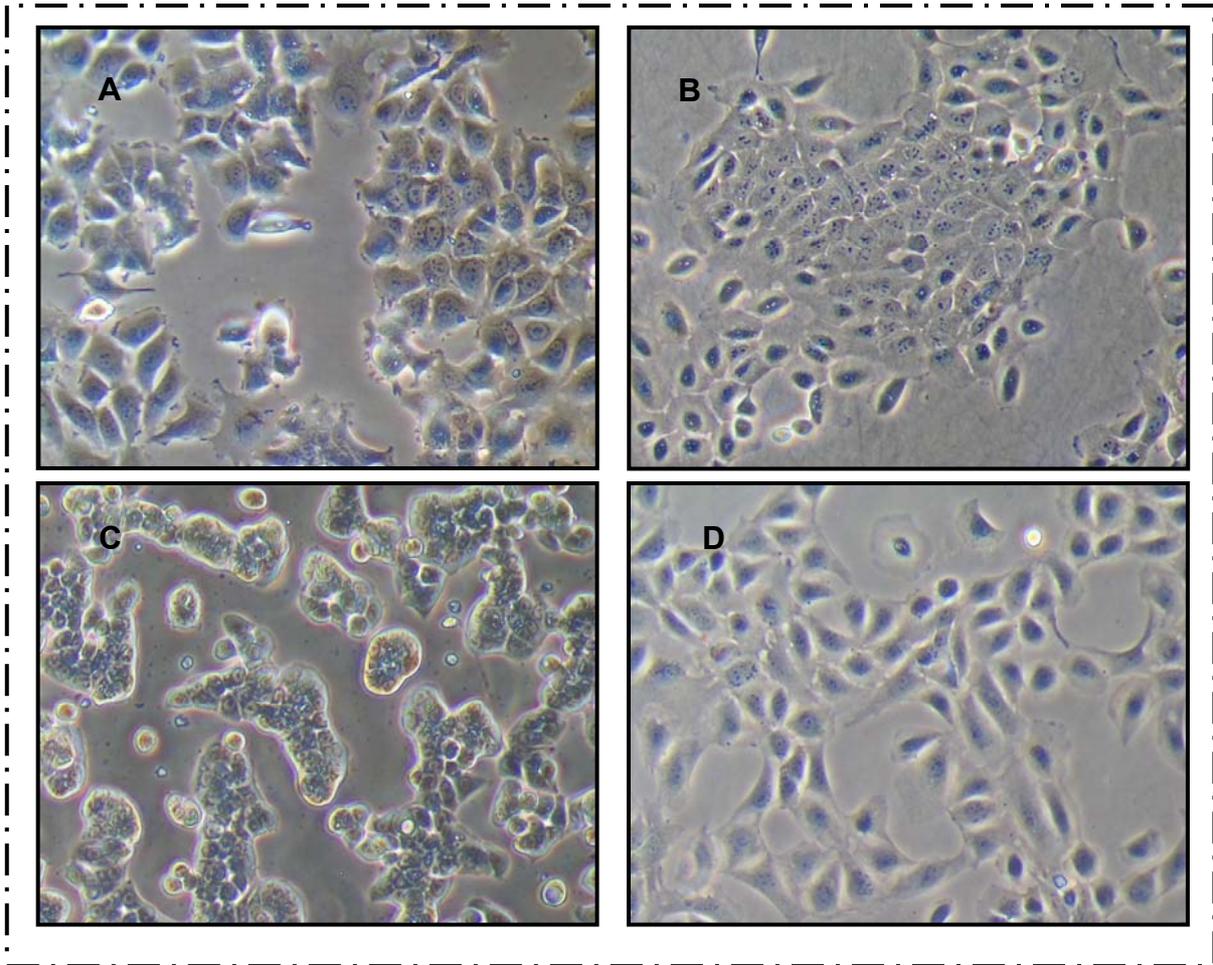


FIGURA 57. ASPECTO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS PARENTALES (x 100). A) LÍNEA CELULAR MCF-7, B) LÍNEA CELULAR MCF-10A, C) LÍNEA CELULAR HT-29, D) LÍNEA CELULAR IEC-6.

En la línea MCF-7, tras la inducción con los diferentes fármacos, las células adquirieron forma poligonal en todos los casos, permaneciendo agrupadas y desarrollando prolongaciones citoplasmáticas. Destacar, también, la presencia de gran cantidad de células muertas despegadas de la superficie de cultivo, así como de restos celulares dispersos a lo largo de toda la monocapa (figura 58).

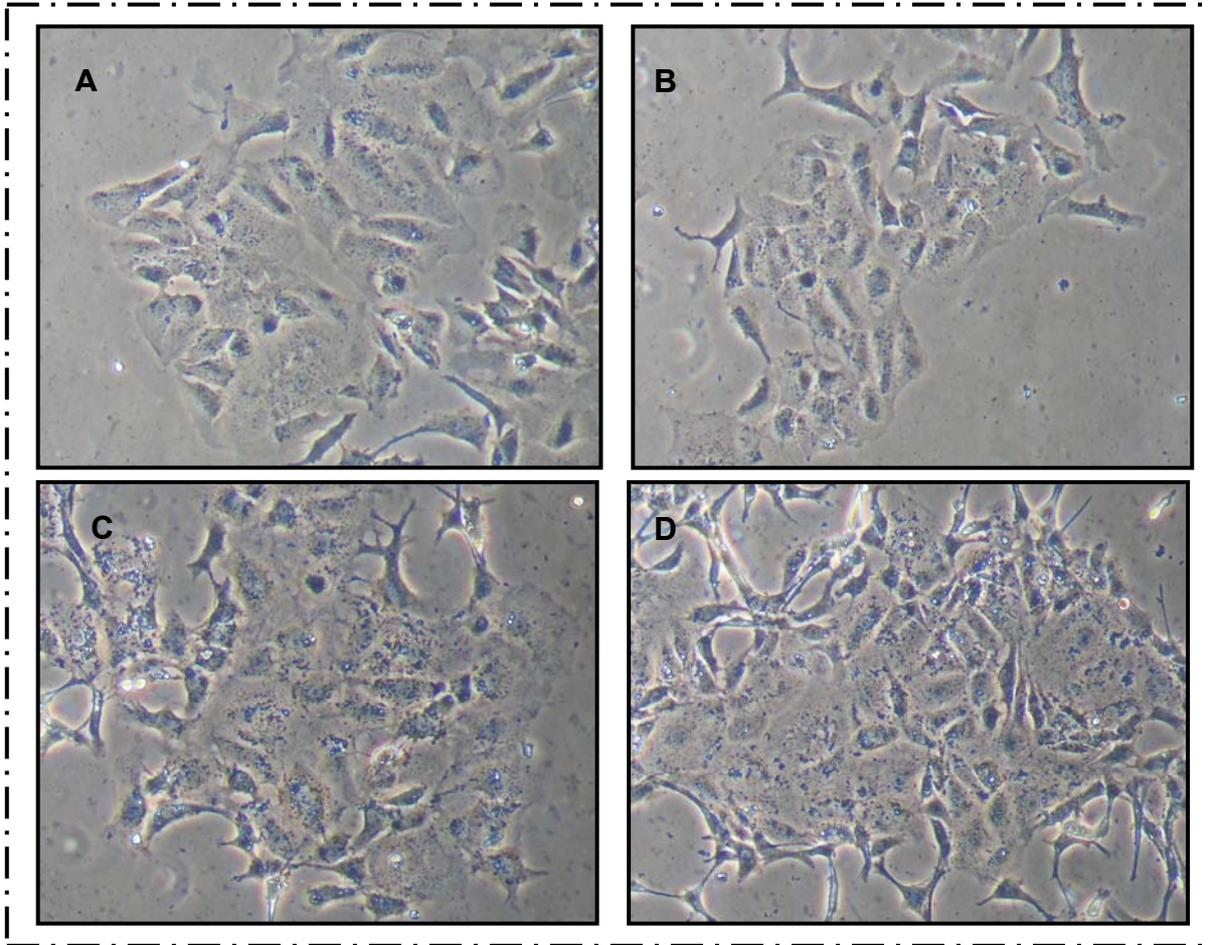


FIGURA 58. EJEMPLOS DE CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA EN CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7 INDUCIDAS POR DIFERENTES FÁRMACOS (x 100). A) TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON MDG-828B, B) TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON MDG-898D, C) TRAS 72 HORAS DE INDUCCIÓN CON KS-47A, D) TRAS 72 HORAS DE INDUCCIÓN CON MDG-884D.

En la línea celular MCF-10A se apreció, de igual modo, la existencia de células con un aspecto más alargado que las parentales. Las colonias presentaban menor grado de compactación, aspecto más irregular con bordes menos suavizados. Por otro lado, se observó frecuentemente la presencia de agrupaciones de células no vivas adheridas al soporte y células no adheridas aparentemente muertas (figura 59).

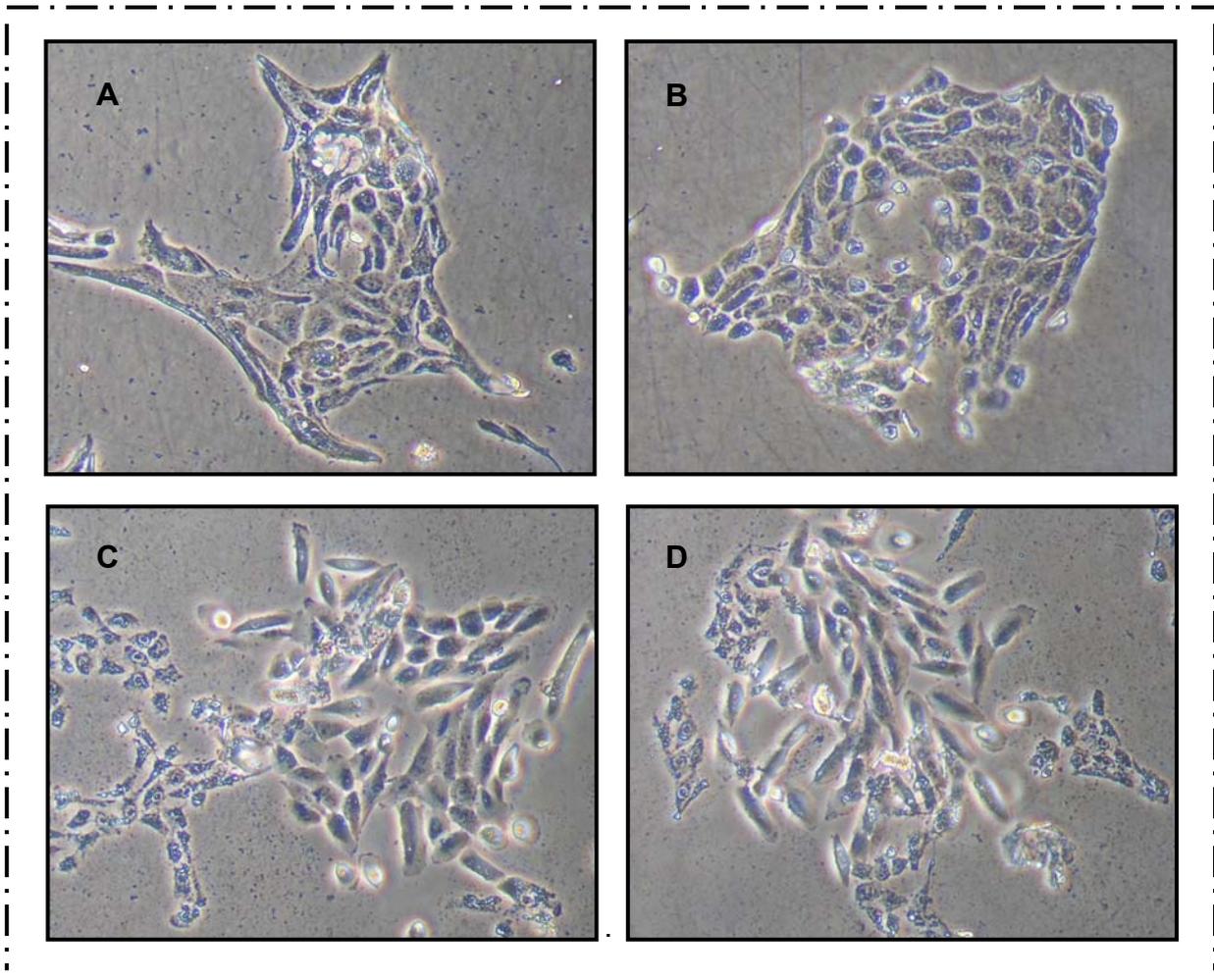


FIGURA 59. EJEMPLOS DE CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE CÉLULAS MCF-10A TRATADAS CON DIFERENTES FÁRMACOS (x 100). A) TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON MN-116B (x 100), B) TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON MDG-884D C) TRAS 72 HORAS DE INDUCCIÓN CON MN-84D, D) TRAS 72 HORAS DE INDUCCIÓN CON MDG-828B.

La línea celular HT-29 presentó en los cultivos una mayor heterogeneidad respecto al tamaño de las células que los constituyen, apareciendo células hipertróficas con presencia de material denso intracitoplasmático. Además, fue característico una mayor producción de material extracelular por parte de las colonias. Por otro lado, al igual que en los casos anteriores, apareció gran cantidad de células dispersas y restos celulares en el cultivo (figura 60).

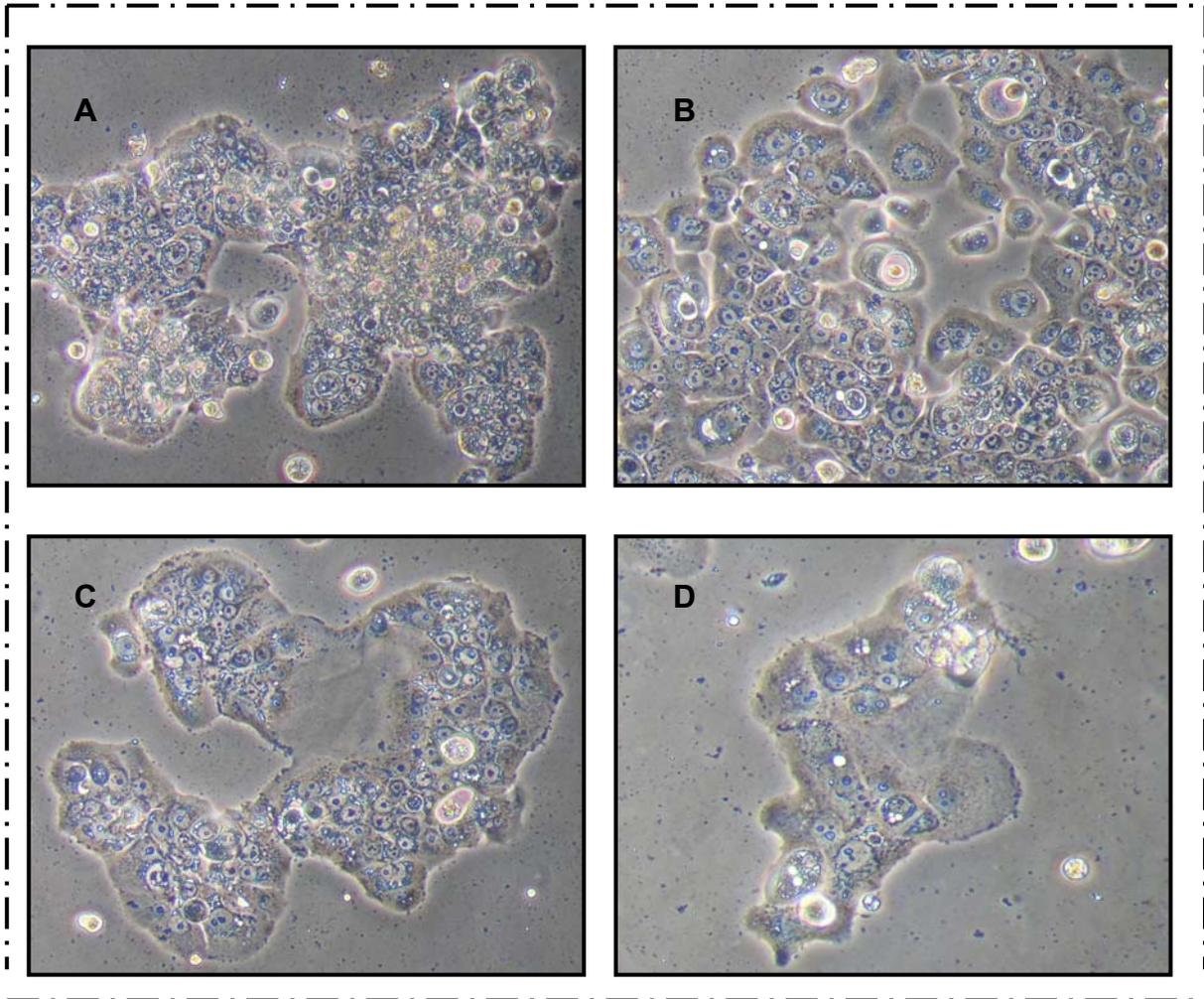


FIGURA 60. EJEMPLOS DE CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA EN CÉLULAS DE LA LÍNEA CELULAR HT-29 INDUCIDAS POR DIFERENTES FÁRMACOS (x 100). A) TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON KS-47A, B) TRAS 48 HORAS. DE INDUCCIÓN CON MN-84D, C) TRAS 72 HORAS DE INDUCCIÓN CON KS-47A, D) TRAS 72 HORAS DE INDUCCIÓN CON MB-90A.

Las colonias de la línea celular IEC-6 tratadas con los diferentes fármacos se caracterizaron por ser más dispersas, irregulares, con menor cohesión y por estar constituidas por células de tamaño heterogéneo, con mayor presencia de células fibrosas, así como células muertas tanto libres como adheridas a la superficie de cultivo. También destacó la existencia de un mayor contenido de material denso intracitoplasmático (figura 61).

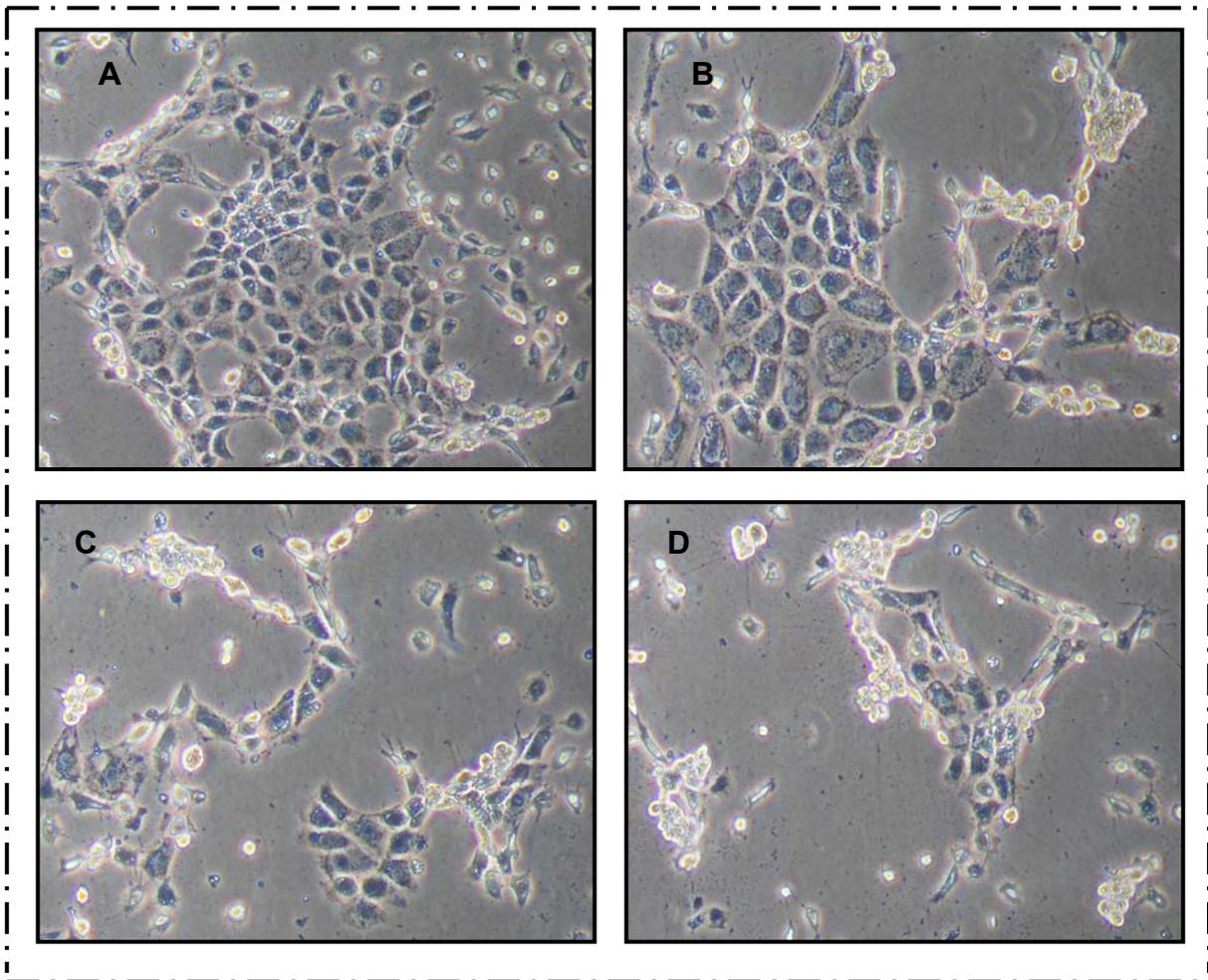


FIGURA 61. EJEMPLOS DE CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE CÉLULAS IEC-6 INDUCIDAS TRATADAS CON DIFERENTES FÁRMACOS (x 100). A) TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON MDG-898D, B) TRAS 48 HORAS DE INDUCCIÓN CON MDG-884D, C) TRAS 72 HORAS DE INDUCCIÓN CON KS-47B, D) TRAS 72 HORAS DE INDUCCIÓN CON MN-116B.

7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA POR MICROARRAYS

Para llevar a cabo el estudio de las modificaciones producidas a nivel de expresión génica, y debido a la amplitud de datos que se derivan de estos estudios (se realiza un análisis de casi 22.000 genes para cada fármaco y línea celular), seleccionamos cinco compuestos de las familias previamente elegidas.

En primer lugar, extrajimos el ARN de cada una de las muestras, tal y como se describe en el apartado 9.1 de Material y Métodos. A continuación, para determinar la idoneidad de las muestras obtenidas, chequeamos la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior

visualización por transiluminación ultravioleta. En todos los casos pudimos comprobar como el ARN se encontraba integro (figura 62).

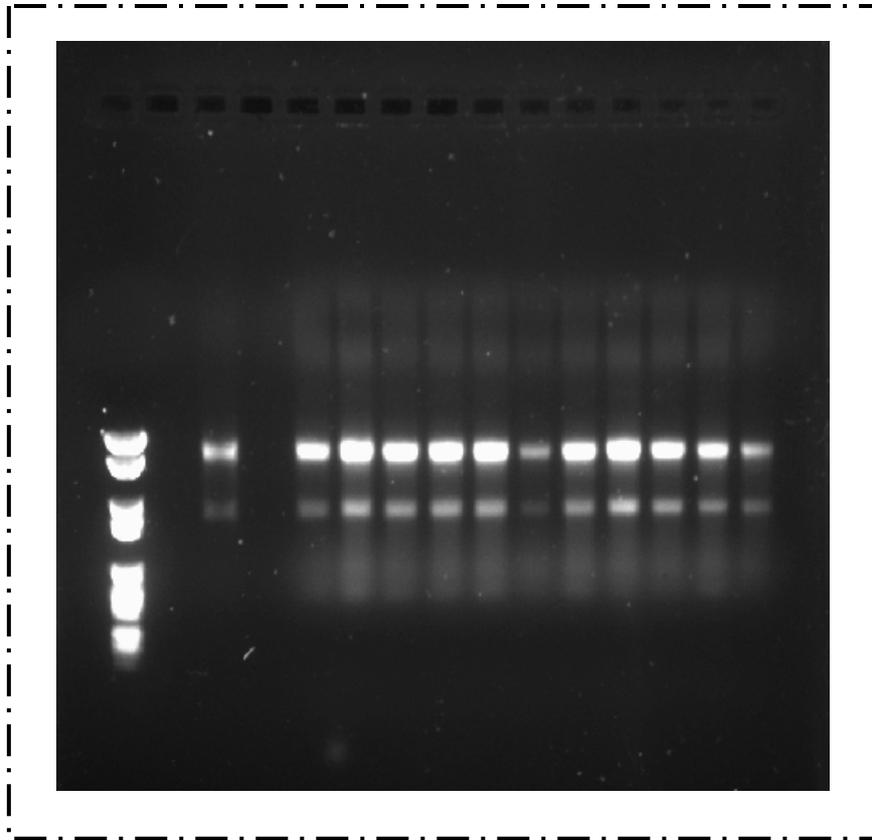


FIGURA 62. ELECTROFORESIS DEL ARN DE LA LÍNEA CELULAR MCF-7 TRATADA CON LOS DIFERENTES COMPUESTOS EN GEL DE AGAROSA, VISTA EN DENSITÓMETRO CON TRANSILUMINACIÓN ULTRAVIOLETA.

Además, las mismas muestras fueron testadas mediante bioanalizador en el servicio de genómica del CNIO, tras lo cual se pudo corroborar la calidad del material ya que al estudiar la relación entre la fracción 28S y la 18S obteníamos, en todos los casos, valores cercanos a 2 (figura 63).

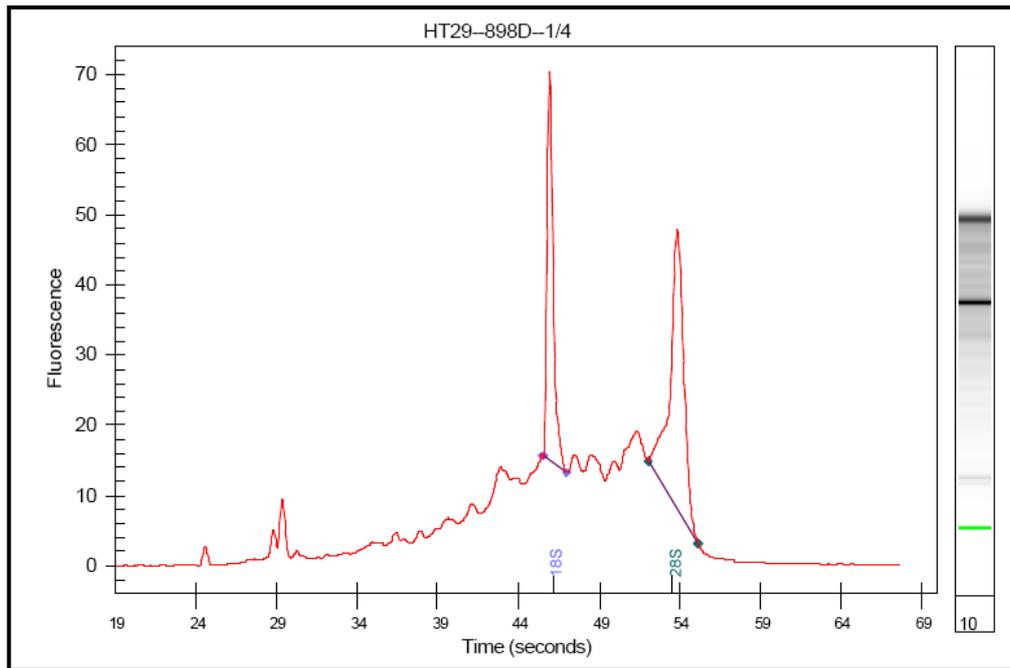


FIGURA 63. PERFIL OBTENIDO CON EL ARN DE LA LÍNEA CELULAR HT-29 TRATADA CON EL COMPUESTO MDG-898D, TRAS ANÁLISIS CON BIOANALIZADOR. EN EL LADO DERECHO TAMBIÉN PODEMOS OBSERVAR CLARAMENTE LAS DOS BANDAS CORRESPONDIENTES A LA FRACCIÓN 28S Y 18S.

Tras comprobar la integridad del ARN de todas las muestras, se procedió a su hibridación, obteniendo una serie de imágenes formadas por miles de puntos (“spots”) cada uno de cuales representaba un gen (figura 64).

Las imágenes anteriores fueron escaneadas y se realizó un análisis computacional simple de contraste binario de parejas de microarrays (tratado frente a control) utilizando el “Algorithm MAS5” de Affymetrix. Tras obtener los resultados numéricos, establecimos como criterio de selección de los genes diferencialmente expresados (Differentially Expressed Genes, DEG) valores mayores o iguales a 2 veces frente al control, tanto para genes inducidos como reprimidos. A continuación, los genes fueron agrupados basándonos en su función biológica, usando para ello la página web: <http://fatigo.bioinfo.cipf.es/> (ver Anexo).

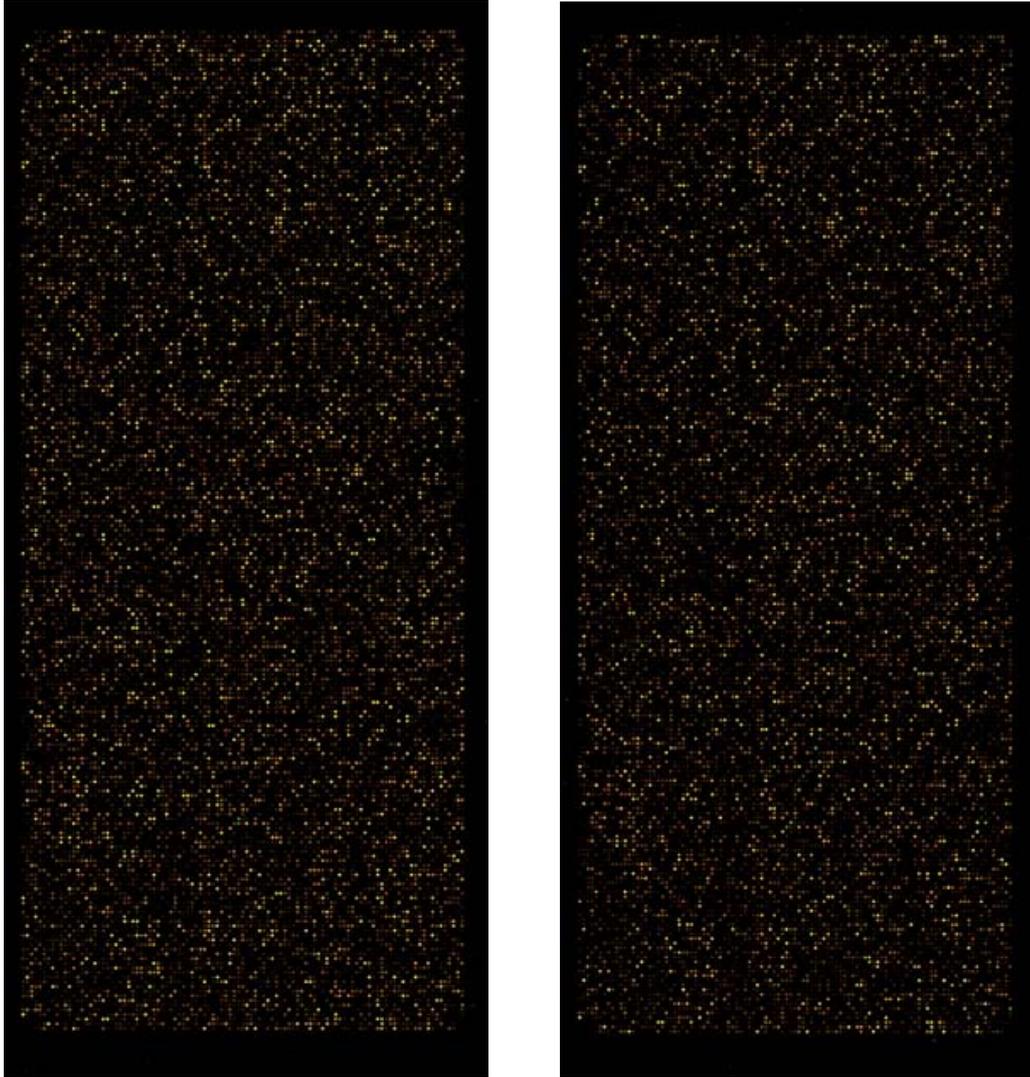


FIGURA 64. IMAGEN OBTENIDA TRAS LA HIBRIDACIÓN A) LÍNEA CELULAR MCF-10A TRATADA CON KS-47B, B) LÍNEA CELULAR HT-29 TRATADA CON MDG-898D.

7.1. LÍNEA CELULAR MCF-7

El compuesto que más cambios provocó fue el KS-47A (242 genes inducidos y 175 reprimidos) mientras que el MDG-884 D fue el que menos (178 genes inducidos y 87 reprimidos). Los otros tres fármacos mostraron valores intermedios a los anteriores y bastante parecidos, en cuanto a número de DEG se refiere (figura 64).

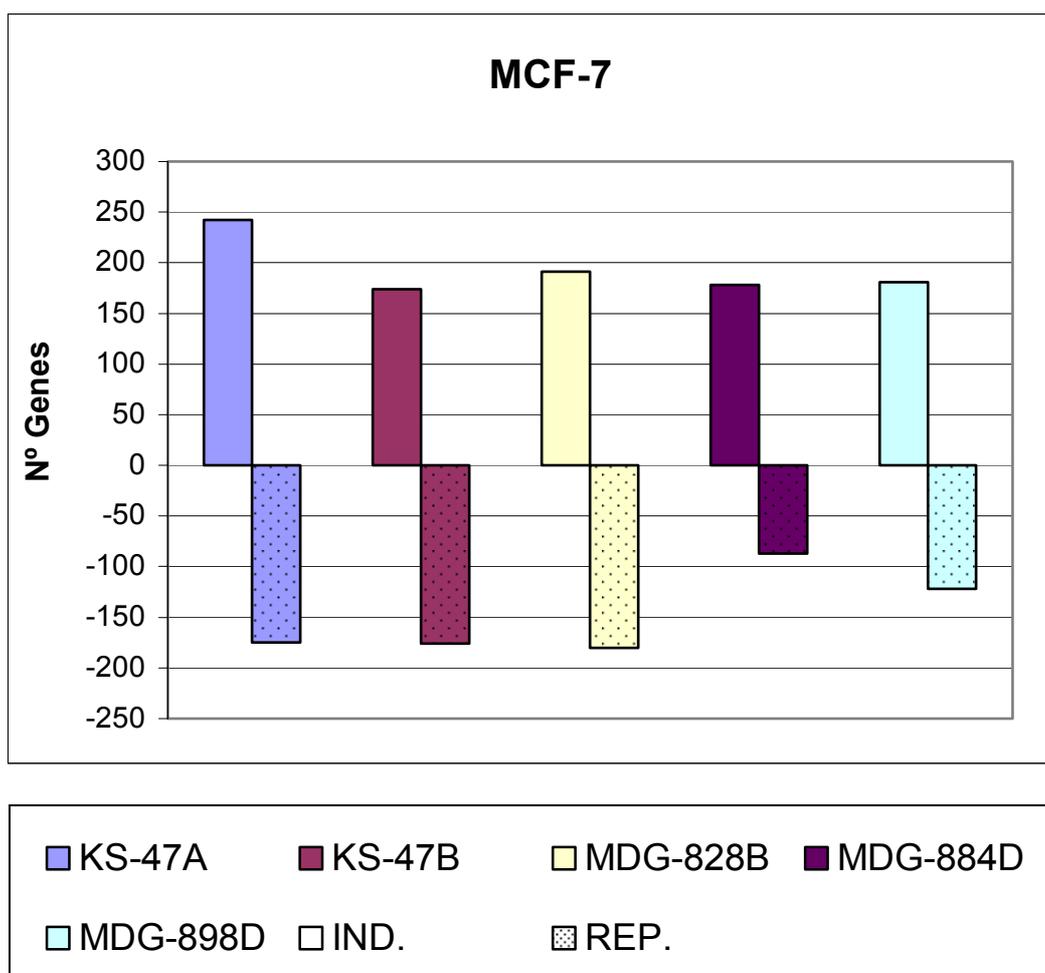


FIGURA 65. NÚMERO DE GENES INDUCIDOS Y REPRIMIDOS, A PARTIR DE 2-FOLD, POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7.

A continuación, detallamos, a modo de ejemplo, la relación de genes inducidos por el compuesto KS-47B, indicando el nombre común, su referencia en el “Genebank”, su \log_2 y el proceso biológico en el que está implicado, en el caso de que se conozca. (figura 66).

| Common | Genebank Accesion | Log ₂ | GO Biological Process |
|--|---------------------------|----------------------------|---|
| regulator of G-protein signalling 6 | NM_004296 | 5,67 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; intracellular signaling cascade; regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway |
| F-box and leucine-rich repeat protein 8 | NM_018378 | 4,96 | ubiquitin cycle |
| programmed cell death 7 | NM_005707 | 4,90 | apoptosis |
| olfactory receptor, family 4, subfamily F, member hypothetical protein FLJ | NM_001001674 NM_024809 | 4,80 4,44 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; perception of smell |

| Common | Genebank Accesion | Log ₂ | GO Biological Process |
|--|-------------------|------------------|---|
| tuftelin 1 | NM_020127 | 3,36 | bone mineralization; odontogenesis |
| transmembrane protein 25 | NM_032780 | 3,07 | |
| retinitis pigmentosa 1 (autosomal dominant) | NM_006269 | 3,01 | intracellular signaling cascade; phototransduction, visible light; visual perception |
| chromosome 1 open reading frame 26 | NM_017673 | 2,98 | |
| UDP glycosyltransferase 8 (UDP-galactose ceramide galactosyltransferase) | | 2,88 | |
| angiotensin II receptor-like 1 | NM_005161 | 2,61 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway |
| late cornified envelope 1B | NM_178349 | 2,60 | |
| wingless-type MMTV integration site family, member 10B | NM_003394 | 2,58 | development; frizzled-2 signaling pathway; signal transduction |
| Rho GTPase activating protein 6 | NM_001174 | 2,51 | Rho protein signal transduction; actin filament polymerization |
| A kinase (PRKA) anchor protein 3 | NM_006422 | 2,50 | acrosome reaction; cell motility |
| sperm associated antigen 9 | NM_172345 | 2,50 | spermatogenesis |
| matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted) | NM_002428 | 2,49 | protein modification; proteolysis and peptidolysis |
| hypothetical protein FLJ39117 | XM_371312 | 2,49 | |
| toll-like receptor 7 | | 2,48 | |
| sidekick homolog 1 (chicken) | | 2,48 | |
| ROBO2 | NM_002942 | 2,45 | |
| fatty acid binding protein 7, brain | NM_001446 | 2,44 | fatty acid metabolism; negative regulation of cell proliferation; neurogenesis; transport |
| glutathione S-transferase A5 | NM_153699 | 2,44 | metabolism |
| ST6 (alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3 | NM_152996 | 2,43 | |
| heat shock transcription factor, Y linked 2 | NM_001001877 | 2,42 | regulation of transcription, DNA-dependent |
| FLJ16046 protein | NM_207407 | 2,41 | proteolysis and peptidolysis |
| aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type I; dihydrodiol dehydrogenase 4) | NM_001818 | 2,41 | androgen metabolism; bile acid transport |
| cancer antigen 1 | NM_175745 | 2,41 | |
| sema domain, immunoglobulin domain (Ig), and GPI membrane anchor, (semaphorin) 7A | NM_003612 | 2,40 | development; immune response; neurogenesis |
| discs, large homolog 2, chapsyn-110 (Drosophila) | NM_001364 | 2,40 | |
| similar to hypothetical prot | NM_203422 | 2,40 | |
| insulin growth factor-like | NM_198541 | 2,40 | |

| Common | Genebank Accesion | Log ₂ | GO Biological Process |
|---|-------------------|------------------|---|
| hypothetical protein FLJ20716 | NM_017938 | 2,39 | chromatin silencing; chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota); fertilization, exchange of chromosomal proteins; nucleosome disassembly; sexual reproduction; single strand break repair; sperm motility; spermatid nuclear elongation; spermatogenesis |
| transition protein 1 (during histone to protamine replacement) | NM_003284 | 2,39 | chromatin silencing; chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota); fertilization, exchange of chromosomal proteins; nucleosome disassembly; sexual reproduction; single strand break repair; sperm motility; spermatid nuclear elongation; spermatogenesis |
| nicotinamide nucleotide adenyltransferase 2 | NM_015039 | 2,38 | NAD biosynthesis; phospholipid biosynthesis |
| netrin G1 | NM_014917 | 2,38 | axonogenesis |
| acid phosphatase, prostate | NM_001099 | 2,38 | regulation of cell cycle |
| zinc finger protein 382 | NM_032825 | 2,37 | regulation of transcription, DNA-dependent |
| phospholipase C-like 2 | NM_015184 | 2,37 | intracellular signaling cascade; lipid metabolism |
| microsomal triglyceride transfer protein (large polypeptide, 88kDa) | NM_000253 | 2,36 | lipid metabolism; lipid transport |
| cysteine-rich secretory protein 3 | NM_006061 | 2,36 | cell-cell adhesion; defense response; fertilization; innate immune response; spermatogenesis |
| hypothetical protein MGC40178 | NM_152325 | 2,36 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; adenylate cyclase activation; cell proliferation; glucose transport; phospholipase C activation; positive regulation of cytosolic calcium ion concentration; respiratory gaseous exchange; signal transduction; smooth muscle contraction |
| endothelin receptor type A | NM_001957 | 2,35 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; adenylate cyclase activation; cell proliferation; glucose transport; phospholipase C activation; positive regulation of cytosolic calcium ion concentration; respiratory gaseous exchange; signal transduction; smooth muscle contraction |
| scrapie responsive protein 1 | NM_007281 | 2,35 | neurogenesis |
| recoverin | NM_002903 | 2,35 | signal transduction; visual perception |
| hypothetical protein MGC13057 | | 2,34 | |
| ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11 | NM_003742 | 2,34 | transport |
| proteolipid protein 1 (Pelizaeus-Merzbacher disease, spastic paraplegia 2, uncomplicated) | | 2,34 | |
| regulator of G-protein signalling 13 | NM_002927 | 2,33 | signal transduction |
| collagen, type XXVII, alpha 1 | | 2,33 | |
| GATA binding protein 5 | NM_080473 | 2,33 | positive regulation of transcription; regulation of transcription, DNA-dependent |
| orthodenticle homolog 2 (Drosophila) | NM_021728 | 2,33 | development; regulation of transcription, DNA-dependent |
| ret finger protein-like 2 | NM_006605 | 2,32 | protein ubiquitination |
| Bruton agammaglobulinemia | NM_000061 | 2,32 | induction of apoptosis by extracellular signals; intracellular signaling cascade. |
| HS1-binding protein 3 | NM_106552 | 2,32 | |

FIGURA 66. GENES INDUCIDOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 TRAS TRATAMIENTO CON KS-47B.

7.2. LÍNEA CELULAR MCF-10A

En esta línea celular los compuestos KS-47A y MDG-828B fueron, con diferencia, los fármacos que menor número de DEG indujeron (147 y 135 respectivamente). En el caso contrario se encuentra el compuesto MDG-898D que provocó diferencias significativas en la expresión de 425 genes (figura 67).

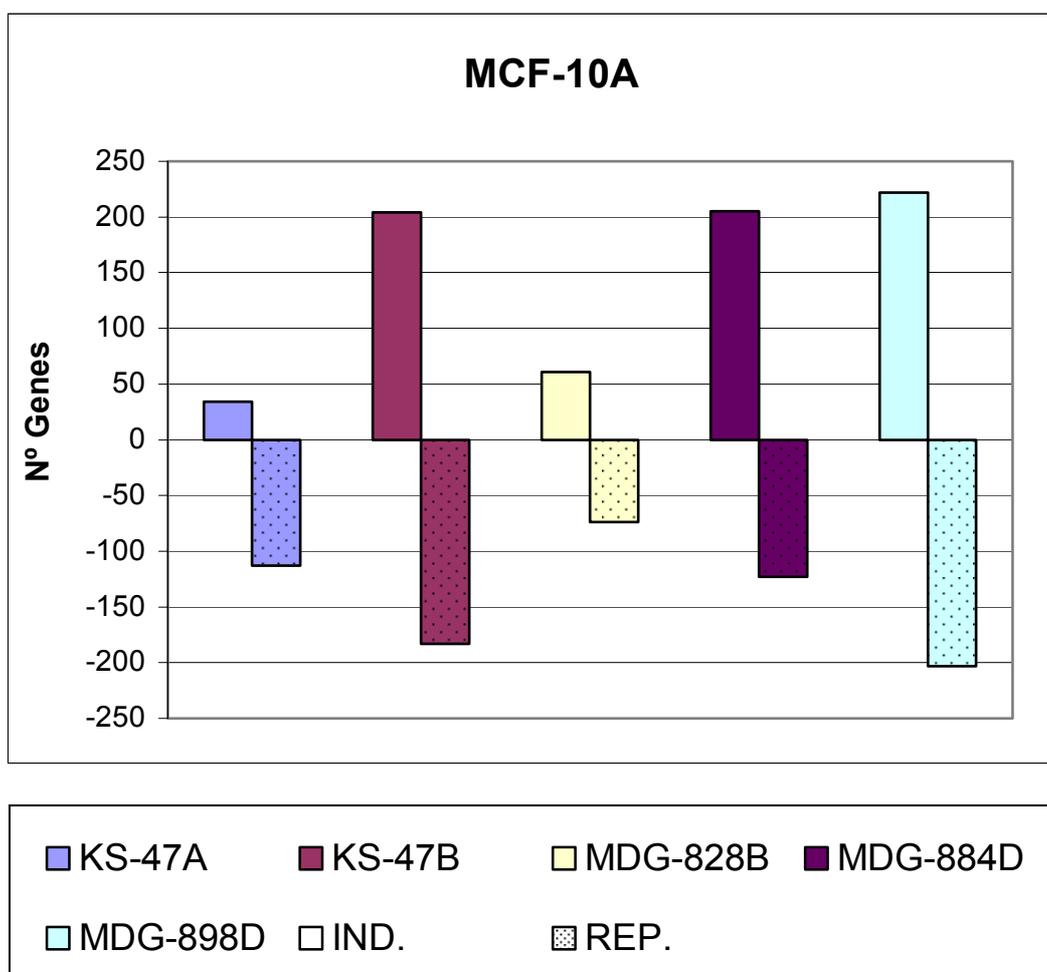


FIGURA 67. NÚMERO DE GENES INDUCIDOS Y REPRIMIDOS, A PARTIR DE 2-FOLD, POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A.

En esta ocasión reseñamos los genes reprimidos por el fármaco MDG-828B en la línea celular mCF-10A, indicando el nombre común, su referencia en el “Genebank”, su \log_2 y el proceso biológico en el que está implicado, en el caso de que se conozca.(figura 68).

| Common | Genebank Accesion | Log ₂ | GO Biological Process |
|--|------------------------------|------------------------|--|
| regulator of G-protein signalling 7 | NM_002924 | -3,34 | intracellular signaling cascade; regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway |
| mesenchymal stem cell protein cadherin 8, type 2 | DSCD28 NM_001796 | -3,20 -2,57 | cell adhesion; homophilic cell adhesion |
| hypothetical protein MGC44505 | NM_178553 | -2,35 | |
| C-type lectin domain family 4, member D | NM_080387 | -2,32 | |
| hypothetical protein FLJ10159 | NM_018013 | -2,00 | STAT protein nuclear translocation; acute-phase response; apoptosis; caspase activation; development; fibrinolysis; platelet activation; proteolysis and peptidolysis; regulation of blood coagulation; regulation of cell cycle; response to wounding; tyrosine phosphorylation of STAT protein |
| coagulation factor II (thrombin) | NM_000506 | -1,99 | |
| hypothetical protein FLJ39822 | NM_173512 | -1,86 | amino acid transport |
| pogo transposable element with KRAB domain | NM_017542 | -1,79 | anti-apoptosis; development; regulation of transcription, DNA-dependent |
| MCF.2 cell line derived transforming sequence-like | NM_024979 | -1,76 | electron transport; intracellular signaling cascade |
| hypothetical protein MGC45806 | NM_152304 | -1,67 | small GTPase mediated signal transduction |
| myelin transcription factor 1 | NM_004535 | -1,63 | regulation of transcription, DNA-dependent |
| ankyrin repeat domain 30A | NM_052997 | -1,58 | regulation of transcription, DNA-dependent |
| potassium channel, subfamily K, member 3 | NM_002246 | -1,58 | ion transport; potassium ion transport; synaptic transmission |
| hypothetical protein FLJ35976 | NM_173639 | -1,55 | |
| claudin 2 | NM_020384 | -1,50 | GO:16338(calcium-independent cell-cell adhesion) |
| heat shock regulated 2 | NM_018296 | -1,49 | |
| doublecortin and CaM kinase-like 2 | NM_152619 | -1,48 | intracellular signaling cascade; protein amino acid phosphorylation |
| KIAA1900 | | -1,45 | |
| caspase 14, apoptosis-related cysteine protease | NM_012114 | -1,44 | apoptosis; epidermis development; proteolysis and peptidolysis |
| microsomal triglyceride transfer protein (large polypeptide, 88kDa) | NM_000253 | -1,43 | lipid metabolism; lipid transport |
| fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor) | NM_002010 | -1,42 | cell differentiation; cell proliferation; cell-cell signaling; regulation of cell cycle; signal transduction |
| potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M beta member 3 | NM_171828 | -1,37 | potassium ion transport |
| uroplakin 1A | NM_007000 | -1,36 | |
| Common | Genebank Accesion | Log₂ | GO Biological Process |
| chemokine-like receptor 1 | NM_004072 | -1,36 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; chemotaxis; immune response; skeletal development |
| annexin A13 | NM_001003954 | -1,35 | cell differentiation; negative regulation of coagulation |
| kelch-like 10 (Drosophila) | NM_152467 | -1,35 | |
| cryptochrome 2 | NM_021117 | -1,31 | DNA repair |

| Common | Genebank Accession | Log ₂ | GO Biological Process |
|--|-------------------------------|------------------------|---|
| chorionic gonadotropin, beta polypeptide 1 | NM_033377 | -1,31 | |
| hypothetical protein BC019238 | NM_138789 | -1,28 | |
| protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha | NM_004157 | -1,28 | intracellular signaling cascade; protein amino acid phosphorylation; signal transduction |
| hypothetical protein MGC34732 | NM_173556 | -1,27 | |
| olfactory receptor, family 51, subfamily B, member 4 | NM_033179 | -1,27 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; perception of smell |
| metallothionein 2A | NM_005953 | -1,27 | copper ion homeostasis |
| polymerase (DNA directed), eta | NM_006502 | -1,25 | DNA replication; regulation of DNA repair |
| glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1 | NM_001503 | -1,25 | cell-matrix adhesion |
| hypothetical protein FLJ37538 | NM_173564 | -1,25 | |
| glutamate receptor, metabotropic 7 | NM_000844 | -1,25 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; negative regulation of adenylate cyclase activity; perception of smell; synaptic transmission |
| ras homolog gene family, member B | NM_004040 | -1,24 | angiogenesis; cell adhesion; cell cycle; endosome to lysosome transport; negative regulation of cell cycle; positive regulation of angiogenesis; programmed cell death, transformed cells; protein transport; small GTPase mediated signal transduction |
| chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 | NM_002996 | -1,23 | cell adhesion; cytokine and chemokine mediated signaling pathway; immune cell chemotaxis; immune response; leukocyte adhesive activation; positive regulation of calcium-independent cell-cell adhesion; positive regulation of inflammatory response |
| ninjurin 2 | NM_016533 | -1,23 | cell adhesion; neurogenesis; neuronal cell adhesion; tissue regeneration |
| olfactory receptor, family 4, subfamily P, member 4 | NM_001004124 | -1,23 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; perception of smell |
| matrilin 1, cartilage matrix protein | NM_002379 | -1,21 | cartilage condensation; extracellular matrix organization and biogenesis; protein complex assembly |
| transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I) | NM_000371 | -1,20 | thyroid hormone generation; transport |
| ATPase, Class I, type 8B, member 3 | NM_138813 | -1,19 | cation transport |
| dehydrodolichyl diphosphate synthase | NM_024887 | -1,19 | metabolism |
| Common | Genebank Accession | Log₂ | GO Biological Process |
| C-type lectin domain family 12, member A | NM_201625 | -1,18 | |
| major intrinsic protein of lens fiber | NM_012064 | -1,18 | cell-cell signaling; transport; visual perception |
| defensin, beta 123 | NM_153324 | -1,15 | defense response to bacteria |
| major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 | NM_002123 | -1,15 | antigen presentation, exogenous antigen; antigen processing, exogenous antigen via MHC class II; immune response |
| KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) | NM_153705 | -1,14 | |

| Common | Genebank Accession | Log ₂ | GO Biological Process |
|--|-----------------------|------------------|--|
| hypothetical protein FLJ25955 | NM_178821 | -1,14 | |
| lymphocyte antigen 75 platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen) | NM_002349 | -1,14 | endocytosis; inflammatory response |
| late cornified envelope 2B | NM_000442 | -1,14 | cell motility; cell recognition; signal transduction |
| hypothetical protein MGC10814 | NM_014357 | -1,12 | epidermis development |
| myomesin 1 (skelemin) 185kDa | | -1,12 | |
| Hpall tiny fragments locus 9C | NM_022727 | -1,11 | |
| chromosome X open reading frame 50 | NM_152693 | -1,11 | |
| hypothetical protein MGC16142 | | -1,11 | |
| collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive) | NM_000094 | -1,11 | cell adhesion; epidermis development; phosphate transport |
| extracellular matrix protein 2, female organ and adipocyte specific | | -1,10 | |
| C2orf16 | NM_032266 | -1,10 | |
| neccin homolog (mouse) | NM_002487 | -1,09 | negative regulation of cell proliferation; neurogenesis; regulation of cell cycle; regulation of cell growth; regulation of transcription, DNA-dependent |
| organic solute transporter beta | NM_178859 | -1,09 | |
| CUB and Sushi multiple domains 2 | NM_052896 | -1,08 | |
| CD33 antigen (gp67) | NM_001772 | -1,07 | cell adhesion; cell-cell signaling; negative regulation of cell proliferation; signal transduction |
| hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like | NM_014571 | -1,06 | neurogenesis; regulation of transcription, DNA-dependent |
| TSPY-like 2 | NM_022117 | -1,06 | cytokinesis; negative regulation of DNA replication; negative regulation of cell cycle; negative regulation of cell growth; nucleosome assembly; regulation of protein kinase activity; regulation of signal transduction |
| KIT ligand | NM_000899 | 1,06- | cell adhesion; cell proliferation; G-protein coupled receptor protein signaling pathway; negative regulation of adenylate cyclase activity; synaptic transmission |
| G protein-coupled receptor 51 | NM_005458 | -1,05 | calcium-mediated signaling; cyclic- nucleotide-mediated signaling; intracellular signaling cascade; intracellular transport; regulation of RNA-nucleus export |
| nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)- type motif 11 | NM_018159 | -1,05 | |
| t-complex-associated-testis- expressed 3 | NM_174910 | -1,03 | |
| sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1 | NM_014465 | -1,02 | biogenic amine metabolism; steroid metabolism |
| CD1A antigen, a polypeptide | | -1,02 | |
| interleukin 12 receptor, beta 2 | NM_001559 | -1,02 | cell surface receptor linked signal transduction; positive regulation of cell proliferation |
| early growth response 4 | NM_001965 | -1,02 | positive regulation of cell proliferation; regulation of transcription, DNA-dependent |

| Common | Genebank Accession | Log ₂ | GO Biological Process |
|--|--------------------|------------------|---|
| cytochrome P450, family 26, subfamily A, polypeptide 1 | NM_057157 | -1,01 | electron transport; metabolism |
| hypothetical protein LOC120376 | XM_071712 | -1,01 | |
| prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1), 42kDa | NM_000955 | -1,00 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway |
| keratin 15 | NM_002275 | -1,00 | epidermis development |
| Duffy blood group | NM_002036 | -0,99 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway |
| hypothetical protein MGC48915 | NM_178540 | -0,98 | |
| BAI1-associated protein 2-like 2 | | -0,98 | |
| hypothetical protein MGC35169 | NM_152324 | -0,97 | |
| protein tyrosine phosphatase, receptor type, R | NM_002849 | -0,97 | embryonic development (sensu Mammalia); enzyme linked receptor protein signaling pathway; protein amino acid dephosphorylation |
| chloride channel, calcium activated, family member 1 | NM_001285 | -0,97 | chloride transport |
| chromosome 20 open reading frame 186 | NM_182519 | -0,97 | |
| lipase, gastric | NM_004190 | -0,97 | lipid catabolism; triacylglycerol metabolism |
| interleukin 10 receptor, alpha | NM_001558 | -0,96 | |
| poliovirus receptor-related 4 | NM_030916 | -0,96 | |
| olfactory receptor, family 2, subfamily W, member 3 | NM_001001957 | -0,96 | |
| paired box gene 6 (aniridia, keratitis) | NM_001604 | -0,96 | cell differentiation; central nervous system development; eye morphogenesis (sensu Endopterygota); organogenesis; regulation of transcription, DNA-dependent; visual perception |
| zinc finger protein 229 | NM_014518 | -0,96 | regulation of transcription, DNA-dependent |
| X antigen family, member 5 | NM_130775 | -0,95 | |
| C-type lectin domain family 4, member E | NM_014358 | -0,95 | antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata); immune response |
| potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2 | NM_000891 | -0,95 | ion transport; potassium ion transport |
| homeo box B8 | NM_024016 | -0,95 | development; regulation of transcription, DNA-dependent |
| TSPY-like 6 | NM_001003937 | -0,95 | nucleosome assembly |
| complement component 1, q subcomponent-like 2 | NM_182528 | -0,95 | phosphate transport |
| zinc finger protein 22 (KOX 15) | NM_006963 | -0,95 | odontogenesis; regulation of transcription, DNA-dependent |
| olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 4 | NM_001005196 | -0,95 | G-protein coupled receptor protein signaling pathway; perception of smell |
| tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15 | NM_005118 | -0,95 | immune response; regulation of cell cycle; signal transduction |
| solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 9 | NM_031467 | -0,94 | anion transport |
| endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 7 | NM_012152 | -0,94 | G-protein signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger; positive regulation of cytosolic calcium ion concentration; synaptic transmission |

| Common | Genebank Accession | Log ₂ | GO Biological Process |
|---|--------------------|------------------|--|
| hemiceptin | NM_031935 | -0,94 | blood coagulation; cell adhesion; homophilic cell adhesion; protein amino acid phosphorylation |
| fibroblast growth factor 21 | NM_019113 | -0,94 | cell-cell signaling; signal transduction |
| Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32) | NM_021642 | -0,94 | immune response |
| chromosome X open reading frame 44 | NM_138362 | -0,94 | |
| core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 | NM_016591 | -0,94 | O-linked glycosylation; carbohydrate metabolism |
| peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1, alpha | NM_013261 | -0,94 | RNA splicing; brown adipocyte differentiation; cell glucose homeostasis; cellular respiration; digestion; fatty acid oxidation; gluconeogenesis; mRNA processing; mitochondrion organization and biogenesis; positive regulation of fatty acid oxidation; positive regulation of gluconeogenesis; positive regulation of histone acetylation; protein complex assembly; protein stabilization; regulation of transcription, DNA-dependent; response to starvation; thermoregulation; transcription initiation from Pol II promoter |
| protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein | NM_003891 | -0,94 | blood coagulation; proteolysis and peptidolysis |
| neural retina leucine zipper | NM_006177 | -0,93 | regulation of rhodopsin gene activity; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription from Pol II promoter; visual perception |
| cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4) | NM_004936 | -0,93 | cell cycle; cell cycle arrest; negative regulation of cell cycle; negative regulation of cell proliferation; regulation of cyclin dependent protein kinase activity |
| ATPase type 13A5 | XM_496332 | -0,92 | |
| tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1, 34kDa) | NM_003326 | -0,92 | cell-cell signaling; immune response; positive regulation of cell proliferation; signal transduction |
| egl nine homolog 3 (C. elegans) | NM_022073 | -0,92 | protein metabolism |
| tripartite motif-containing 55 | NM_184086 | -0,91 | protein ubiquitination; signal transduction |
| ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B, isoform 1 (Renal tubular acidosis with deafness) | NM_001692 | -0,91 | ATP synthesis coupled proton transport; energy coupled proton transport, against electrochemical gradient; excretion; perception of sound |

FIGURA 68. GENES REPRIMIDOS EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A TRAS TRATAMIENTO CON MDG-828B.

7.3. LÍNEA CELULAR HT-29

Lo más reseñable del efecto de los diferentes compuestos sobre esta línea celular fue que aparecen, en todos los casos, un mayor número de genes reprimidos que inducidos. El caso extremo lo encontramos en el fármaco MDG-898D donde se indujeron tan sólo 35, por los 165 que se reprimieron (figura 69).

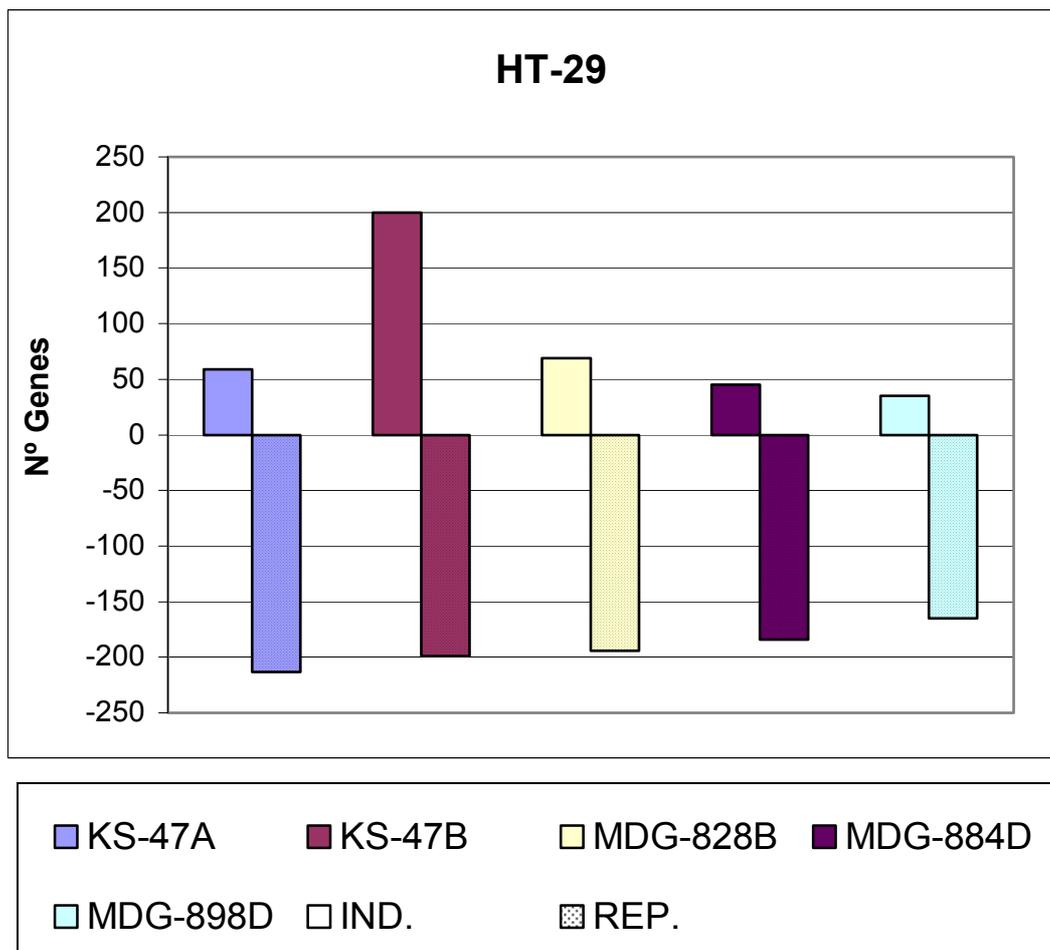


FIGURA 69. NÚMERO DE GENES INDUCIDOS Y REPRIMIDOS, A PARTIR DE 2-FOLD, POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR HT-29.

En este caso representamos, a modo de ejemplo, el nombre común, referencia en el “Genebank”, \log_2 y el proceso biológico al que está asociado de los genes inducidos por MDG-884D en HT-29 (figura 70).

| Common | Genebank Accession | Log ₂ | GO Biological Process |
|--|-----------------------|------------------|---|
| tubulin, beta 4 | NM_006087 | 3,22 | microtubule polymerization; microtubule-based movement; natural killer cell mediated cytotoxicity |
| lysosomal-associated membrane protein 3 | NM_014398 | 2,49 | cell proliferation |
| unc-5 homolog B (C. elegans) | NM_170744 | 2,37 | apoptosis; development; signal transduction |
| chromosome 1 open reading frame 24 | NM_022083 | 2,35 | protein folding |
| procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 | NM_182943 | 2,35 | protein metabolism; protein modification |
| KIAA0553 protein | NM_001002909 | 2,27 | Biological_process unknown |
| homeo box B8 | NM_024016 | 2,19 | development; regulation of transcription, DNA-dependent |
| tumor protein p53 inducible nuclear protein 1 | NM_033285 | 2,05 | |
| cadherin 15, M-cadherin (myotubule) | NM_004933 | 1,79 | cell adhesion; homophilic cell adhesion |
| protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit | NM_017431 | 1,79 | fatty acid biosynthesis; generation of precursor metabolites and energy; protein kinase cascade |
| acetyl-Coenzyme A synthetase 2 (ADP forming) | NM_018677 | 1,68 | lipid biosynthesis; metabolism |
| cingulin-like 1 | NM_032866 | 1,62 | |
| stimulated by retinoic acid gene 6 homolog (mouse) | NM_022369 | 1,61 | |
| phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated | NM_002599 | 1,60 | signal transduction |
| A kinase (PRKA) anchor protein 10 | NM_007202 | 1,59 | protein localization; signal transduction |
| chromosome 20 open reading frame 96 | NM_153269 | 1,59 | |
| very low density lipoprotein receptor | NM_003383 | 1,58 | cholesterol metabolism; endocytosis; lipid transport; memory; neurogenesis; signal transduction |
| melanoma antigen egl nine homolog 3 (C. elegans) | NM_022073 | 1,55 | protein metabolism |
| serine/threonine kinase 23 | NM_014370 | 1,54 | protein amino acid phosphorylation |
| aldolase C, fructose-bisphosphate | NM_005165 | 1,52 | fructose metabolism; glycolysis |
| N-myc downstream regulated gene 1 | NM_006096 | 1,50 | cell differentiation; response to metal ion |
| solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1 | NM_000341 | 1,46 | L-cystine transport; amino acid metabolism; basic amino acid transport; carbohydrate metabolism |
| aquaporin 1 (channel-forming integral protein, 28kDa) | NM_198098 | 1,42 | excretion; transport; water transport |
| carbonic anhydrase IX | NM_001216 | 1,41 | one-carbon compound metabolism |
| transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I) | NM_000371 | 1,40 | thyroid hormone generation; transport |
| interferon induced transmembrane protein 1 (9-27) | NM_003641 | 1,40 | cell surface receptor linked signal transduction; immune response; negative regulation of cell proliferation; regulation of cell cycle; response to biotic stimulus |

| Common | Genebank Accesion | Log ₂ | GO Biological Process |
|--|-------------------|------------------|--|
| tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 | NM_006290 | 1,37 | anti-apoptosis; negative regulation of transcription; ubiquitin cycle |
| protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11 (Noonan syndrome 1) | NM_002834 | 1,37 | intracellular signaling cascade; perception of sound; protein amino acid dephosphorylation |
| A kinase (PRKA) anchor protein 7 | NM_016377 | 1,36 | ion transport; protein localization |
| hypothetical protein MGC45491 | NM_153246 | 1,36 | |
| calmegin | NM_004362 | 1,36 | fertilization (sensu Metazoa); protein folding |
| neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 | NM_006180 | 1,35 | neurogenesis; protein amino acid phosphorylation; transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway |
| annexin A13 | NM_001003954 | 1,35 | cell differentiation; negative regulation of coagulation |
| angiopoietin-like 4 | NM_016109 | 1,34 | cellular response to starvation; negative regulation of apoptosis; negative regulation of lipoprotein lipase activity; positive regulation of angiogenesis; positive regulation of lipid metabolism; response to hypoxia |
| family with sequence similarity 13, member A1 | NM_014883 | 1,33 | |

FIGURA 70. GENES INDUCIDOS EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 TRAS TRATAMIENTO CON MDG-884D.

7.4. LÍNEA CELULAR IEC-6

En la línea celular IEC-6 los diferentes compuestos tuvieron efectos muy homogéneos. Así, en todos, como en el caso anterior, la cantidad de genes diferencialmente reprimidos fue mayor que los inducidos, salvo en el caso de KS-47B en el que obtuvimos el mismo número de genes inducidos y reprimidos. MDG-898D fue el fármaco que más número de genes indujo, 161, y el otro de su familia, MDG-884D, el que menos. Por el contrario KS-47A y MDG-828B fueron los compuestos que más genes reprimieron, 208, y KS-47B el que menos, 158 (figura 71).

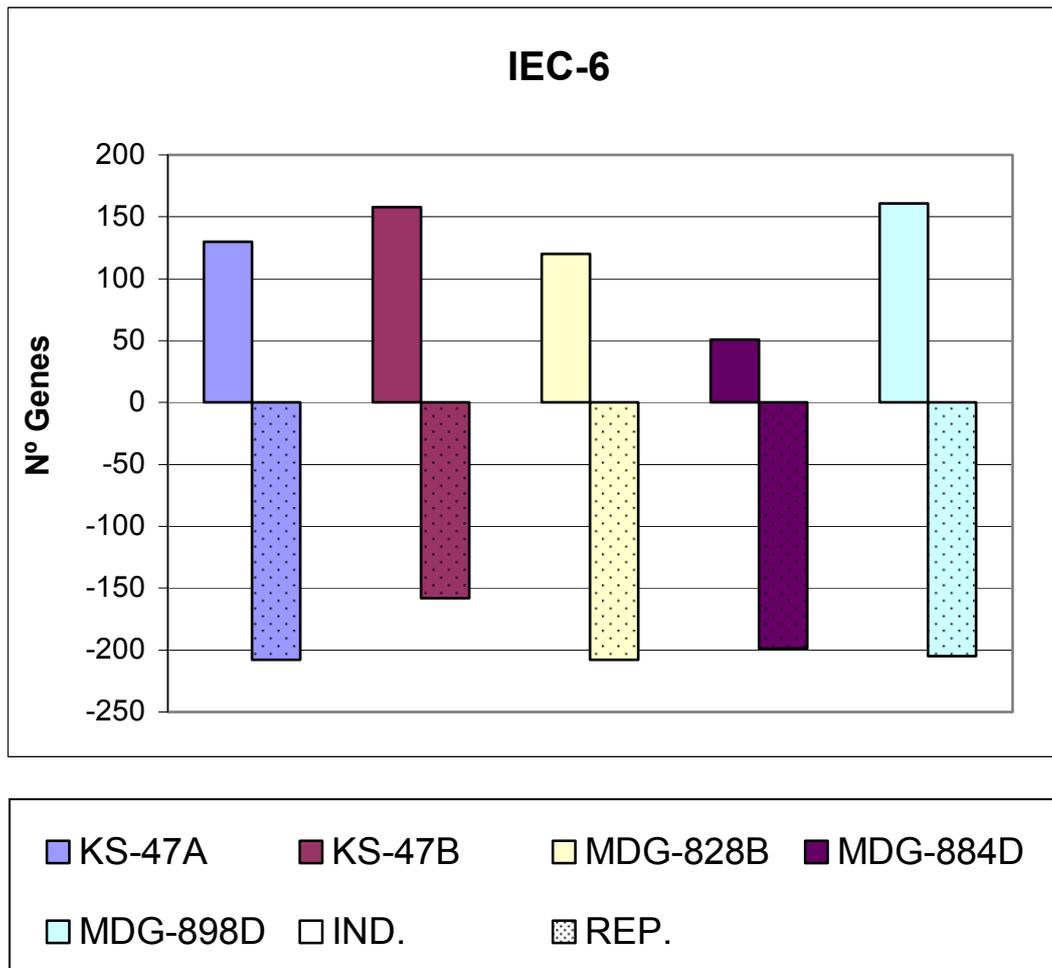


FIGURA 71. NÚMERO DE GENES INDUCIDOS Y REPRIMIDOS, A PARTIR DE 2-FOLD, POR LOS DIFERENTES FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6.

Como en los casos anteriores, a modo de ejemplo, detallamos la relación de genes inducidos por el compuesto KS-47A, indicando el nombre común, su referencia en el "Genebank", su \log_2 y el proceso biológico en el que está implicado, en el caso de que se conozca.(figura 71).

| Common | Genebank Accession | Log ₂ | GO Biological Process |
|------------------|-----------------------|------------------|--|
| A_42_P820708 | 3,40 | | A_42_P820708 |
| NM_022235 | NM_022235 | 1,99 | GO:0006810(transport);GO:0006811(ion transport);GO:0006813(potassium ion transport) |
| CB547577 | CB547577 | 1,87 | |
| XM_575808 | XM_575808 | 1,80 | |
| NM_001003706 | NM_001003706 | 1,74 | GO:0006355(regulation of transcription, DNA-dependent);GO:0006366(transcription from RNA polymerase II promoter);GO:0007275(development);GO:0007517(muscle development);GO:0007519(myogenesis);GO:0030154(cell differentiation) |
| NM_017115 | NM_017115 | 1,68 | GO:0000187(activation of MAPK activity);GO:0006260(DNA replication);GO:0007001(chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota));GO:0007173(epidermal growth factor receptor signaling pathway);GO:0007243(protein kinase cascade);GO:0008284(positive regulation of cell proliferation);GO:0018108(peptidyl-tyrosine phosphorylation);GO:0050708(regulation of protein secretion);GO:0050730(regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation) |
| NM_012842 | NM_012842 | 1,67 | |
| TC538969 | | 1,62 | |
| TC547098 | | 1,58 | |
| NM_130426 | NM_130426 | 1,57 | GO:0006915(apoptosis);GO:0006954(inflammatory response);GO:0006955(immune response);GO:0007166(cell surface receptor linked signal transduction);GO:0008219(cell death);GO:0008283(cell proliferation);GO:0019221(cytokine and chemokine mediated signaling pathway) |
| A_43_P10454 | | 1,56 | |
| XM_230592 | XM_230592 | 1,55 | |
| XM_236723 | XM_236723 | 1,55 | GO:0006281(DNA repair);GO:0006605(protein targeting) |
| A_43_P11090 | | 1,52 | |
| NM_012741 | NM_012741 | 1,52 | GO:0006954(inflammatory response);GO:0007596(blood coagulation);GO:0008217(regulation of blood pressure) |
| AW917747 | AW917747 | 1,51 | |
| BF388944 | BF388944 | 1,49 | |
| NM_001012744 | NM_001012744 | 1,48 | GO:9117(nucleotide metabolism) |
| NM_153735 | NM_153735 | 1,48 | GO:0006810(transport);GO:0007268(synaptic transmission);GO:0007417(central nervous system development) |
| XM_218927 | XM_218927 | 1,47 | GO:10003(gastrulation (sensu Mammalia)) |
| CB578554 | CB578554 | 1,45 | |
| TC551943 | | 1,45 | |
| XM_236376 | XM_236376 | 1,45 | |
| NM_017013 | NM_017013 | 1,45 | GO:0008152(metabolism) |
| XM_220771 | XM_220771 | 1,44 | |
| BF555788 | BF555788 | 1,44 | |
| NM_016991 | NM_016991 | 1,44 | GO:0007186(G-protein coupled receptor protein signaling pathway);GO:0007188(G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second |

| Common | Genebank Accesion | Log ₂ | GO Biological Process |
|--------------|----------------------|------------------|--|
| BF561032 | BF561032 | 1,43 | messenger);GO:0007204(elevation of cytoplasmic calcium ion concentration) |
| NM_001014020 | NM_001014020 | 1,43 | GO:6412(protein biosynthesis); GO:6418(tRNA aminoacylation for protein translation); GO:6435(threonyl-tRNA aminoacylation) |
| TC565431 | | 1,43 | |
| NM_176074 | NM_176074 | 1,43 | GO:6919(caspase activation); GO:6958(complement activation, classical pathway); GO:19835(cytolysis); GO:6917(induction of apoptosis); GO:45087(innate immune response) |
| NM_001012744 | NM_001012744 | 1,42 | GO:9117(nucleotide metabolism) |
| XM_347206 | XM_347206 | 1,41 | |
| XM_226525 | XM_226525 | 1,39 | |
| TC541949 | | 1,38 | |
| CB544385 | CB544385 | 1,37 | |
| XM_238569 | XM_238569 | 1,36 | |
| NM_019369 | NM_019369 | 1,36 | GO:0006953(acute-phase response);GO:0030212(hyaluronan metabolism) |
| A_43_P14127 | | 1,35 | |
| CB544670 | CB544670 | 1,35 | |
| A_43_P18778 | | 1,34 | |
| BF386279 | BF386279 | 1,34 | |
| XM_342028 | XM_342028 | 1,33 | |
| XM_342196 | XM_342196 | 1,33 | |
| TC542876 | | 1,33 | |
| TC551184 | | 1,33 | |
| A_42_P757032 | | 1,33 | |

FIGURA 72. GENES INDUCIDOS EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 TRAS TRATAMIENTO CON KS-47A.

DISCUSIÓN

Detrás de la complejidad e idiopatía de cualquier tipo de cáncer subyace un número limitado de eventos críticos que han conferido a la célula tumoral, y a su progenie, las características de expansión e invasión descontrolada. Uno de estos eventos críticos es la desregulación de la proliferación celular que, junto con la suspensión de la apoptosis necesaria para que la anterior se afiance, proporciona la base mínima necesaria para fomentar la progresión neoplásica (Evan y Vousden, 2001). Lejos de ser dos procesos independientes, las vías moleculares que controlan el ciclo celular y la apoptosis están relacionadas, de tal manera que mutaciones que originan un incremento en la proliferación celular suelen afectar a la regulación de la apoptosis (Fridman y Lowe, 2003).

La búsqueda de fármacos, que actúen específicamente frente a dianas de estos fenómenos críticos para el desarrollo del cáncer, debe proveernos potentes y específicas armas terapéuticas contra el mismo. El avance en el conocimiento de los mecanismos que regulan la proliferación celular, diferenciación y apoptosis apoya el desarrollo de nuevas estrategias basadas en el diseño de nuevos agentes antitumorales (Garret y Workman, 1999). Además, el reciente desarrollo de la tecnología de microarrays proporciona una gran arma para el conocimiento de estos mecanismos, ya que permite el estudio de las modificaciones en el patrón de expresión génica que provoca un tratamiento dado (Clarke *et al.*, 2001).

Por otro lado, el uso de líneas celulares cancerígenas como modelos para el estudio de los efectos de agentes antitumorales ha supuesto una mejora a la hora de la investigación, ya que sirve como prueba de su eficacia antes de su uso en pacientes. También es interesante el efecto que muestra un tratamiento a estudiar sobre líneas celulares no cancerígenas, ya que nos da idea del grado de especificidad de dicho tratamiento y de la posibilidad de aparición de efectos secundarios (Zhang *et al.*, 1997).

Por todo ello, estudiamos en líneas celulares tumorales y no tumorales de mama y colon las modificaciones que provocaban los nuevos fármacos antitumorales a estudiar. Se analizó los efectos que éstos tenían sobre el patrón de crecimiento, ciclo celular, apoptosis y patrón de expresión génica en cada una de las cuatro líneas.

DESARROLLO DE LOS NUEVOS FÁRMACOS ANTITUMORALES

Los compuestos estudiados en esta Tesis tienen su antecedente en el 5-fluorouracilo (5-FU), un conocido agente antitumoral que posee el inconveniente de su elevada toxicidad, lo que ha disparado el interés de la comunidad científica en la búsqueda de derivados con un mayor espectro de actuación y, sobre todo, una menor toxicidad.

Debido al hecho de que no se había llevado a cabo ningún estudio sistemático de la relación estructura-actividad de *O,N*-acetales de siete miembros, se pensó en la necesidad de acometer un estudio de estas características sobre estos compuestos tan poco estudiados en bibliografía, con el objetivo de buscar nuevos agentes anticancerosos. Propusimos, por tanto, una serie de bioisómeros de *O,N*-acetales de 5-FU de siete miembros con un anillo de benceno fusionado al núcleo heptatómico.

Por otra parte, la preparación y evaluación de un derivado con un anillo de seis miembros podría ser interesante para destacar la importancia de los compuestos con el anillo de siete miembros. Se preparó un análogo en el que la base pirimidínica sintética 5-FU se sustituyó por la base natural uracilo para demostrar el papel que jugaba en la actividad biológica tanto la base como el resto de 2,3-dihidro-5*H*-benzodioxepino. En todos estos casos, la unión del resto de 5-FU al ciclo medio (de seis o de siete miembros) o al ciclo grande (de catorce miembros) se lleva a cabo a través de su *N*-1.

En estos estudios previos se encontró la correlación entre el porcentaje de células tratadas (en forma de logaritmo) que se encuentran en la fase G_0/G_1 ,

con los compuestos estudiados a sus concentraciones Cl_{50} , y sus lipofilias calculadas mediante la opción CDR del programa PALLAS 2.0:

$$\log (\%G_0/G_1) = 1.801 (\pm 0,009) + 0,055 (\pm 0,003) \log P$$
$$n = 7, r^2 = 0,976, s = 0,006, F_{1,5} = 206,10, p < 0,001$$

donde n es el número de compuestos, r^2 es el coeficiente de correlación, s es la desviación estándar, F es la relación entre las variancias de las actividades observadas y calculadas, y los datos entre paréntesis son los errores estándares de las estimaciones.

La importancia de estos resultados radicó en que los compuestos estudiados eran fármacos *per se*, en los que el fragmento cíclico benzofusionado no actuaba como mero transportador de la unidad de 5-FU. En consecuencia, el mecanismo de acción de estos compuestos era distinto al del 5-FU lo cual proporcionaba un mayor empuje al aspecto mecanístico de este grupo estructural (Marchal *et al.*, 2004). Otro hecho destacable, y que venía a apoyar el que estas estructuras no eran profármacos del 5-FU, era la nula toxicidad que manifestaron cuando se administran intravenosamente dos veces por semana (50 mg/kg cada vez) a ratones durante 6 semanas (Saniger *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2005).

Todos estos hechos analizados en su conjunto nos permitieron afirmar que estos compuestos actuaban como verdaderos fármacos. En consecuencia, un paso importante de la investigación era la sustitución de la base pirimidínica no natural 5-FU por otras bases, pirimidínicas y púricas naturales y la correspondiente valoración de la actividad antitumoral. En caso de que el resultado fuese positivo los fármacos anticancerosos obtenidos no tendrían ninguna relación con el 5-FU, lo que permitiría obtener actividades antitumorales con menos efectos citotóxicos sobre las células normales.

MODIFICACIONES EN EL PATRÓN DE CRECIMIENTO CELULAR INDUCIDAS POR AGENTES FARMACOLÓGICOS ANTITUMORALES

Casi todos los fármacos antitumorales que se usan actualmente en el tratamiento del cáncer son agentes antiproliferativos que, preferentemente, van a matar a células en fase de división, al actuar a nivel de síntesis, replicación o procesamiento del ADN. Esto quiere decir que estos compuestos no son totalmente selectivos frente a células tumorales, pudiendo causar daño a células normales que estén proliferando. Por ello, una estrategia a desarrollar es la de proporcionar un incremento sustancial en la eficacia clínica de tales compuestos, y el desarrollo de fármacos relativamente menos tóxicos (Denny, 2001).

La baja lipofilia de los compuestos antineoplásicos hace que por parte de las células no haya una óptima biodisponibilidad de estos fármacos, al no atravesar fácilmente la membrana celular. Recientes investigaciones se han centrado en el desarrollo de modificaciones químicas para aumentar esta disponibilidad. Así, la N-aciloxialquilación de compuestos NH-acídicos tales como carboxamidas, carbamatos, ureas, imidas y otras estructuras tipo amida, ha sido considerada generalmente como un planteamiento útil para obtener derivados que combinen alta estabilidad *in vitro* con labilidad enzimática (Bundgaard y Nielsen, 1987). Estos nuevos compuestos tienen una alta lipofilia, con lo que su biodisponibilidad celular no debería ser un inconveniente para su uso.

En el presente trabajo de investigación evaluamos, en primer lugar, los efectos antiproliferativos de distintos fármacos antitumorales sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

Nuestros resultados en los ensayos de citotoxicidad han demostrado que todos los compuestos causaron una inhibición dosis dependiente del crecimiento de las células cancerígenas MCF-7. Por lo tanto la proliferación

celular se encuentra inhibida por el tratamiento de las células con los nuevos compuestos, a concentraciones comprendidas en el rango micromolar. A continuación, decidimos seleccionar los más activos para realizar con ellos un estudio más pormenorizado.

Dentro de la primera familia, *O,O*-Acetales y *O,N*-acetales cíclicos derivados de la estructura 1,4-benzodioxepínica, se observó como todos los compuestos mostraban un efecto citotóxico alto, destacando el efecto de los compuestos MB-90A y su isómero MB-90B, y KS-47A y su isómero KS-47B. Para ver posibles modificaciones causadas por el cambio de posición del cloro sustituyente, estudiamos más a fondo el efecto de estos compuestos frente a otras líneas celulares, tumorales y no tumorales, mostrándose valores variables de citotoxicidad e IT *in vitro*. De este modo, el fármaco MB-90A se mostró como un potente inhibidor de células tumorales intestinales con menor efecto citotóxico sobre las normales (IT *in vitro* de 6,04), mientras que, si cambiábamos de posición el sustituyente, el compuesto MB-90B se comportó como un fármaco muy efectivo y selectivo frente a células tumorales de estirpe tanto mamaria como intestinal, aunque con una IT *in vitro* menor que en el caso anterior (3,89).

Los otros dos isómeros también mostraron actividad antitumoral, mostrándose menos citotóxicos frente a líneas celulares normales. También se observó como la conformación del fármaco KS-47A resultaba ser más interesante que la de su isómero en el caso de células intestinales (IT *in vitro* de 13,9 frente a 1,56), y todo lo contrario en las de mama (IT *in vitro* de 0,12 y 0,63, respectivamente). Estos resultados coinciden con lo ocurrido en el caso anterior en el que el cloro en posición 9 favoreció un alto IT *in vitro* frente a células intestinales.

En la familia de los *O,O*-Acetales y *O,N*-acetales cíclicos derivados de la estructura 4,1-benzoxatiepínica se observaron valores de Cl_{50} mayores que en el caso anterior, por lo que parece que esta composición tiene menor

capacidad antitumoral. A pesar de ello, seleccionamos 3 fármacos, dos de ellos isómeros, que mostraron mayor actividad frente a MCF-7 y su efecto fue probado en las otras 3 líneas celulares. Destacaron los resultados obtenidos con MN-80C que pareció actuar de modo selectivo frente a las células de origen mamario y con mayor fuerza sobre las tumorales, obteniéndose valores de IT *in vitro* de 2,26. Por el contrario los dos compuestos isómeros se comportaron mucho más activos contra las células intestinales, siendo la estructura MN-84D las más efectiva, con valores de IT *in vitro* de 12,7. Al igual que en los casos anteriores parece que el cloro en posición 9 favorece una mayor citotoxicidad frente a células tumorales intestinales.

La familia de los *O,O*-Acetales y *O,N*-cetales cíclicos derivados de la estructura 1,4-benzoxazepínica se mostró como la de mayor acción citotóxica frente a la línea celular MCF-7, alcanzando valores de CI_{50} muy bajos. De todos los compuestos de esta familia seleccionamos los cinco que habían mostrado mayor potencial, dos de los cuales eran isómeros. Como ocurrió anteriormente el compuesto con el cloro en posición 9, MDG-828B, se mostró mucho más efectivo frente a células tumorales intestinales si lo comparamos con su isómero. En esta ocasión esta conformación también mostró mejores valores de citotoxicidad que el isómero, aunque no así con el IT *in vitro*. Los compuestos MDG-828C y MDG-958A mostraron una gran citotoxicidad frente a células tumorales de mama, pero no así frente a las de colon. Por el contrario MDG-884A2-2 mostró mayor efecto sobre las células de colon que frente a las de mama.

De las familias 4, *O,N*-Acetales acíclicos derivados del alcohol salicílico, y 5, *O,N*-Acetales acíclicos derivados del alcohol tiosalicílico, no destacaron especialmente los valores de ningún compuesto. Por el contrario, dentro de la familia 6, *O,N*-Acetales acíclicos derivados del alcohol antranílico, sí se observaron valores de CI_{50} menores, y de todos los compuestos seleccionamos el MDG-884D y el MDG-898D. El primero mostró un patrón selectivo frente a células tumorales, dando valores muy interesantes de IT *in vitro* (1,92 y 3,68 frente a células de estirpe mamaria e intestinal,

respectivamente) mientras que el segundo destacó por su importante acción selectiva sobre células MCF-7, frente a su menor actividad en los otros tipos celulares.

Parece ser que en las tres familias de compuestos cíclicos, la posición 9 del cloro sustituyente incrementa la actividad selectiva en cáncer de colon, siendo menos tóxico en células normales. La introducción de un grupo sulfona en lugar del oxígeno aumenta la selectividad sobre células tumorales mamarias, como fue el caso de MN-80C.

De la familia de fármacos acíclicos derivados del alcohol antranílico, MDG898D manifestó una extraordinaria selectividad frente a cáncer de mama, mostrando efectos citotóxicos mínimos sobre células epiteliales mamarias normales. Estos datos avalan, previo a un estudio en mayor profundidad, la importancia de estas novedosas estructuras sobre el tratamiento selectivo de cáncer de mama y colon.

Una vez comprobada la actividad antitumoral de estos compuestos, nuestro interés se centró en estudiar el mecanismo de acción de los más activos. Para ello llevamos a cabo en células de estirpe epitelial mamaria y de colon, cancerígenas y no cancerígenas, estudios de distribución del ciclo celular, estudios de apoptosis y también estudios del patrón de expresión génica.

INDUCCIÓN DE MODIFICACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR CON AGENTES FARMACOLÓGICOS ANTINEOPLÁSICOS

El conocimiento de los mecanismos que rigen y regulan el ciclo celular es de gran interés en la investigación y tratamiento del cáncer (Sympath y Plunkett, 2001; Gali-Muhtasib y Bakkar, 2002). Esto se debe a que estas células presentan una proliferación celular desregulada debido a alteraciones en los moduladores de la misma (Sandhu y Slingerland, 2000), con lo que se

están investigando extensamente fármacos que actúen a nivel de regulación del ciclo celular (Gali-Muhtasib y Bakkar, 2002).

Para estudiar los mecanismos de esta actividad antitumoral y antiproliferativa de los compuestos, se analizaron por citometría de flujo los efectos en la distribución del ciclo celular.

El análisis del ciclo celular en los compuestos seleccionados mostró que a la dosis de CI_{50} las células MCF-7, se detuvieron en las fases G_1 y G_2/M a expensas de la población de células de la fase S, sobre todo en el compuesto KS-47A. Por lo tanto, todos los compuestos analizados disminuyeron lentamente la progresión del ciclo celular, como demuestra la disminución en el porcentaje de células en la fase S y su incremento en el porcentaje de la fase G_0/G_1 . De este modo, se reduce el índice mitótico ($MI = S+G_2/M/G_1$) en las células MCF-7 al bloquearse las células en la fase G_1 (Ligueros *et al.*, 1997).

Un bloqueo celular en la fase G_1 del ciclo celular sirve para prevenir la replicación del ADN, dañado por acción de los distintos fármacos. El control principal de la fase G_1 lo efectúa la proteína p53 a través de la inducción de la proteína inhibidora de las CDKs p21. Ésta forma complejos con las ciclinas/CDKs de la fase G_1 , impidiendo la progresión del ciclo celular y dando así más tiempo para la reparación del ADN dañado (Lane, 1992). Sin embargo, cuando el control del ciclo por la proteína Rb está alterado, la proteína p53 desvía el ciclo celular hacia la apoptosis, disminuyendo la expresión de genes como Bcl-2 (Lane *et al.*, 1994; Rodríguez y Rodríguez, 2000).

Otros motivos para la detención del ciclo celular en la fase G_1 es la inactivación o descenso en los niveles de la ciclina D_1 en la fase G_1 temprana, que impide la fosforilación de pRb, permaneciendo esta proteína activa. De esta manera se impide el paso a la fase S por la no liberación del factor de transcripción E2F (Lundberg y Weinberg, 1999; Viillard *et al.*, 2001). El bloqueo también puede deberse a la inactivación o descenso en los niveles de

la ciclina E, responsable de mantener hiperfosforilada a pRb en la fase G₁ tardía, para que la liberación de E2F no se detenga (Lundberg y Weinberg, 1999; Viallard *et al.*, 2001).

Cuando estos mismos compuestos se probaron en la línea celular MCF-10A, se observó como los fármacos tuvieron efectos mucho más leves sobre la modulación del ciclo celular, lo cual nos insinuó cierto efecto selectivo sobre la línea tumoral de mama. Aún así, la familia 1 mostró cierta tendencia al acumulo en la fase G₀/G₁, mientras que la familia 3 lo hizo en la S.

Sobre la línea de adenocarcinoma de colon HT-29 se observó que los compuestos provocaban una disminución de la fase G₀/G₁ y su efecto era variable sobre las fases S y G₂/M del ciclo celular.

En la línea celular IEC-6 la mayoría de los compuestos provocó un aumento en el número de células dentro de la fase S, siendo la familia 3 la que produjo un mayor incremento en esta fase. Previamente ha sido demostrado que 5-FU a bajas dosis prolonga la fase S (Grem *et al.*, 1999), lo que se traduce en la incapacidad de las células para sintetizar ADN. Igual le sucede al resveratrol, que a bajas dosis acumula las células en la fase S del ciclo celular, asociándose este acúmulo con una marcada inhibición de los niveles de ciclina D y de CDK4, y también se asocia con la inducción de p53 y de p21 (Young-Ae *et al.*, 2004).

Después de analizar los efectos de los fármacos a nivel de ciclo celular en las cuatro líneas celulares, nuestro interés se centró en intentar explicar los mecanismos por los que dichos compuestos actuaban. Según Swanton (2004), el mecanismo de acción de los agentes antitumorales tiene un gran potencial manipulador del ciclo celular, al promover la detención del crecimiento, la diferenciación o incluso la apoptosis.

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS Y NECROSIS CON AGENTES FARMACOLÓGICOS ANTINEOPLÁSICOS

Dentro de las posibles terapias contra el cáncer, la apoptosis es uno de los fenómenos más estudiados, intentando identificar su papel en la citotoxicidad inducida por agentes quimioterápicos. Hemos estudiado si la muerte celular programada es también un mecanismo por el que los nuevos fármacos inducen citotoxicidad, dado que las células expuestas a agentes específicos entran en apoptosis desde una fase dada del ciclo celular (Yoshikawa *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 1997; Joe *et al.*, 2002).

En la línea celular MCF-7, carente de actividad caspasa, la demostración de apoptosis ha sido difícil (Saunders *et al.*, 1997; Chadderton *et al.*, 2000). El paclitaxel, las ciclofosfamidias y la citosina arabinósido, son los agentes citotóxicos más usados comúnmente para inducir apoptosis en estas células (Meyn *et al.*, 1995; Milas *et al.*, 1995). Además, hay que considerar que las células de cáncer de mama son poco susceptibles a inducción apoptótica por una amplia variedad de agentes citotóxicos (Rasbridge *et al.*, 1994).

Aún así, las células MCF-7 inducidas con los distintos compuestos que estudiamos parecen ser más susceptibles a la apoptosis que las células control. La apoptosis inducida por los fármacos en su dosis de CI_{50} , fue demostrada por citometría de flujo, microscopía confocal y por criterios morfológicos.

En esta línea celular tras 24 horas de tratamiento con los fármacos, se apreció un aumento de las tasas de apoptosis temprana y tardía. Estos datos son mayores incluso cuando las células estuvieron 48 horas en tratamiento, dejando menor porcentaje de células viables, lo que indica que el tiempo adecuado de actuación de estos fármacos se acerca más a las 48 que a las 24 horas.

En la MCF-10A los datos obtenidos parecen indicar que la apoptosis se induce muy rápidamente, ya que se observó como ésta era mayor a las 24 que a las 48 horas. Incluso se comprobó como tras 2 días de inducción la necrosis era muy alta, por lo que parece que la acción apoptótica de estos compuestos se produce antes de ese tiempo, aunque ésta no es tan acusada en esta línea celular.

En la línea celular HT-29 el grado de inducción de apoptosis fue mucho menor y se indujo de manera más tardía. De manera contraria a lo que cabía esperar, los compuestos en la línea celular IEC-6 si produjeron gran apoptosis y con efectos tempranos. Esto puede deberse a que ha sido demostrada la alta tasa de recambio que tiene lugar en el epitelio intestinal conforme las células van madurando (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006).

En conclusión, estos compuestos inducen específicamente apoptosis en células de estirpe mamaria. Aunque, al afectar también a las normales de mama, el IT *in vitro* es mucho peor que en las de estirpe intestinal en las que producían menor apoptosis pero al parecer de manera más selectiva.

Existen una serie de estudios contradictorios sobre la implicación o no de p53 y su papel o no en la apoptosis. Así, los efectos citotóxicos de 5-FU son atribuidos a la inducción de apoptosis, mediante una vía p53 dependiente (Johnson *et al.*, 1997). Sin embargo las células MCF-7, son relativamente resistentes a la apoptosis mediada por p53 (Saunders *et al.*, 1997), aunque la activación de p53 funcional a su vez puede regular y promover etapas discretas de la cascada de apoptosis, tales como la sobrerregulación de p21 (Ostrakhovitch y Cherian, 2005). La administración de 5-FU induce apoptosis en células de cáncer de mama y significativamente inhibe su actividad proliferativa, sin que se demuestre que p53 esté involucrado en los mecanismos que deciden o no la apoptosis (Asaga *et al.*, 2001).

Los mecanismos de inhibición del crecimiento fueron por apoptosis y no por otro mecanismo como sugiere Takahashi *et al.* (2001) en su estudio, tras

observar que la inducción de la apoptosis se llevó a cabo a una concentración mayor que la concentración que causó la detención del crecimiento en células de mieloma humanas.

Mediante microscopía confocal confirmamos la apoptosis inducida por estos compuestos. En ausencia de inducción por compuestos químicos en las células control, se observó la presencia de núcleos con distribución homogénea de la cromatina y algunas células necróticas. Sin embargo, tras la inducción a la dosis de CI_{50} con los distintos fármacos, sí se observaron núcleos apoptóticos con cromatina condensada y fragmentación nuclear, además de células necróticas tras 48 horas de inducción. La liberación de las caspasas va a dar lugar a la mayoría de los distintivos morfológicos de la muerte celular, como fragmentación nuclear, rotura del citoesqueleto celular y exposición de fosfatidilserina en la superficie extracelular de la membrana plasmática (Parone *et al.*, 2002). No obstante, en células carentes de caspasas, como las células MCF-7, tras un detallado análisis se observó la presencia de condensación de la cromatina y de fragmentación nuclear por microscopía de fluorescencia.

La identificación de apoptosis por microscopía óptica es algo subjetiva y tediosa si tenemos en cuenta que el proceso es muy rápido y que las células apoptóticas son rápidamente eliminadas. Los distintos compuestos, en su dosis CI_{50} , indujeron cambios en la morfología celular en las cuatro líneas celulares estudiadas. Muchas de las características que exhibieron los cuatro tipos celulares han sido descritas como indicativas de apoptosis (Saunders *et al.*, 1997; Staunton y Gaffney, 1998; Chadderton *et al.*, 2000). Las células apoptóticas redujeron su volumen y se separaron de las vecinas, afectando ocasionalmente a pequeños grupos de células.

Algunos agentes antineoplásicos pueden ejercer su efecto terapéutico a través de una mezcla de acciones citodestructivas e inductoras de diferenciación, provocando no sólo muerte celular sino que también activan el programa de diferenciación que va unido a una disminución de la capacidad de proliferativa en las células tratadas (Sartorelli., 1985, Chen *et al.*, 2002). Este hecho podría ser aplicado a las células de la línea celular HT-29, no obstante,

estudios más en profundidad servirán para intentar demostrar si se producen dichos fenómenos de diferenciación celular.

Las células de las cuatro líneas celulares estudiadas exhibieron prominentes vacuolas autocatalíticas perinucleares, abundante material filamentoso y microvilli irregular en la superficie celular, que podría ser consistente con la inducción de diferenciación (Chen *et al.*, 2002). Hubo pérdida de uniones celulares y de estructuras especializadas de membrana como los microvilli, con la formación de burbujas o protuberancias superficiales. También se observó condensación irregular de la cromatina bajo la membrana, y ya en la apoptosis tardía se observaron cuerpos apoptóticos. Todos estos eventos son descritos también por Staunton y Gaffney, (1998). Las organelas citoplasmáticas permanecieron bien preservadas, observándose condensación citoplasmática.

La membrana citoplasmática de las células apoptóticas al volverse asimétrica, expone fosfatidilserina y glicanos inmaduros, que pueden facilitar un reconocimiento fagocítico eficiente por macrófagos, células parenquimáticas vecinas o por células tumorales (Staunton y Gaffney, 1998). Esto supone un mecanismo de reconocimiento específico que otorga una ventaja al prevenir respuestas inflamatorias, sobre todo en condiciones fisiológicas (Kerr *et al.*, 1994). La exposición de la fosfatidilserina por parte de la membrana plasmática, se considera un evento temprano en la apoptosis y secundario a las alteraciones morfológicas, que va a preceder a la condensación nuclear, independientemente del agente inductor de la apoptosis (Cornelissen *et al.*, 2002).

Por último, para comprender los mecanismos génicos que subyacen en las modificaciones que provocaban los diferentes fármacos, hemos llevado a cabo el estudio de las modificaciones en los patrones de expresión génica inducidas por los mismos.

MODIFICACIONES EN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA TRAS LA INDUCCIÓN CON LOS COMPUESTOS ANTITUMORALES

Hasta hace pocos años uno de los principales inconvenientes que se encontraban los investigadores en la lucha contra el cáncer era el alto número de genes que podían subyacer en los mecanismos de transformación maligna. Hoy en día, la técnica de microarrays permite el estudio simultáneo de un número abundante de genes, con las consiguientes ventajas.

Además, esta técnica permite el estudio de marcadores que puedan predecir la respuesta a un tratamiento determinado. Esta respuesta viene mediada por la expresión de un alto número de genes que, sin embargo, pueden ser estudiados mediante los microarrays de ADN. Existen varios ejemplos, como los estudios, antes mencionados, en linfoma de Rosenwald *et al.* (2002) o de Sorlie *et al.* (2001) y van't Veer *et al.* (2002) en cáncer de mama.

Nuestro interés se centró en intentar explicar, mediante los cambios en el patrón de expresión génica, los posibles mecanismos a nivel génico sobre los que actuaban los diferentes fármacos.

El primer dato que nos arrojó este estudio fue que los fármacos producían la expresión diferencial de determinados genes en todas las líneas celulares estudiadas, pero que estos eran significativamente distintos cuando se trataban de diferentes líneas celulares. Ésto quería decir que los compuestos poseían un efecto pleitrópico, y que dependiendo de la línea celular que se tratara, actuaban por uno u otro mecanismo.

En la línea celular MCF-7 fue sobre la que mayor modificación en el patrón de expresión provocaron, mientras que, curiosamente, las células normales de mama MCF-10A fueron en las que menos genes vieron modificada su expresión génica. Sobre las dos líneas de células intestinales provocaron cambios en un número más o menos similar de genes.

Todos los fármacos mostraron capacidad de modulación del ciclo celular, aumentando las células en fase G_0/G_1 y G_2/M , disminuyendo las del ciclo S.

Un estudio más pormenorizado en esta línea celular de cáncer de mama demostró modificaciones en genes relacionados con el control de las distintas fases del ciclo celular, así los compuestos KS-47A, KS-47B y MDG-828B aumentaron la expresión de los genes de la ciclina B3 y CDC2. Esta última se une a la ciclina B, y el complejo ciclina B/CDC2 es requerido para la apoptosis (Castedo *et al.*, 2002). Todo esto podría explicar uno de los mecanismos de actuación de estos compuestos.

Este fenómeno también explicaría por qué la expresión de genes que codifican para CDK2 y CDK4 se encontraba reprimida por todos los compuestos. La primera se asocia a la ciclina A y tiene un papel muy importante en la elongación del ADN, siendo necesaria para la progresión celular durante G_1 . También se ha visto que tiene un rol en el bloqueo de la apoptosis (Golsteyn, 2005), con lo que su represión favorecería la aparición de estos fenómenos.

Por su parte, las CDK4 forman complejos con las ciclinas de la familia D, y tienen su actividad máxima en la transición de G_1/S (Viallard *et al.*, 2001). Una de las funciones de los complejos ciclina D/CDK4 es fosforilar la proteína del retinoblastoma (Rb), activando la expresión de genes necesarios para la entrada en la fase S, de manera que su represión provoca la disminución de células dentro de esta fase. Estos datos apuntan a que uno de los posibles mecanismos de acción de estos compuestos sea actuando como inhibidores de CDKs.

Sobre la línea celular MCF-7, todos los compuestos manifestaron una gran capacidad de inducción de apoptosis, incluso en las primeras 24 h. Este alto índice apoptótico se produce al desequilibrarse la relación entre los genes pro y anti-apoptóticos (Cory y Adams, 2002). Así, encontramos como todos los fármacos provocan el aumento de ciertos genes inductores de apoptosis.

Cabe destacar ciertos genes que se encontraban inducidos en todas las líneas celulares, como el *BBC3*. El producto de este gen pertenece a la familia de las proteínas “BH3-only”, llamadas así por estar formadas sólo por este dominio tan importante en inducción de apoptosis. Recientemente estas proteínas han recibido mucha atención, ya que son mediadores clave en la apoptosis mediada por diversos estímulos entre los que se encuentra el 5-FU, actinomicina D, velcade y otros factores como hipoxia y radiación (Villunger *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2001). Así, se ha comprobado como este gen se induce por daño en el ADN o tratamientos con glucocorticoides, en este último caso mediado por p73 (Melino *et al.*, 2004). Nos encontramos, pues, ante un mediador esencial de apoptosis, tanto la dependiente como la no dependiente de p53 (Luo *et al.*, 2005). De este modo, se ha demostrado este gen que está implicado en la inducción de apoptosis en células MCF-7 a través de la vía mitocondrial inducida por estradiol (Lewis *et al.*, 2005)

Se ha comprobado como *BBC3* se encuentra detrás de la apoptosis inducida por doxorubicina en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado. También se ha demostrado que en dicho tratamiento este gen apenas se expresa en células no tumorales, lo cual se corrobora en nuestro caso, ya que no se expresa diferencialmente en la línea epitelial mamaria normal MCF-10A (Middelburg *et al.*, 2005).

Aún así parece ser que los compuestos no actuaron solo a este nivel, sino que también indujeron la expresión de otros genes proapoptóticos. Como es el caso del gen *PDCD7*, altamente inducido por el compuesto KS-47B. Tras tratamiento con estaurosporina y dexametasona, este gen está sobreexpresado e induce apoptosis mediado por la inhibición de proteínas quinasas (Park *et al.*, 1999).

KS-47B también indujo la expresión del gen *BMF* hasta 7,74 veces. Este gen proapoptótico codifica para una proteína perteneciente a la familia de las proteínas “BH3-only”, que normalmente se encuentra secuestrada por la miosina V, pero se induce por ciertas señales de daño como la pérdida de

unión celular (anoikis) o por TGF β (Puthalakath *et al.*, 2002; Ramjaun *et al.*, 2006). Los compuestos MDG-884D y MDG-898D no provocaron este cambio, sin embargo, tienen un mayor y más temprano efecto inductor de apoptosis.

En la línea celular MCF-10A pudimos observar como el número de DEG fue mucho menor en comparación a la línea MCF-7. Esto explicaría el efecto que demuestran los diferentes compuestos analizados sobre el ciclo celular e inducción de apoptosis en estas células.

En este caso también encontramos inducida la expresión del gen codificante para CDC2, lo que explicaría, como en el caso anterior, que CDC2 se une a la ciclina B, y el complejo ciclina B/CDC2 es específicamente requerido para la apoptosis.

En estas células todos los compuestos indujeron apoptosis, pero a valores mucho más moderados que en el caso anterior. Esto fue debido a que los genes pro-apoptóticos se encontraban normalmente inducidos, pero en todos los casos nunca 2 veces por debajo respecto al control.

Incluso encontramos la inducción de ciertos genes anti-apoptóticos como el *TNFAIP3*, cuyo producto interactúa con NAF1 e inhibe la inducción de apoptosis mediada por TNF α (He y Ting, 2002). Quizás este gen bloquee la apoptosis dependiente de esta ruta y los fenómenos de apoptosis que encontramos se deban a las otras rutas inductoras. Esto, además de la baja inducción de genes pro-apoptóticos, explicaría la existencia de cierta apoptosis pero a valores no tan elevados como en las MCF-7.

En las células HT-29 los efectos de los diferentes compuestos sobre la modulación del ciclo celular fueron muy variables. Un rasgo común a todos los compuestos fue que, al contrario de lo que pasaba en las células MCF-7 y MCF-10A, estas células no tuvieron detención dentro de la fase G₀/G₁. Esto se

explica fácilmente al ver como, al contrario de cómo pasaba anteriormente, en esta ocasión los fármacos no mostraron efectos sobre los niveles de expresión de los genes codificadores de CDK2 y CDK4.

El compuesto KS-47A indujo acúmulo del porcentaje de células en la fase G₂ del ciclo celular. El estudio de las modificaciones en el patrón de expresión génica inducido por este fármaco nos mostró como el gen *RPRM* se encontraba inducido. Éste interviene en el punto de control G₂/M, y ante el daño en el ADN inducido por rayos X, provoca la detención del ciclo celular en la fase G₂ por un mecanismo dependiente de p53 (Ohki *et al.*, 2000). Además la proteína que codifica inhibe la actividad de CDC2 y la traslocación nuclear de la ciclina B1.

Donde sí se observó un gran efecto de los compuestos fue en la inducción de apoptosis en células HT-29. El principal promotor de este fenómeno fue el gen *TP53INP*, que se activa en respuesta a la rotura de la doble hélice de ADN (Tomasini *et al.*, 2003). Aunque el mecanismo de apoptosis inducida por p53 no se conoce completamente, parece ser que es esencial su fosforilación en la Ser-46, promovido por este gen al activar una serie de serina quinasas específicas (Oda *et al.*, 2000). En ausencia de esta proteína no se desencadena este proceso y no se produce la activación del mediador de p53, p53AIP1 (Okamura *et al.*, 2001).

También se provocó el aumento en la expresión de otro gen pro-apoptótico que normalmente se induce por stress celular mediado por p53, *UNC5B*. De hecho, la represión de este gen inhibe la inducción de apoptosis por adriamicina, compuesto que provoca muerte celular mediante la vía de p53 (Tanikawa *et al.*, 2003). Este gen codifica para una proteína que posee un dominio de muerte citoplasmático y parece ser una de las principales vías de inducción de apoptosis mediadas por p53 (Thiebault *et al.*, 2003).

El efecto de los compuestos estudiados sobre la distribución de las células IEC-6 a lo largo del ciclo celular fue variable. Esto se debe a que en esta línea celular no existen genes reguladores del ciclo que se encuentren diferencialmente inducidos por todos los compuestos, sino una serie de DEG implicados en estos procesos que se estimulan o reprimen por el tratamiento con un compuesto dado, pero no por los demás.

Un ejemplo de DEG por un compuesto en particular y que interviene en la regulación del ciclo celular lo encontramos en *CDC7*, inducido por el compuesto KS-47A. Éste, al contrario a los otros fármacos estudiados, provocó la detención en la fase G_0/G_1 , debido a la represión de la expresión de dicho gen. Este gen se encarga de promover el paso de la fase G_1 a la fase S (Kumagai *et al.*, 1999), por lo que, al encontrarse reprimido, no se inicia la fase S y se produce el acúmulo en la G_1 .

Otro ejemplo de genes implicados en el ciclo celular, y diferencialmente expresados por algunos de los fármacos, es *CCNB1*, que codifica para la ciclina B1. Este gen, que se encuentra reprimido por los compuestos KS-47B y MDG-828B, es esencial para la progresión del ciclo celular a lo largo del punto de control G_2/M (Bassermann *et al.*, 2005), y su represión explicaría la alteración causada por estos compuestos en este punto del ciclo celular.

En esta línea celular todos los fármacos generaron altas tasas de inducción de apoptosis, hecho que coincidió con una gran expresión del gen *TNFRSF1B*. Éste codifica para un miembro de la superfamilia de los receptores de TNF, el TNFR2, que está implicado en la inducción de apoptosis. Además, este gen está implicado en la apoptosis inducida por interleuquina-3 (IL-3) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor, GM-CSF). Se sabe que alterando el cociente entre TNFR1 y TNFR2 a favor de este segundo se potencia la apoptosis selectiva, con las aplicaciones que esto tendría en la lucha contra el cáncer (Rae y MacEwan, 2004). Aunque también se ha demostrado que el TNFR1 es un inductor de apoptosis mucho más potente que el TNFR2 (Berger

et al., 2000), lo cual explicaría que los valores de apoptosis, inducidos por los diferentes fármacos en la línea celular HT-29, no fueran excesivamente altos.

También resultó interesante el caso del gen *PPP1R13B*, que se encontraba reprimido por todos los compuestos en las células IEC-6. Este gen es un potente regulador de p53 (Samuels-Lev *et al.*, 2001), y su expresión se encuentra reprimida en muchos tumores de mama que expresan proteína p53 salvaje, en lo que parece ser una ventaja selectiva de las células tumorales (Liu *et al.*, 2005). En resumen, todo parece indicar que en esta línea celular la apoptosis se induce vía TNF y no actuando sobre reguladores directos de p53.

Todos estos datos sugieren, como ya comentamos anteriormente, que los fármacos estudiados poseen efectos pleiotrópicos, de tal manera que, dependiendo del tipo celular sobre el que actúen, tienen efectos diferentes. Así, parece que en la línea tumoral HT-29 inducen apoptosis mediante mecanismos que actúan directamente sobre p53, mientras que en las células IEC-6 dicho fenómeno se induce vía TNF, aunque, quizás al ser menos directa, esta vía se mostró menos efectiva que la anterior. Sin embargo, en la línea celular MCF-7 la vía de inducción de apoptosis fue diferente a las anteriores y vino mediada por *BBC3*, que promueve apoptosis por mecanismos dependientes e independientes a p53.

En términos generales, los resultados anteriormente mostrados parecen indicar que los diferentes fármacos actúan mediante diferentes mecanismos. A nivel de ciclo celular se comportan como inhibidores de diferentes CDKs, y como potentes promotores de muerte celular programada, tanto por la vía dependiente como la independiente de p53, en lo que a apoptosis se refiere.

Así pues, estos fármacos presentan importantes ventajas a nivel experimental sobre los quimioterápicos clásicos utilizados en la clínica diaria. El hecho de ser específicos sobre determinadas dianas moleculares, ser más biodisponibles para las células tumorales y menos tóxicos sobre las no tumorales, sugieren su gran potencial terapéutico en pacientes afectados de cáncer de mama y colon.

Estos datos nos alientan para promover estudios *in vivo* del efecto terapéutico de estos compuestos frente a una enfermedad que provoca unos altos índices de morbilidad y millones de muertes en todo el mundo.

CONCLUSIONES

1. Los fármacos *O,O*-acetales y *O,N*-acetales cíclicos derivados de las estructuras 1,4-benzodioxepínica (familia 1), 4,1-benzoxatiepínica (familia 2), y 1,4-benzoxazepínica (familia 3), así como los *O,N*-Acetales acíclicos derivados del alcohol salicílico (familia 4), del alcohol tiosalicílico (familia 5), del alcohol antranílico (familia 6) o los que poseen el grupo amida (familia 7) presentan una actividad antitumoral frente a células de cáncer de mama en el rango micromolar. Dichos compuestos, que incluyen bases pirimidínicas y púricas naturales en su estructura, son totalmente novedosos, presentan una alta lipofilia y por tanto la biodisponibilidad de las células tumorales es mayor.

2. Los compuestos seleccionados de las distintas familias presentan un alto índice terapéutico experimental, con actividad citotóxica selectiva de cáncer de mama o colon dependiendo del tipo de sustituyente empleado y de la posición del mismo. Estos IT *in vitro* de los fármacos avalan su extraordinaria selectividad sobre células tumorales y la baja toxicidad sobre células normales.

3. Tanto en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, como en la de adenocarcinoma de colon HT-29, la mayoría de los fármacos ralentizan la su progresión a través del ciclo celular, acumulando las células en las fases G_0/G_1 y G_2/M a consta de unas disminución de las que se encuentran en la fase S del ciclo celular.

4. El tratamiento de las células epiteliales mamarias normales MCF-10A, mostró como los fármacos seleccionados tuvieron efectos mucho más leves sobre la modulación del ciclo celular, lo cual sugiere cierto efecto selectivo sobre la línea tumoral de mama. Aún así, hay que destacar que la familia 1 mostró una tendencia al acumulo de las células en la fase G_0/G_1 , mientras que la familia 3 lo hizo en la fase S.

5. En la línea celular de epitelio intestinal de rata IEC-6, la mayoría de los compuestos provocó un aumento del porcentaje de células que se encontraban dentro de la fase S, siendo la familia 3 la que produjo un mayor incremento en esta fase.

6. Los estudios mediante citometría de flujo y microscopía confocal, demostraron como todos los fármacos seleccionados de las diferentes familias inducen apoptosis temprana y tardía en mayor o menor proporción, en las líneas tumorales y no tumorales. Esto demuestra la especificidad en el mecanismo de acción de estos compuestos sobre dicho fenómeno.

7. El estudio de expresión génica mediante microarrays mostró que los isómeros KS-47A y KS-47B de la familia 1, MDG-828B de la familia 3 y MDG-884D y MDG-898D de la familia 6 inducían la expresión diferencial de determinados genes en todas las líneas celulares estudiadas. Los diferentes fármacos poseían un efecto pleitrópico que dependió de la línea celular sobre la que actuaban.

8. La detención de las células tumoral MCF-7, inducida por todos los compuestos seleccionados a nivel de la fase G_0/G_1 del ciclo celular, vino mediada por la represión de la expresión de los genes que codificaban para la CDK2 y CDK4.

9. Aunque en la promoción de apoptosis en la línea celular MCF-7 se debió a la inducción de la expresión de diversos genes pro-apoptóticos, fue el gen *BBC3*, que produce apoptosis dependiente e independiente de p53, el principal artífice de la activación de este proceso.

10. En la línea celular normal MCF-10A, donde la modulación del ciclo celular y la inducción de apoptosis fue mucho más moderada, tuvo su reflejo en una menor cantidad de genes diferencialmente expresados (DEG).

11. La detención en la fase G_2/M del ciclo celular sobre la línea celular tumoral de colon HT-29 estuvo mediado por el gen *RPRM*. La alta tasa de apoptosis mostrada tras el tratamiento, parece ser debida a la inducción de la expresión de los genes *TP53INP* y *UNC5B*, actuando todos por un mecanismo dependiente de p53

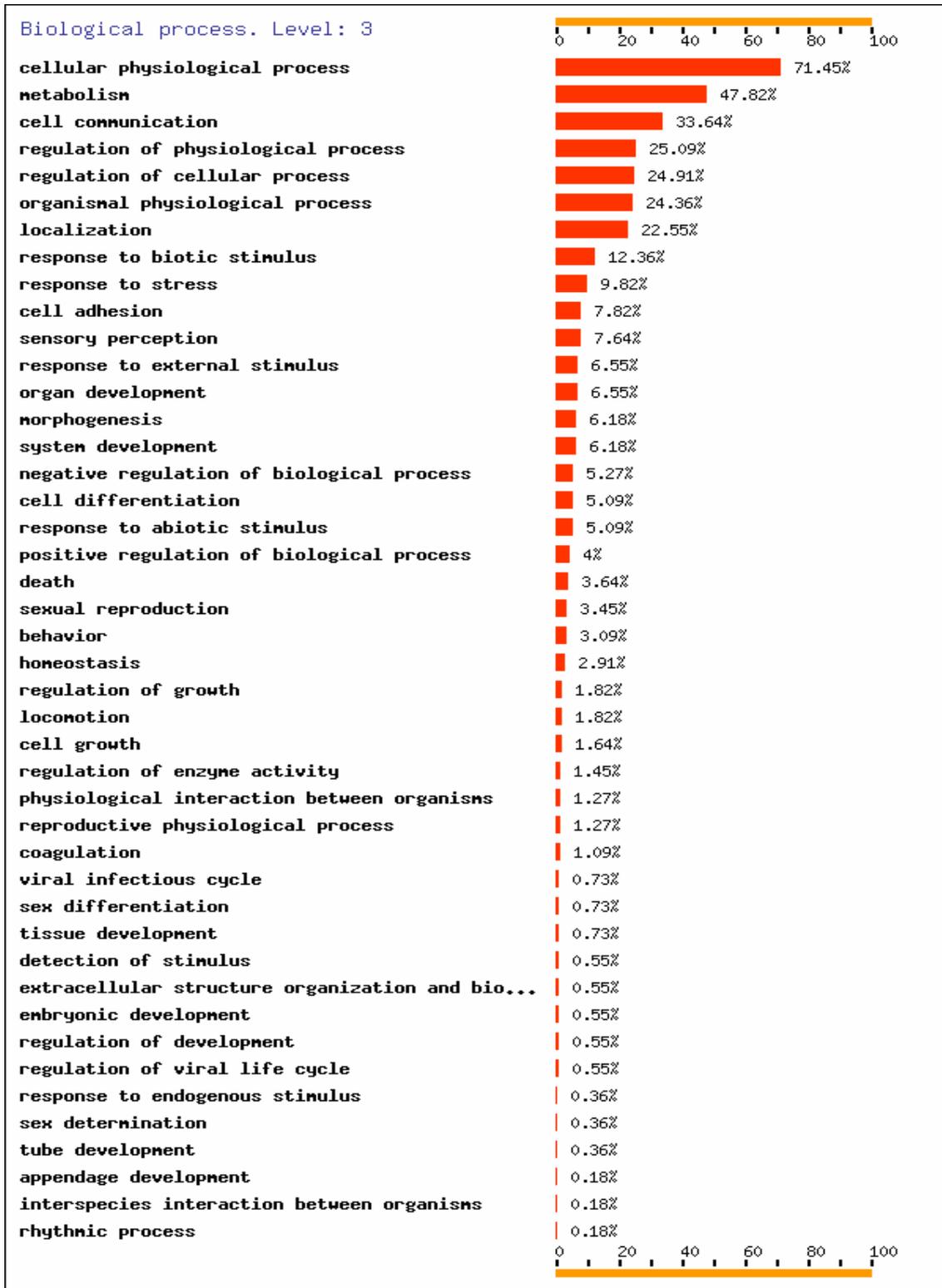
12. Sobre las células no tumorales IEC-6, los diferentes compuestos estudiados no provocaron cambios significativos en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular. Por otro lado la vía TNF, activada por un aumento en la expresión de los genes *TNFRSF1B* y *PPP1R13B*, parece ser la principal causante de los fenómenos de apoptosis observados en esta línea celular.

13. Los resultados experimentales obtenidos sobre las líneas celulares tumorales y no tumorales de mama y colon sugieren que los compuestos seleccionados poseen una actividad antitumoral específica y selectiva, convirtiéndose en excelentes candidatos para una futura aplicación en el tratamiento en el tratamiento de esta patología de gran prevalencia en la población mundial.

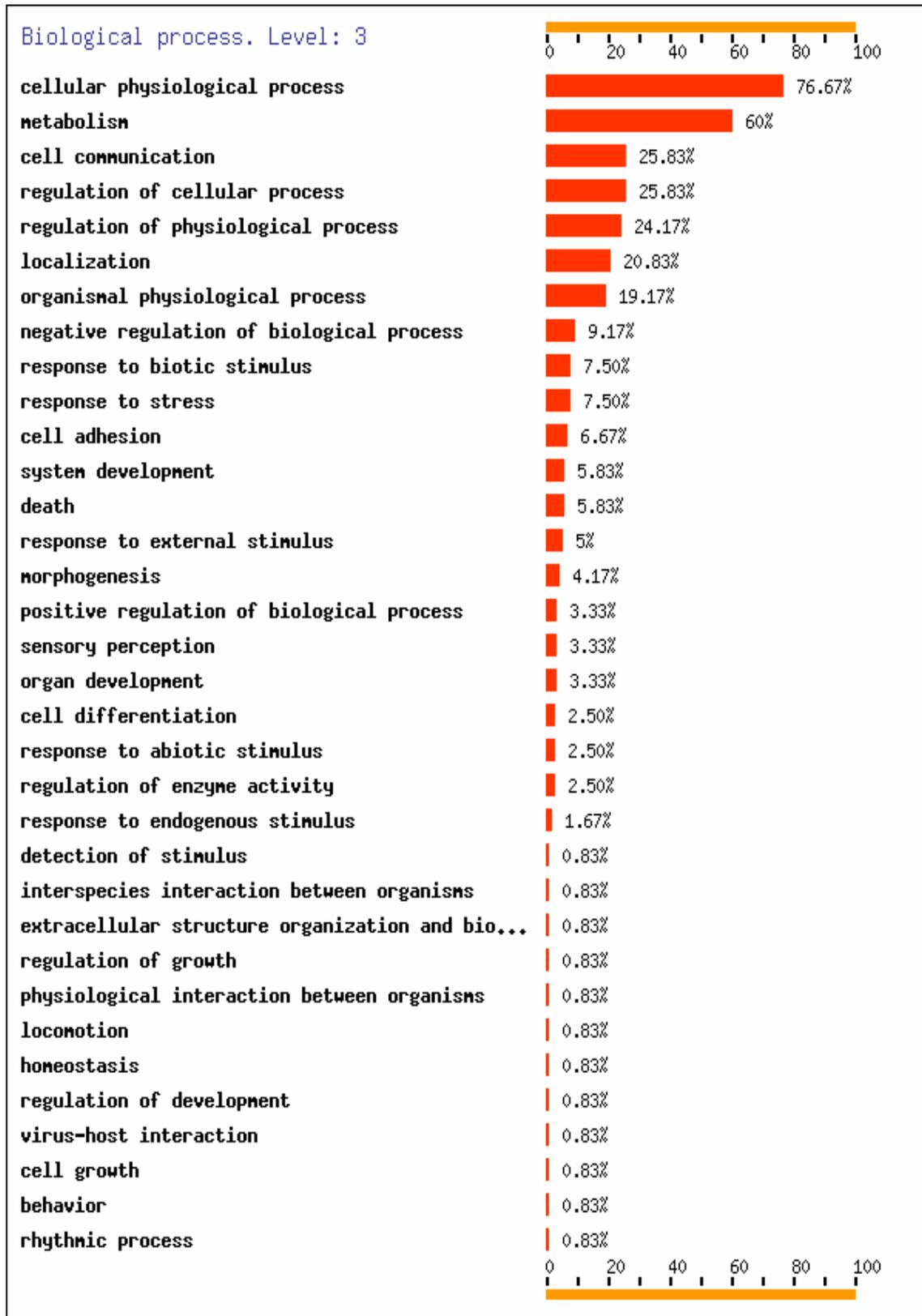
ANEXO

1. LÍNEA CELULAR MCF-7:

1.1. FARMACO KS-47A (gráficas 1 y 2).

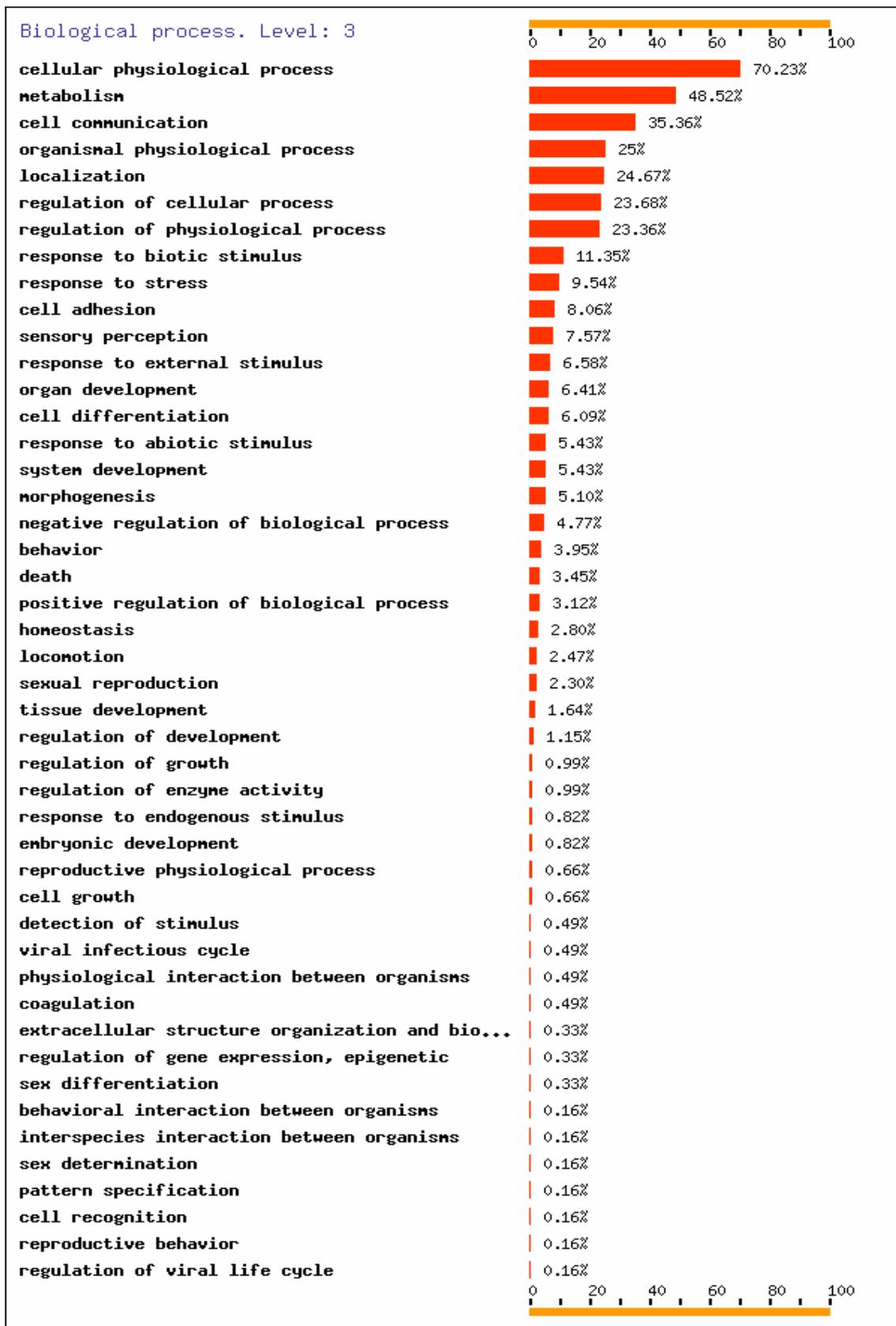


GRÁFICA 1. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO KS-47A EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

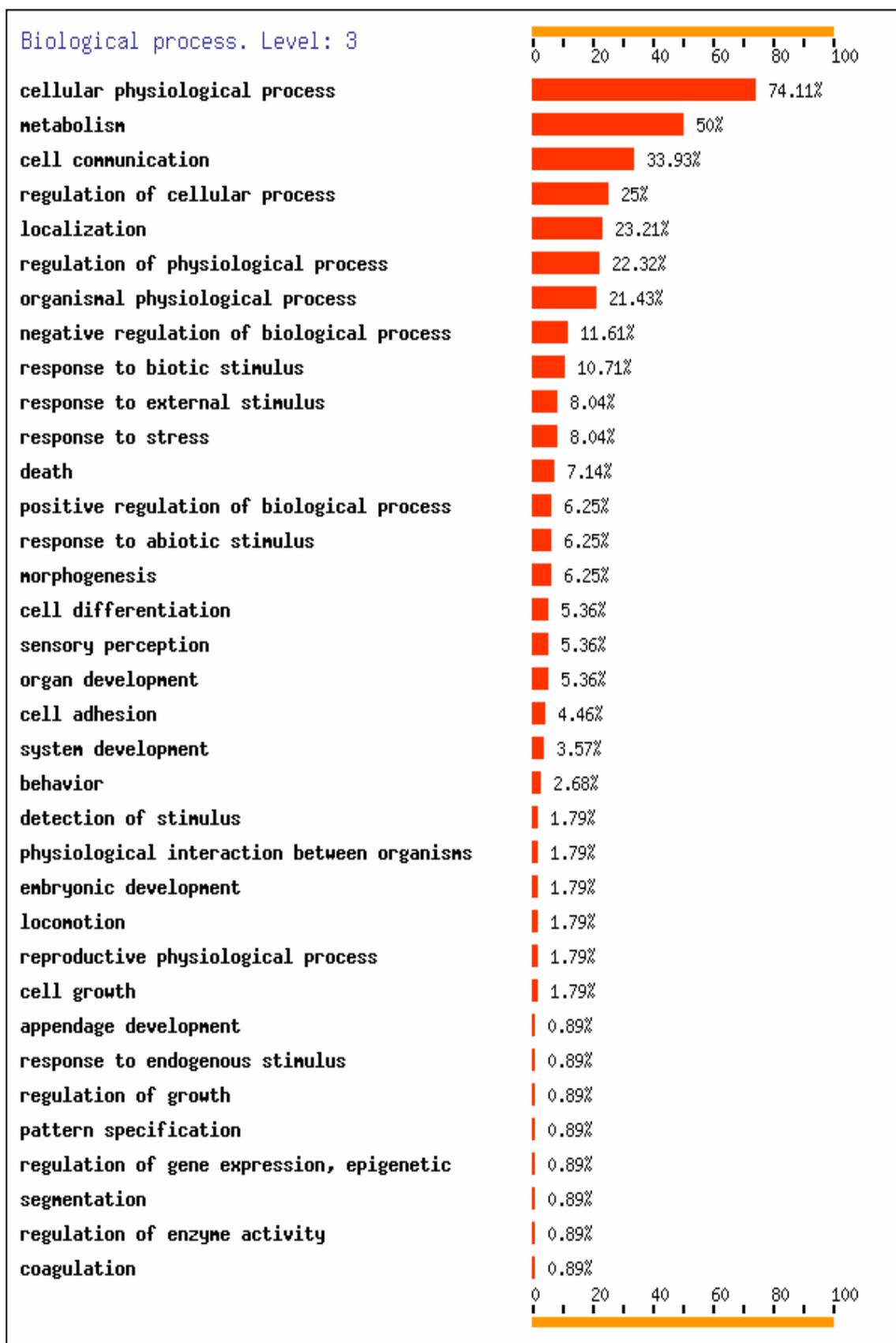


GRÁFICA 2. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO KS-47A EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

1.2. FÁRMACO KS-47B (gráficas 3 y 4).

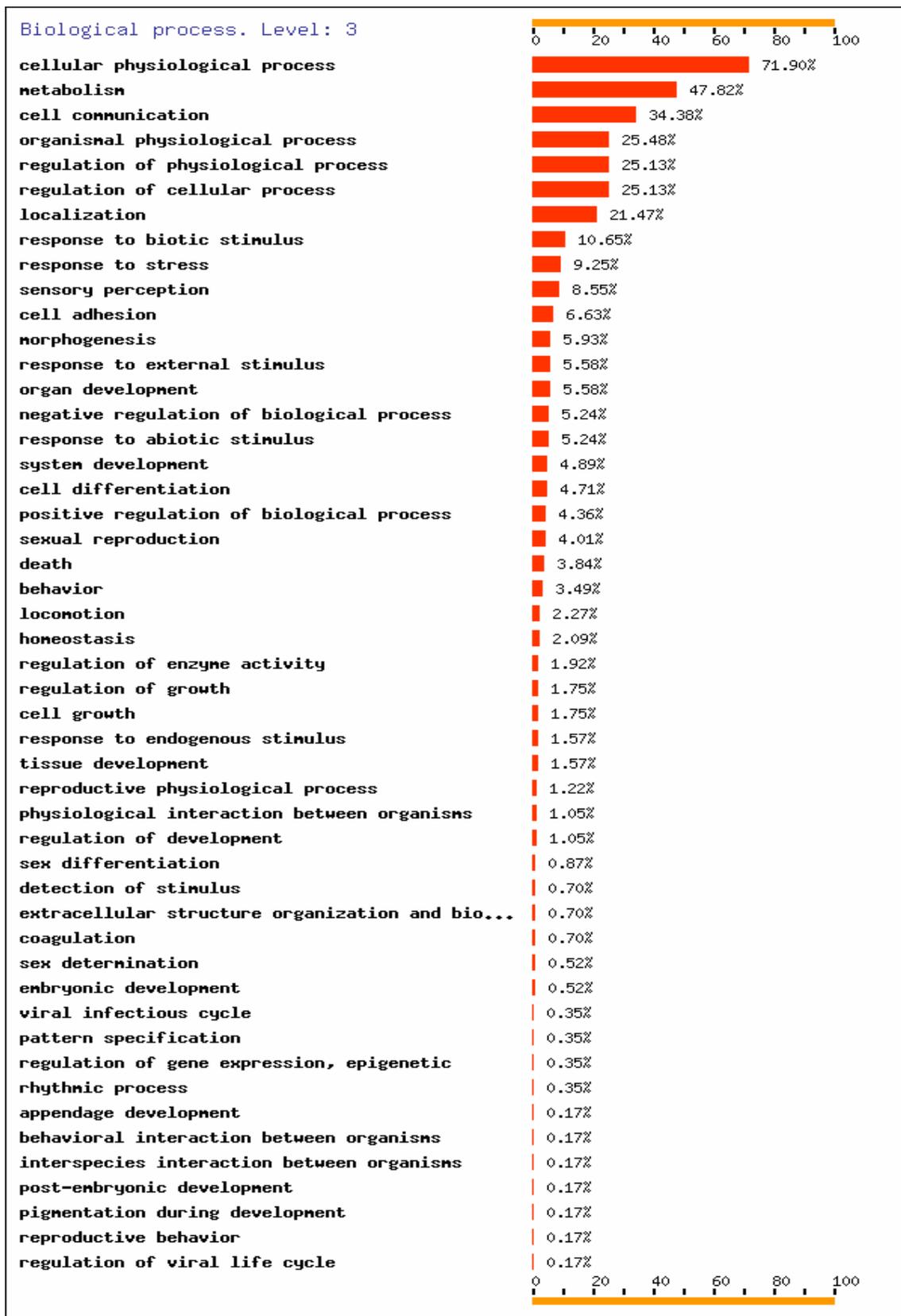


GRÁFICA 3. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO KS-47B EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

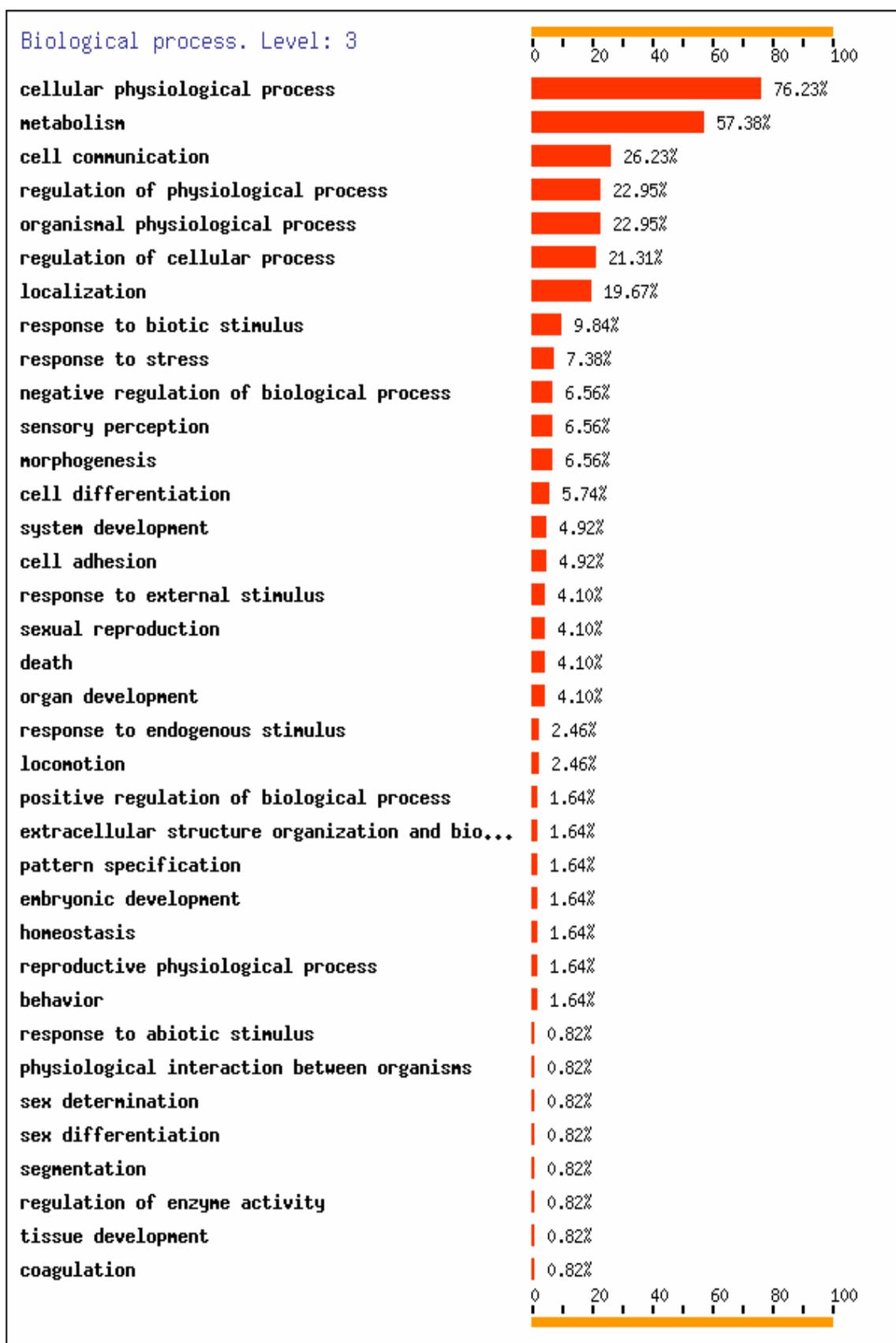


GRÁFICA 4. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO KS-47B EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

1.3. FÁRMACO MDG-828B (gráficas 5 y 6).

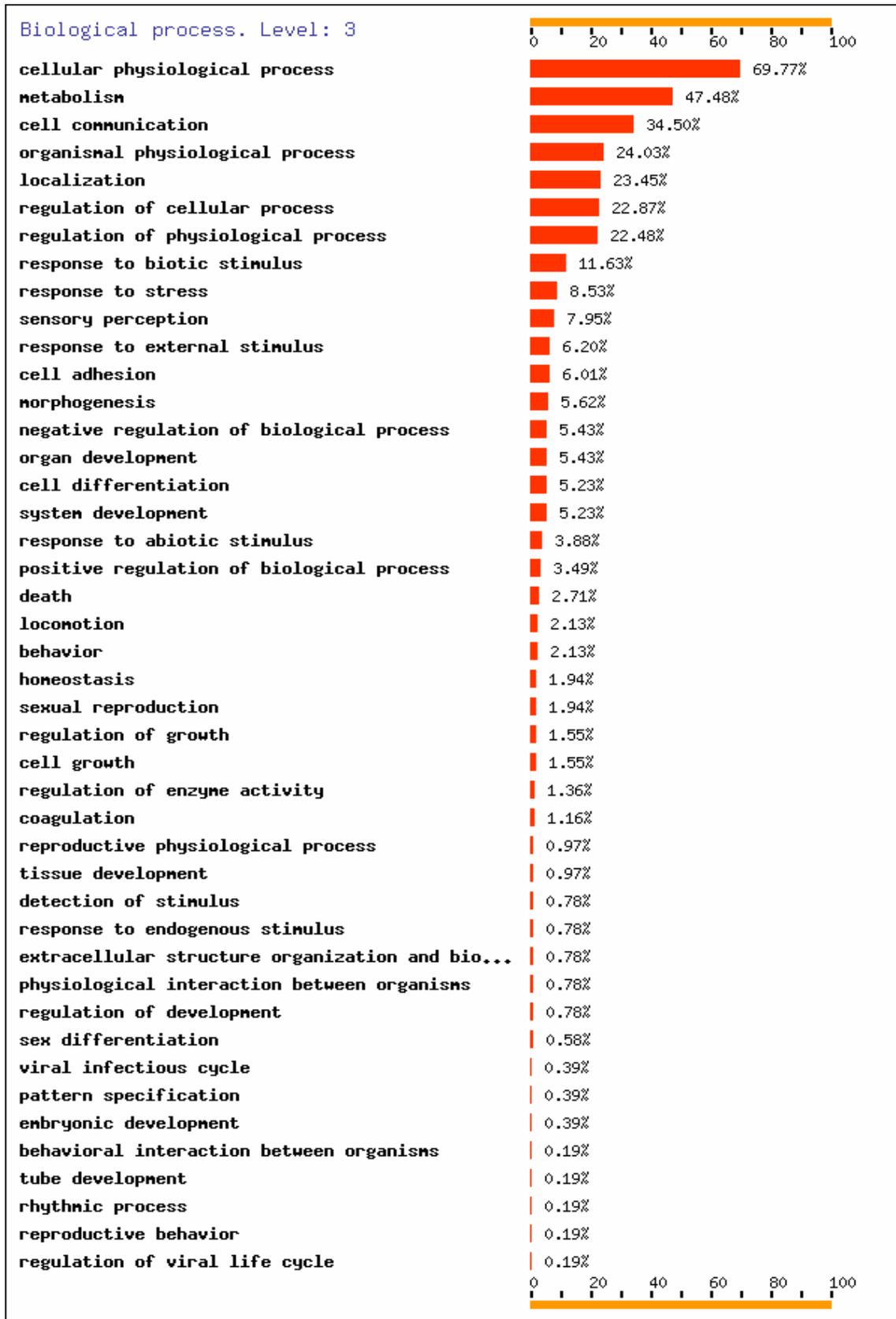


GRÁFICA 5. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-828B EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

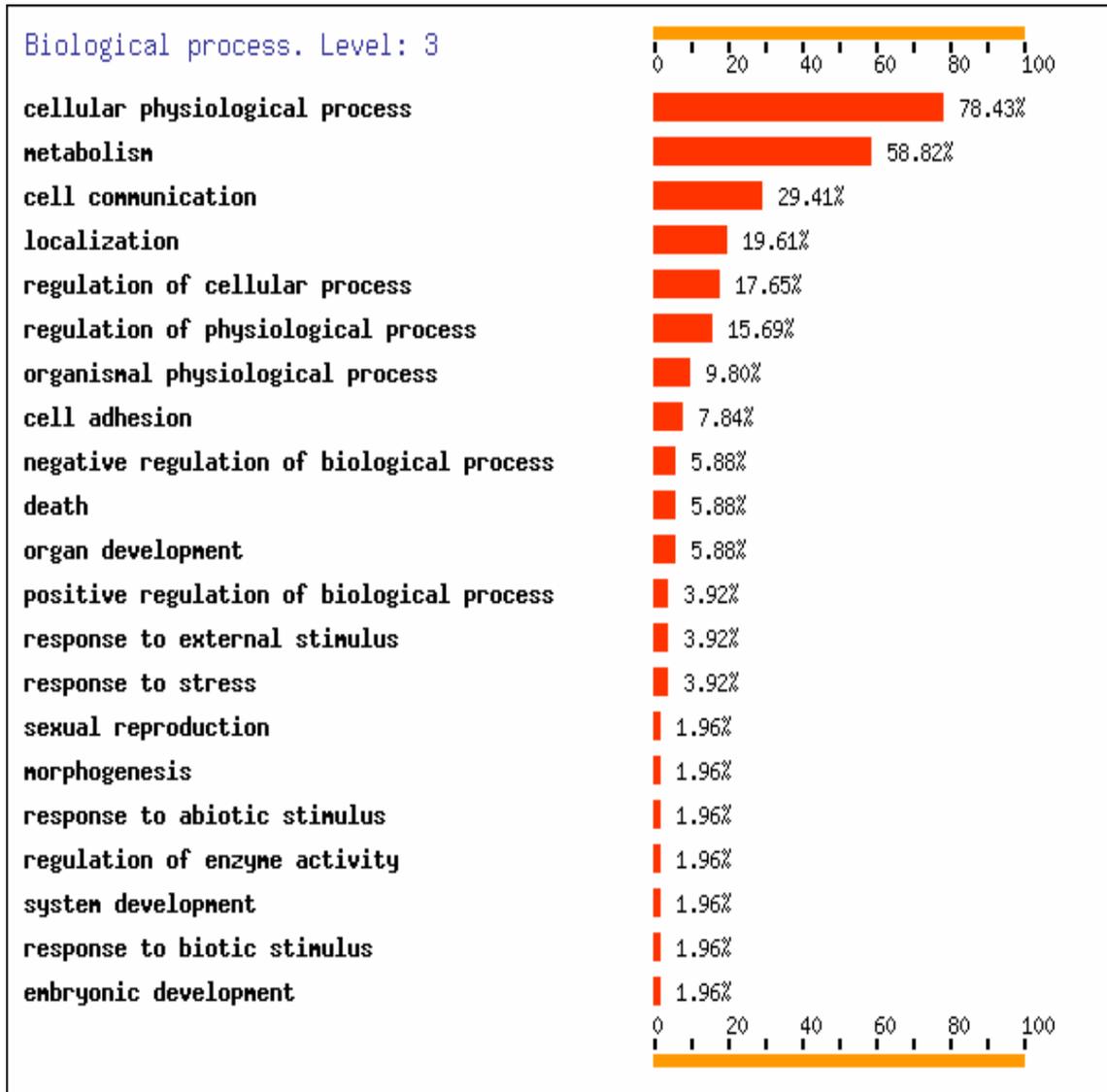


GRÁFICA 6. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-828B EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

1.4. FÁRMACO MDG-884D (gráficas 7 y 8).

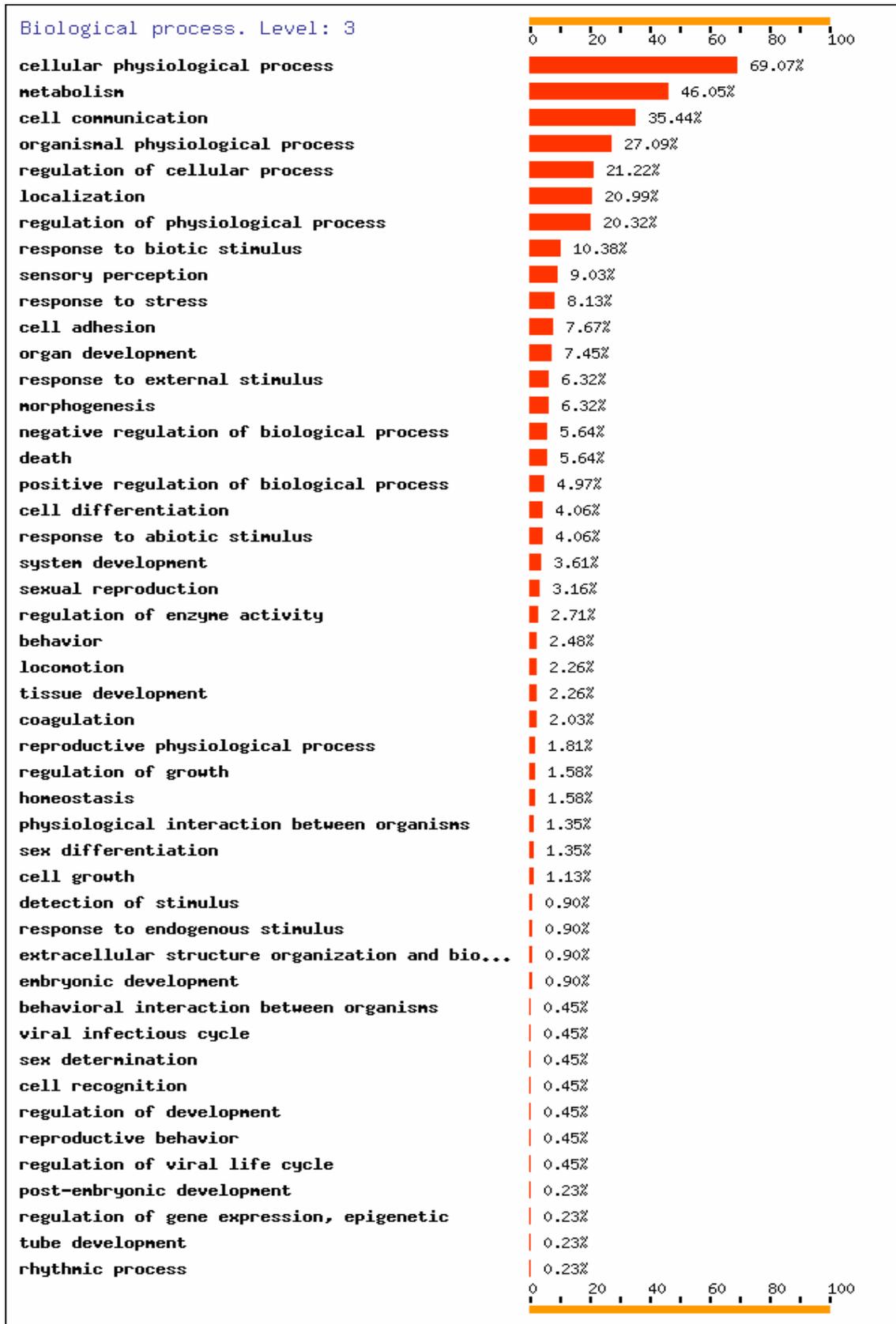


GRÁFICA 7. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-884D EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

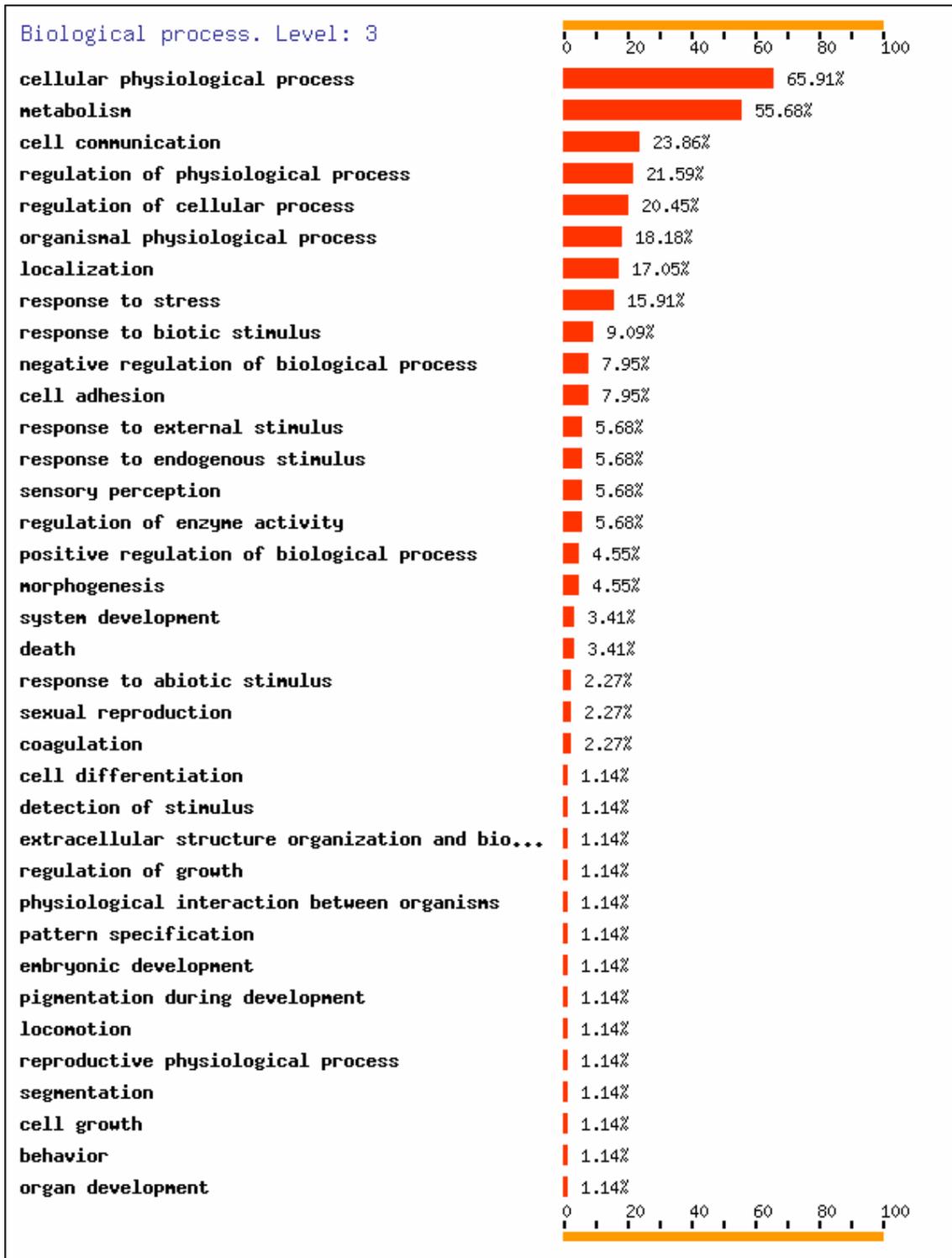


GRÁFICA 8. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-884D EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

1.5. FÁRMACO MDG-898D (gráficas 9 y 10).



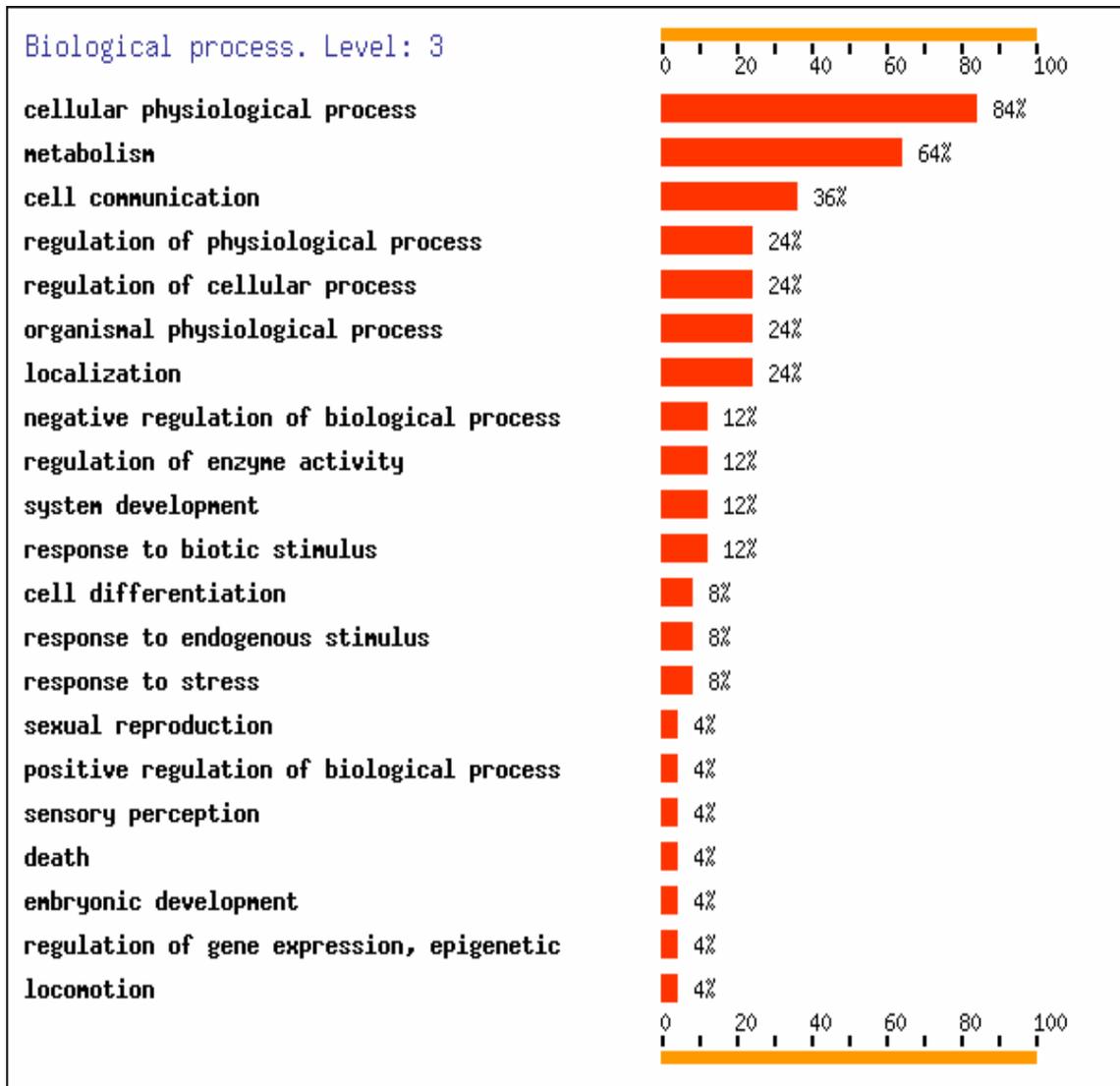
GRÁFICA 9. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-898D EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.



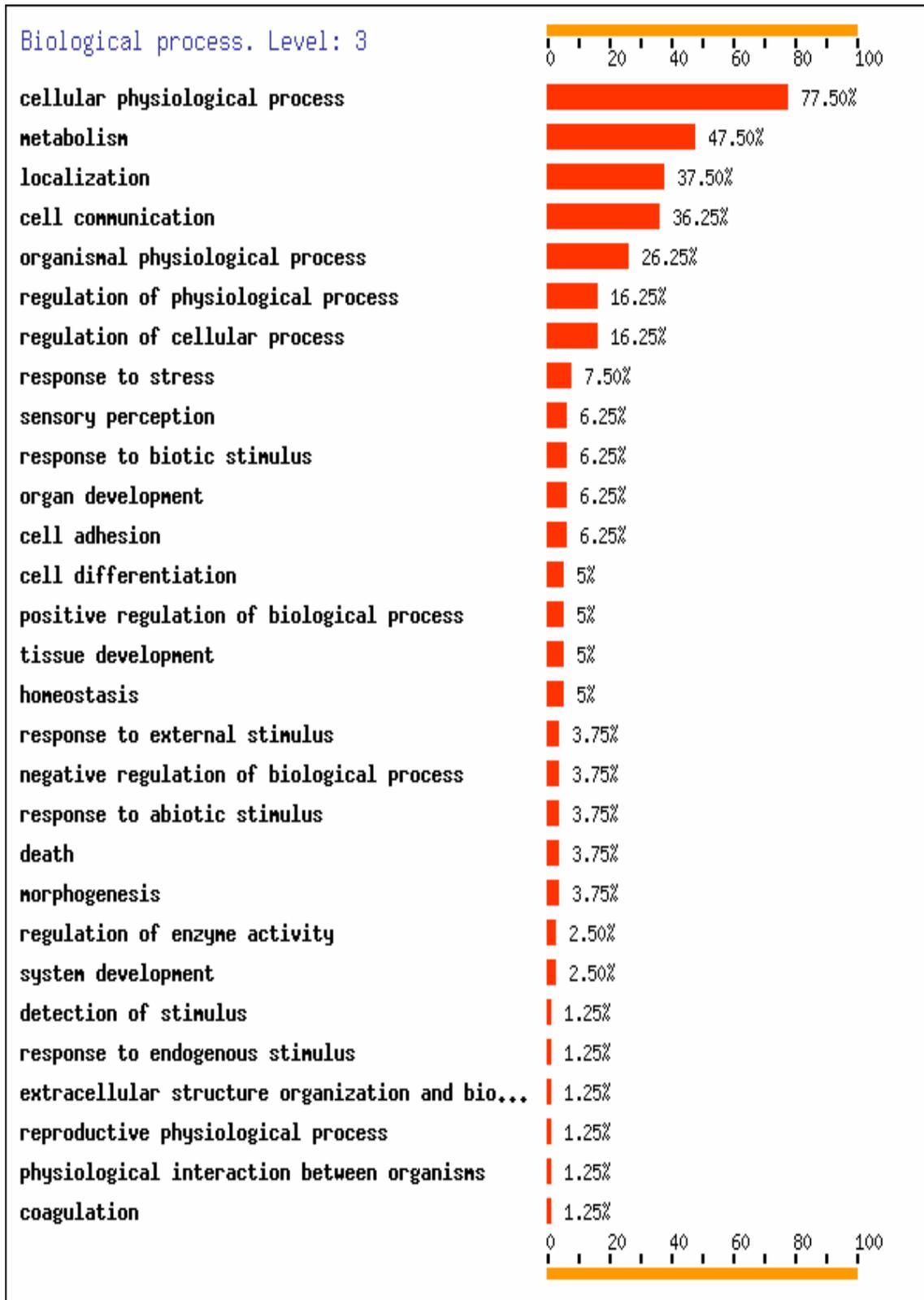
GRÁFICA 10. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-898D EN LA LÍNEA CELULAR MCF-7 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

2. LÍNEA CELULAR MCF-10A

2.1. FÁRMACO KS-47A (gráficas 11 y 12).



GRÁFICA 11. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO KS-47A EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

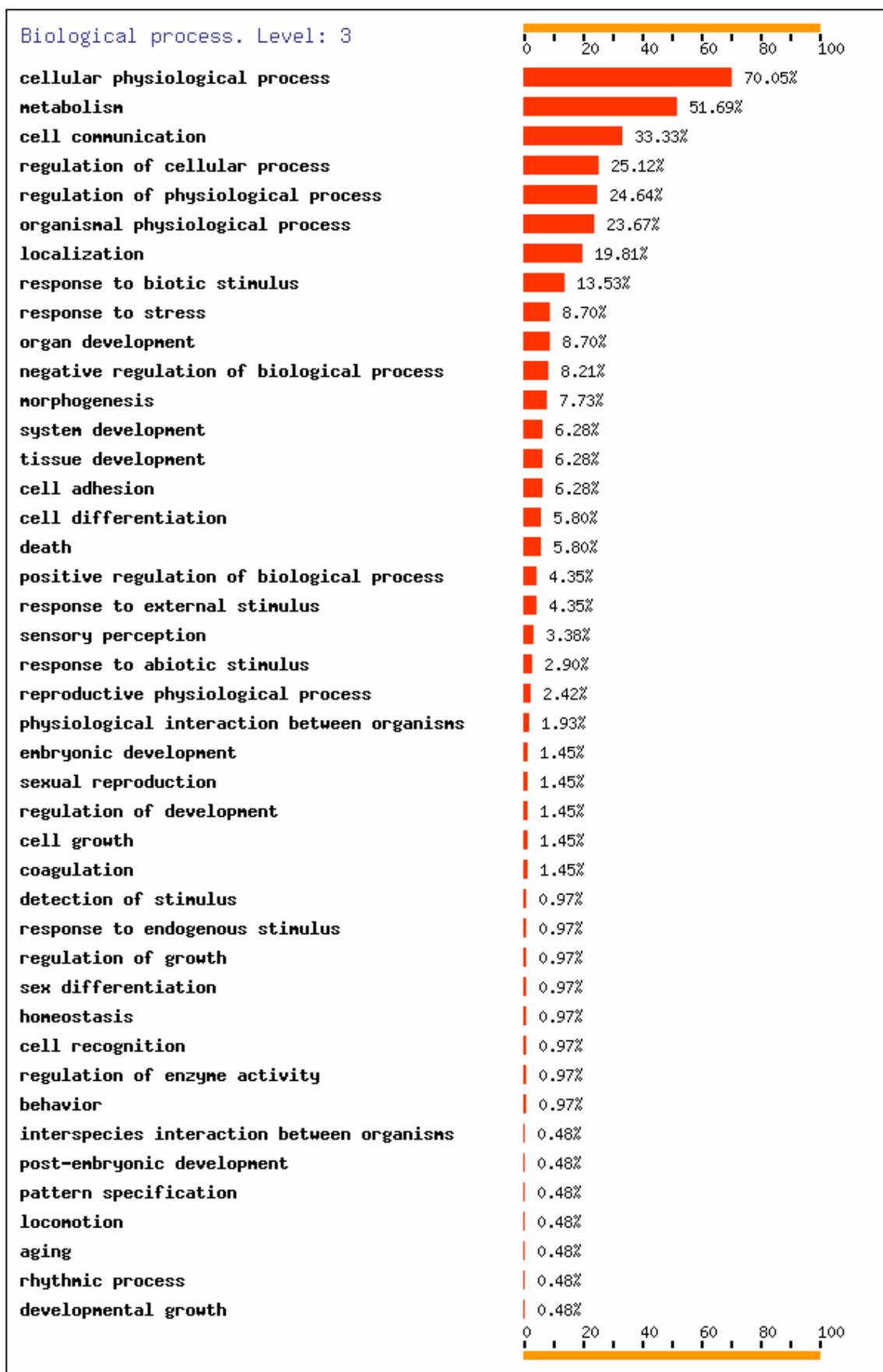


GRÁFICA 12. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO KS-47A EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

2.2. FÁRMACO KS-47B (gráficas 13 y 14).

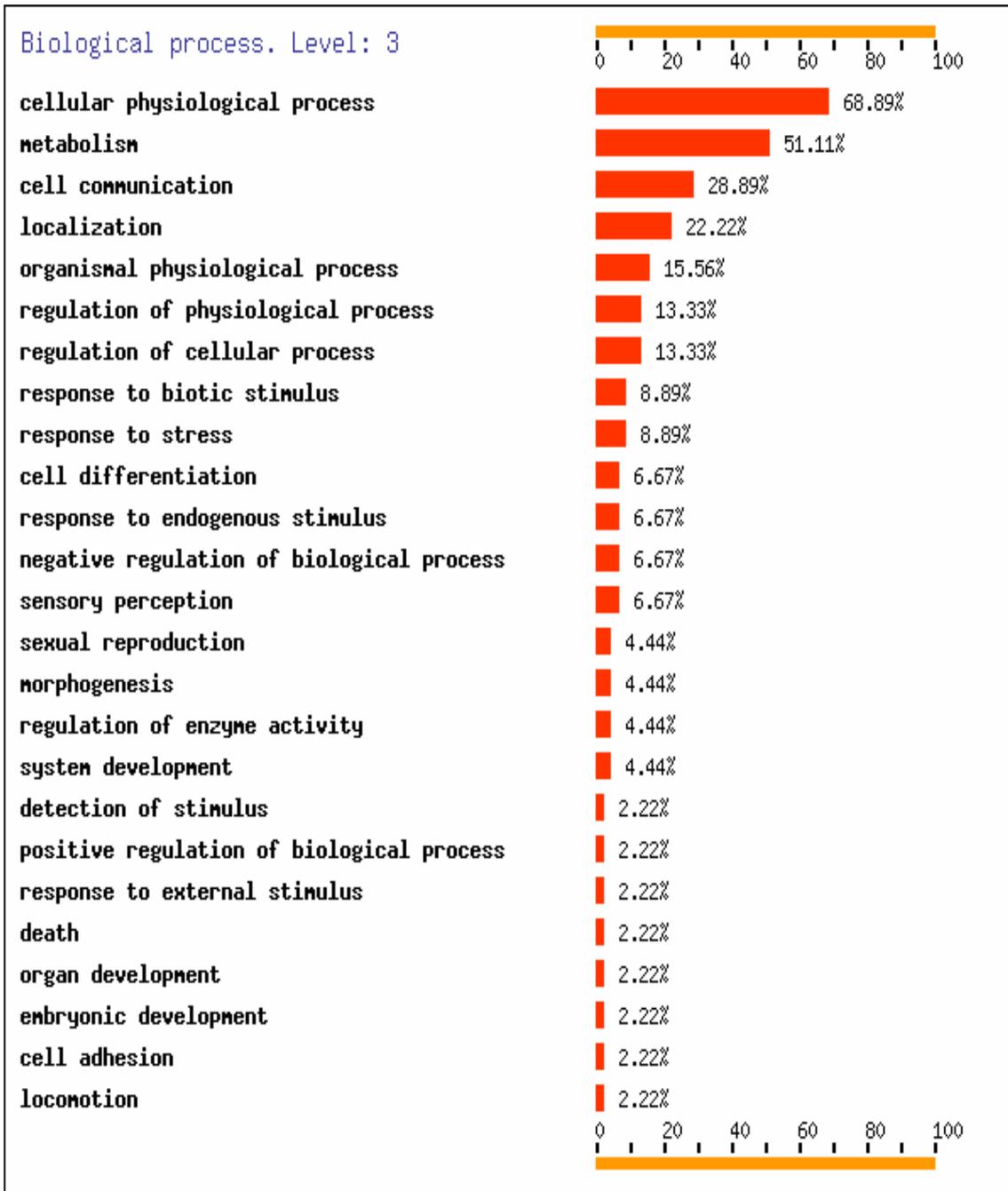


GRÁFICA 13. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO KS-47B EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

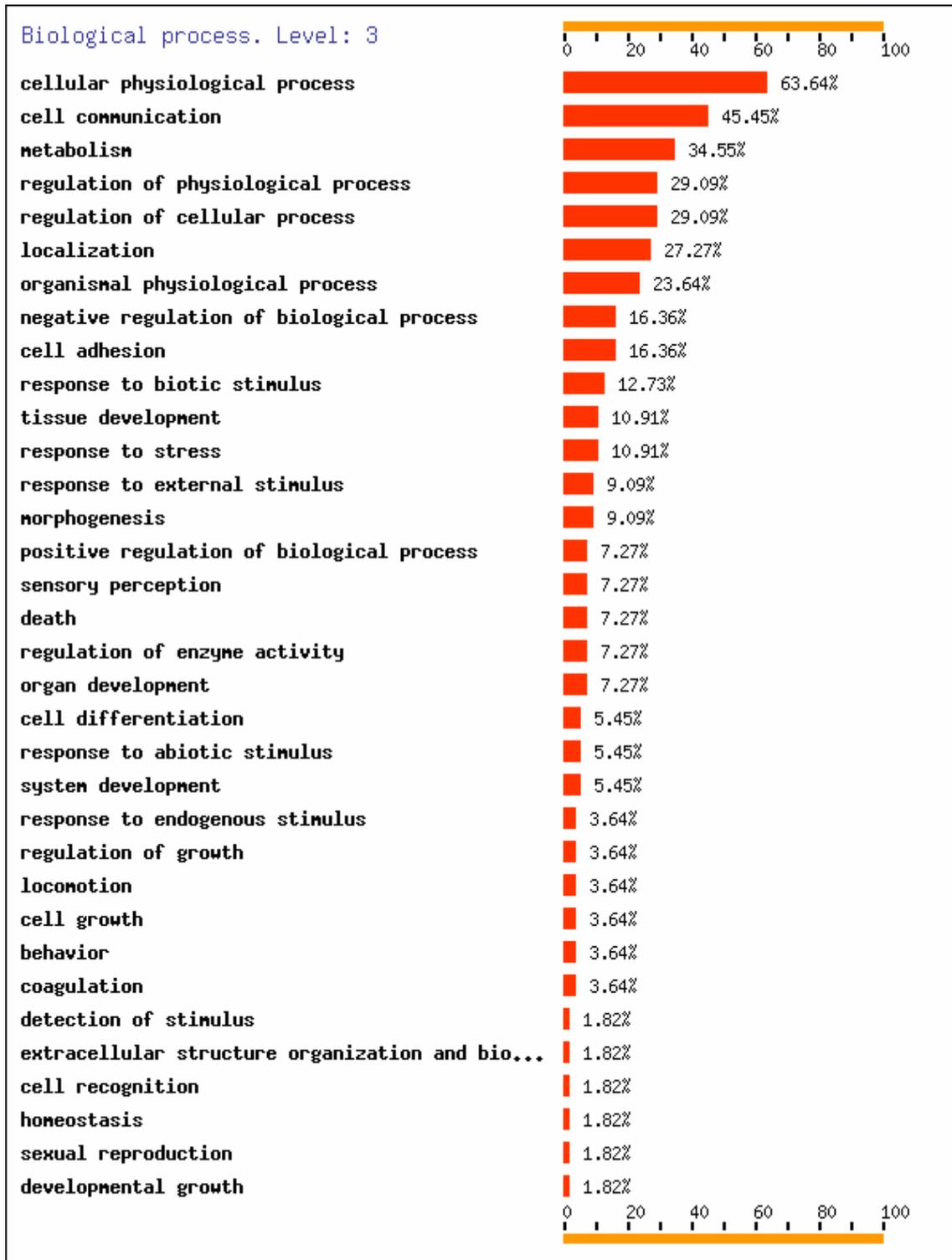


GRÁFICA 14. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO KS-47B EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

2.3. FÁRMACO MDG-828B (gráficas 15 y 16).

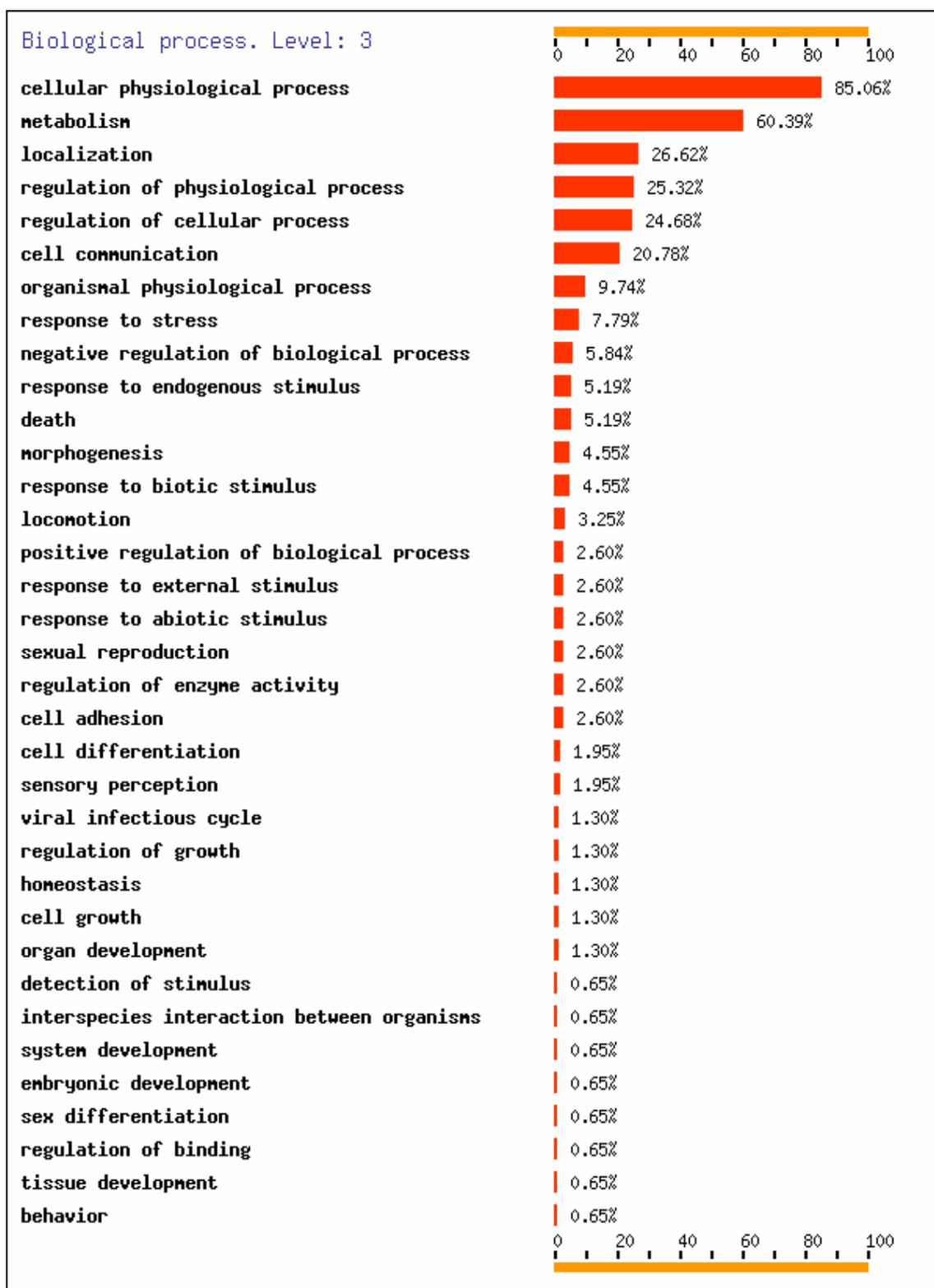


GRÁFICA 15. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-828B EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

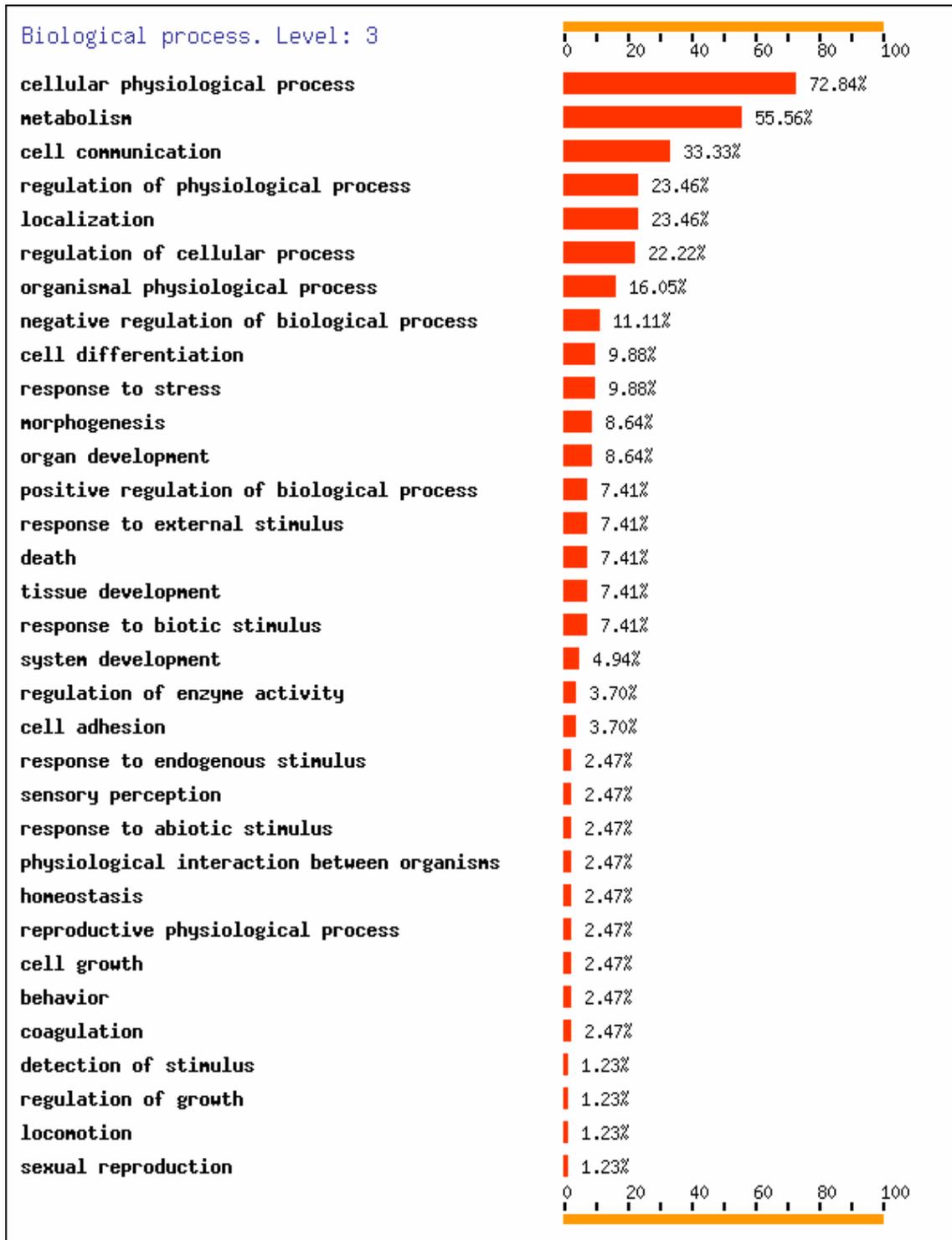


GRÁFICA 16. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-828B EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

2.4. FÁRMACO MDG-884D (gráficas 17 y 18).

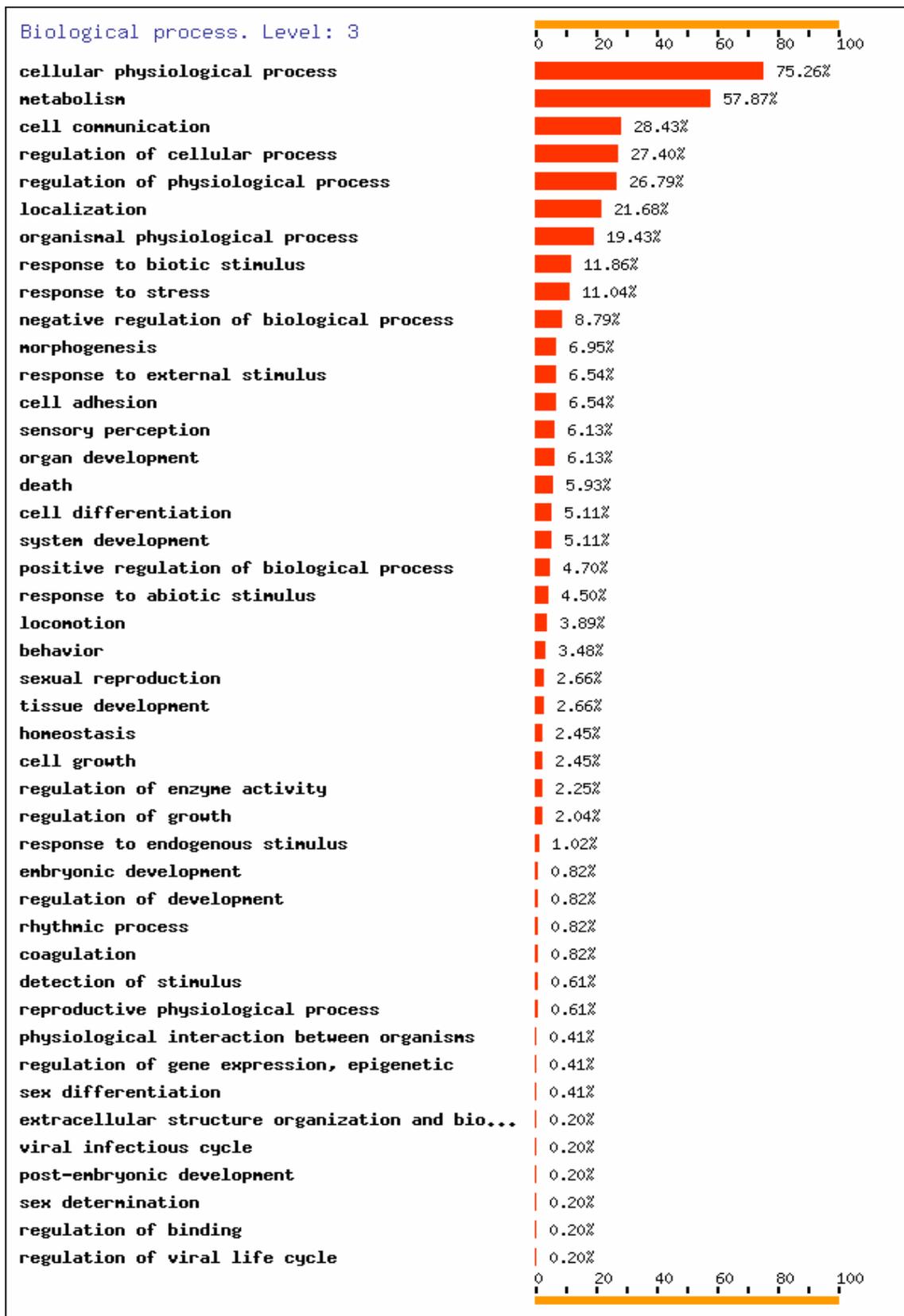


GRÁFICA 17. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-884D EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.



GRÁFICA 18. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-884D EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

2.5. FÁRMACO MDG-898D (gráficas 19 y 20).



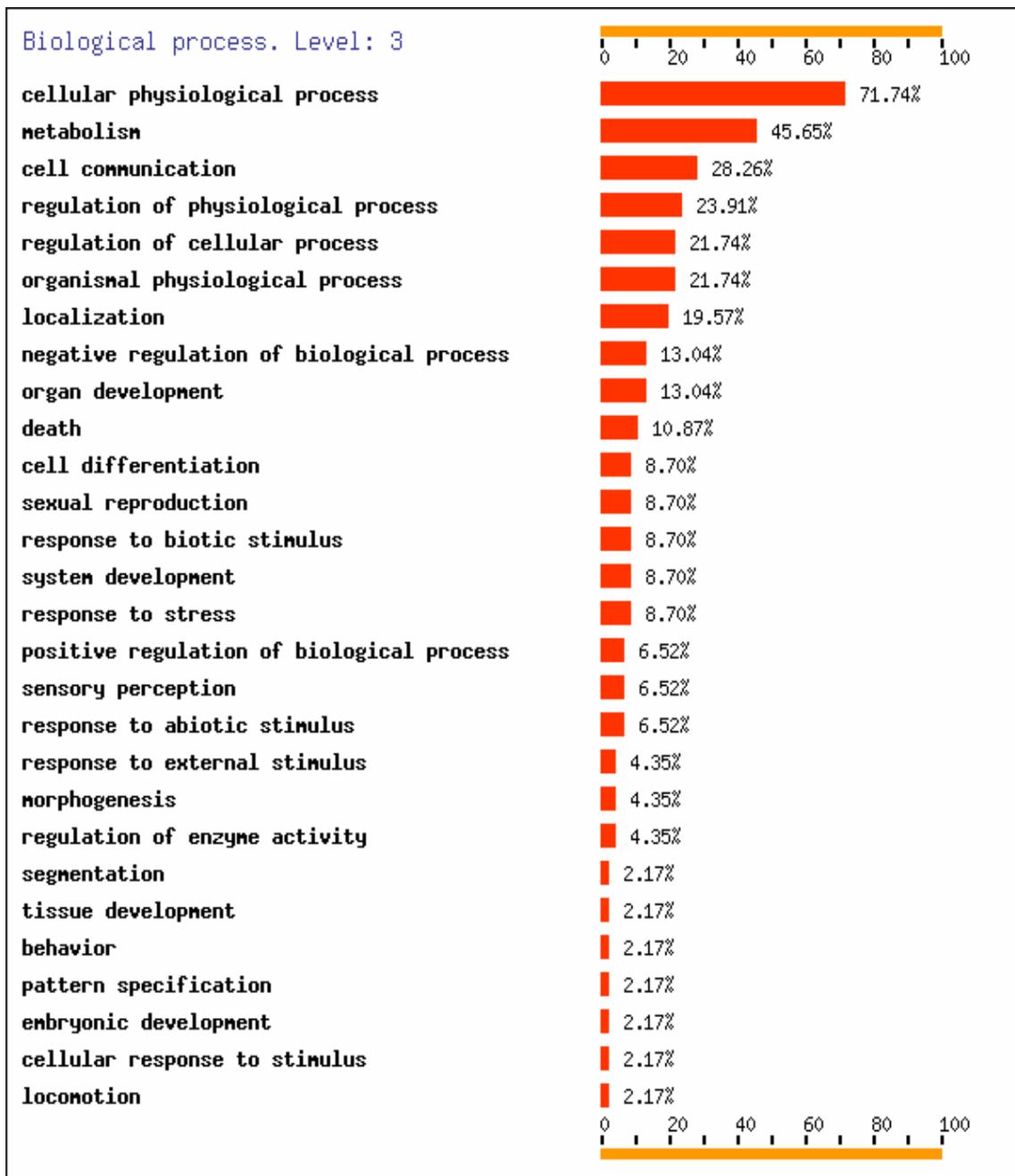
GRÁFICA 19. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-898D EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.



GRÁFICA 20. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-898D EN LA LÍNEA CELULAR MCF-10A AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

3. LÍNEA CELULAR HT-29

3.1. FÁRMACO KS-47A (gráficas 21 y 22).



GRÁFICA 21. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO KS-47A EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

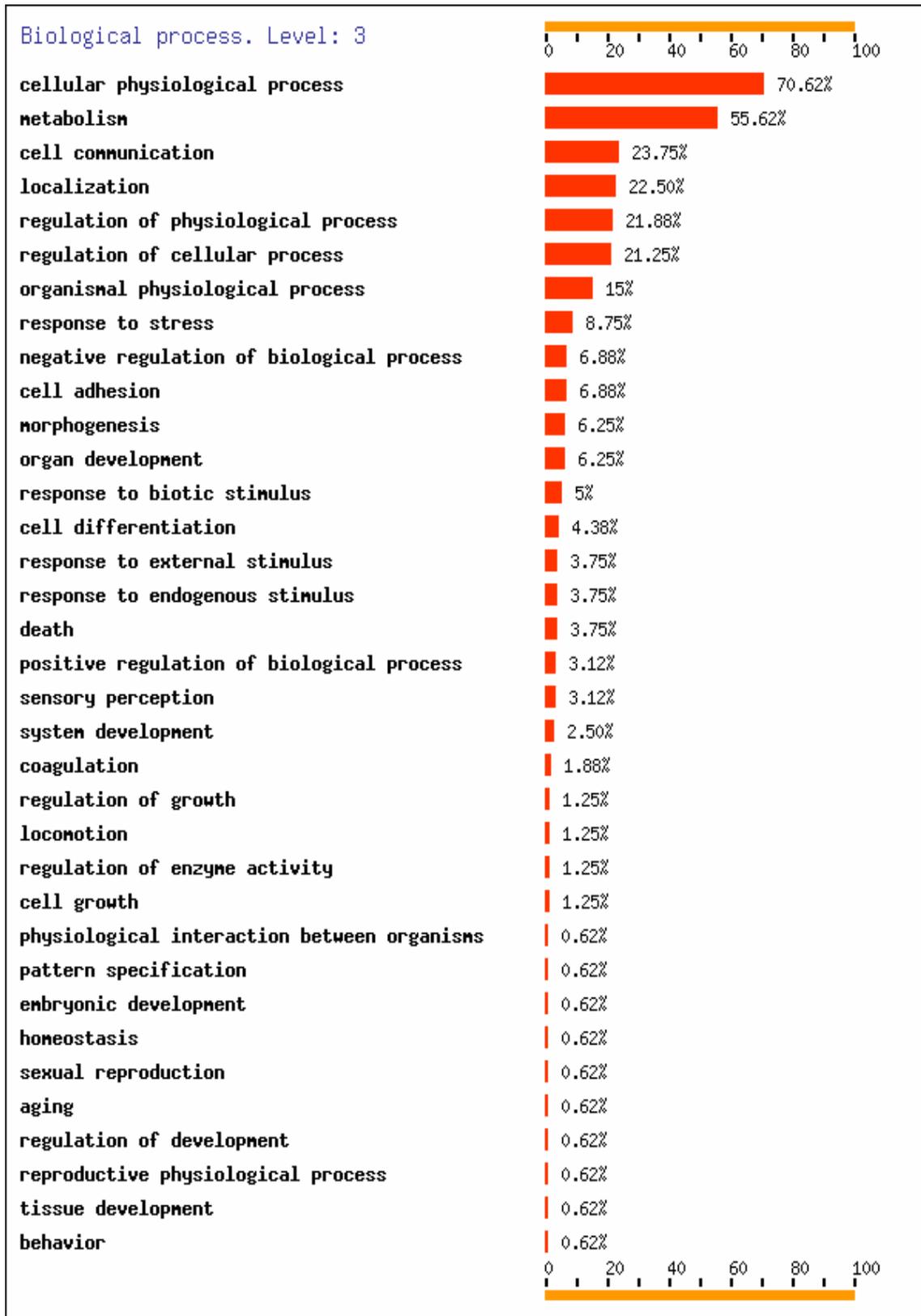


GRÁFICA 22. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO KS-47A EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

3.2. FÁRMACO KS-47B (gráfica 23 y 24).

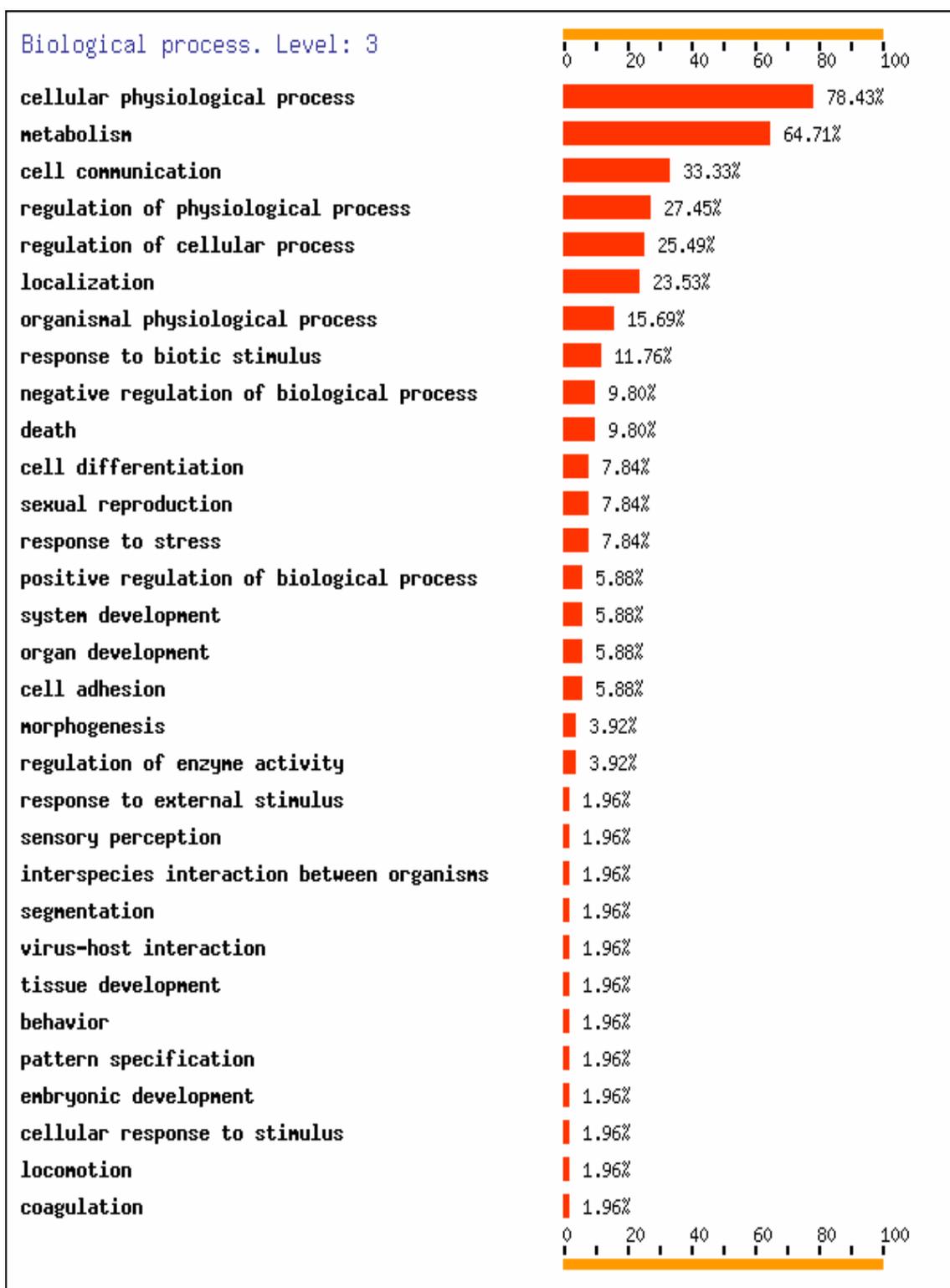


GRÁFICA 23. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO KS-47B EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

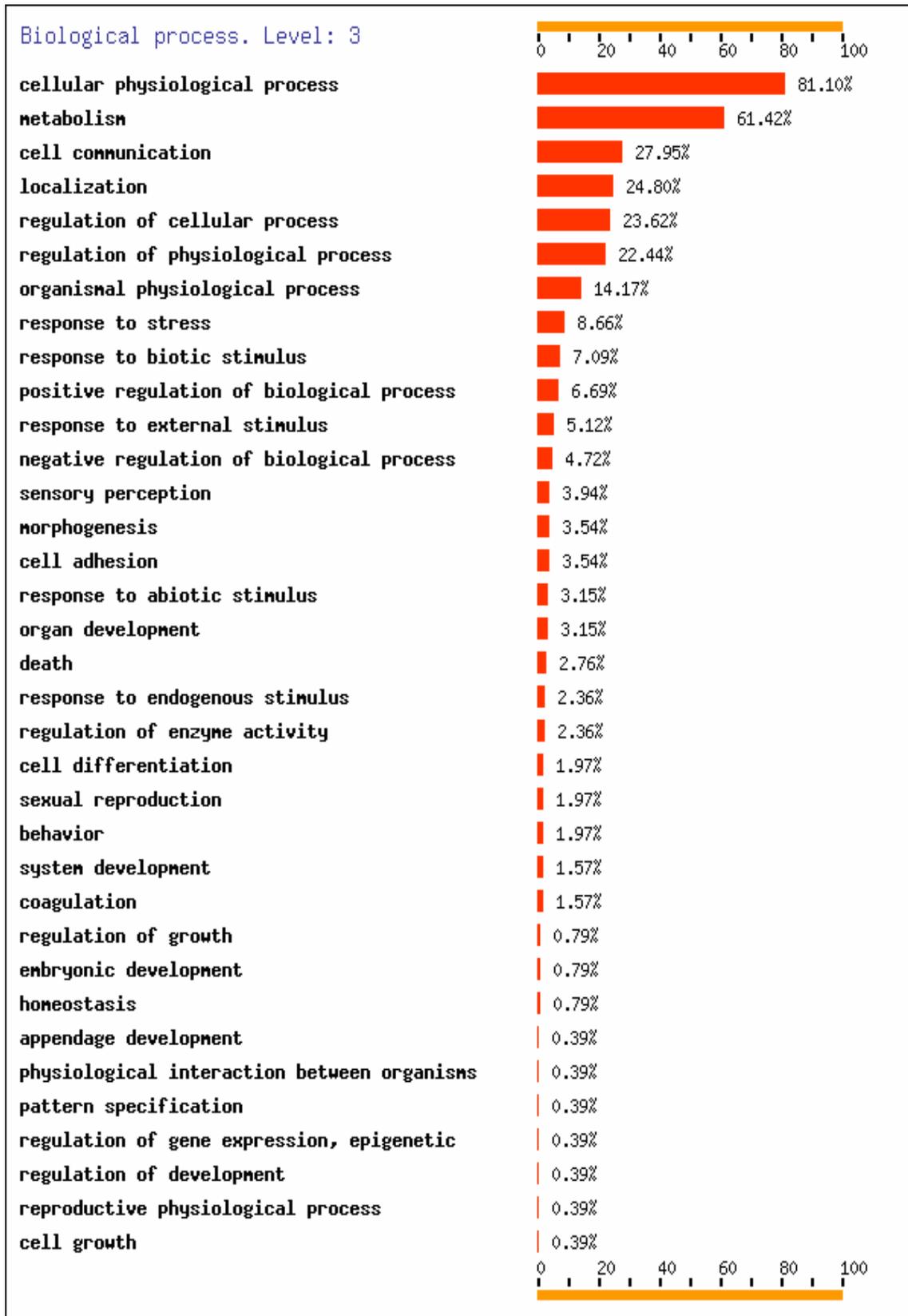


GRÁFICA 24. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO KS-47B EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

3.3. FÁRMACO MDG-828B (gráfica 25 y 26).

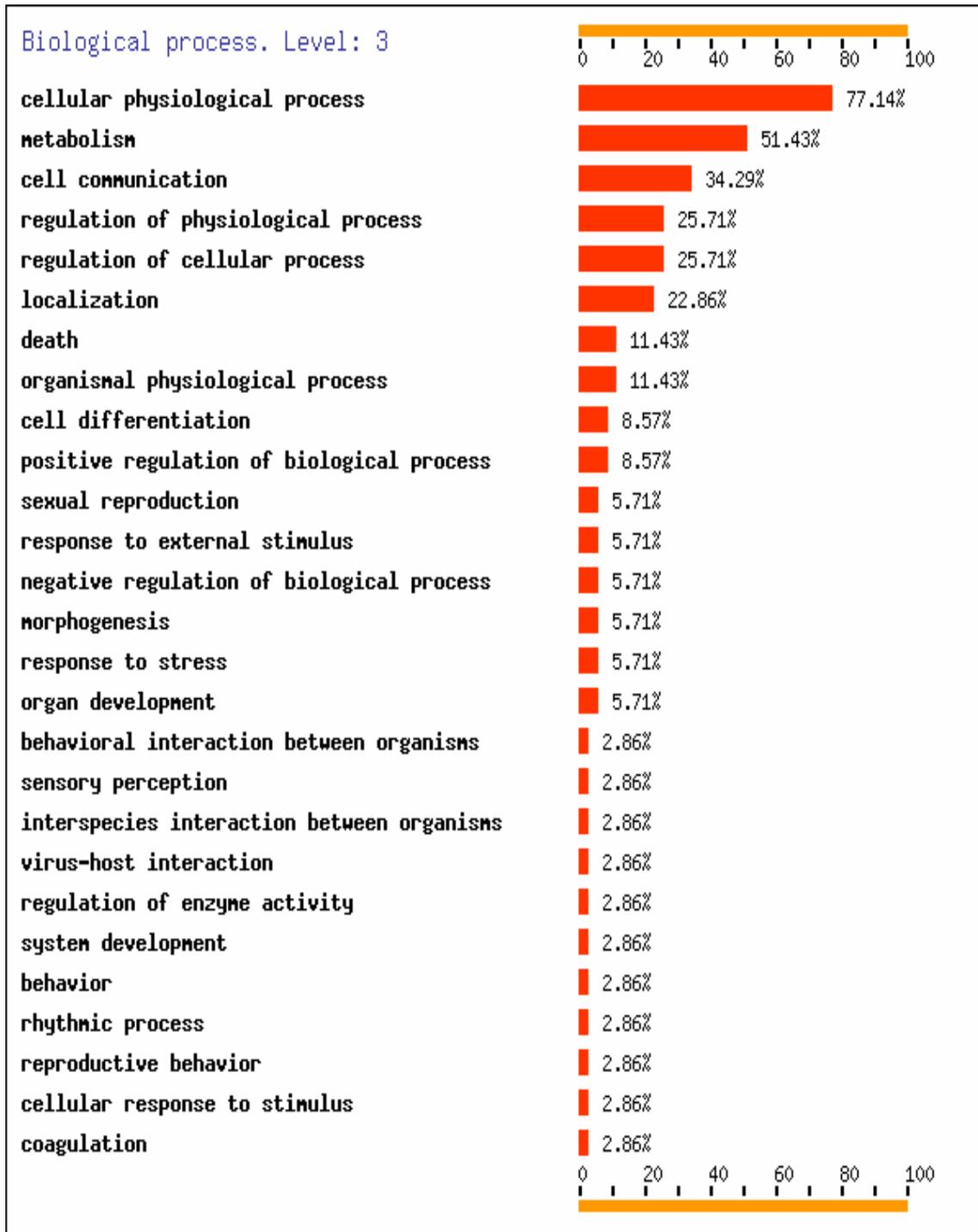


GRÁFICA 25. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-828B EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

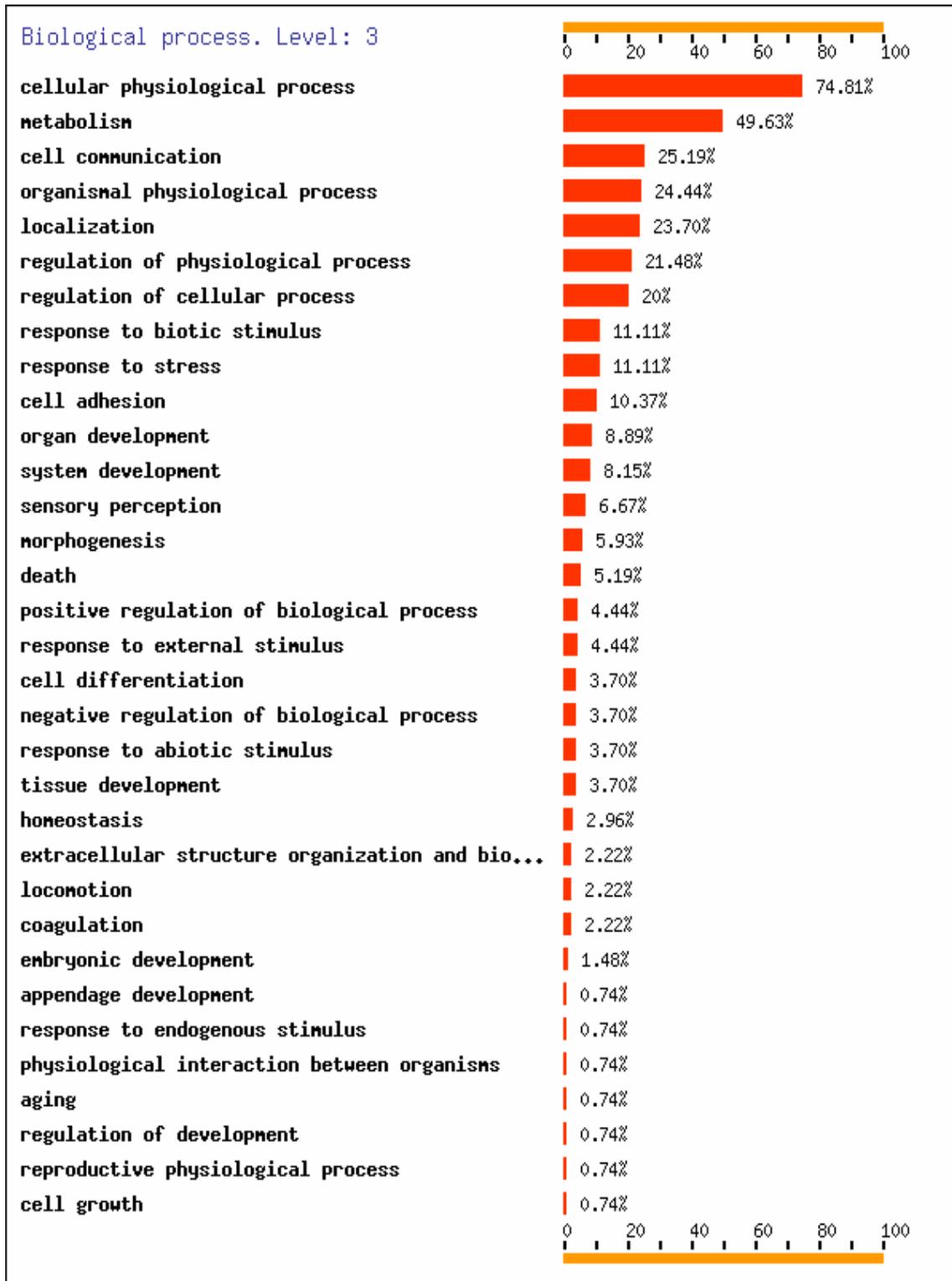


GRÁFICA 26. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-828B EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

3.4. FÁRMACO MDG-884D (gráficas 27 y 28).

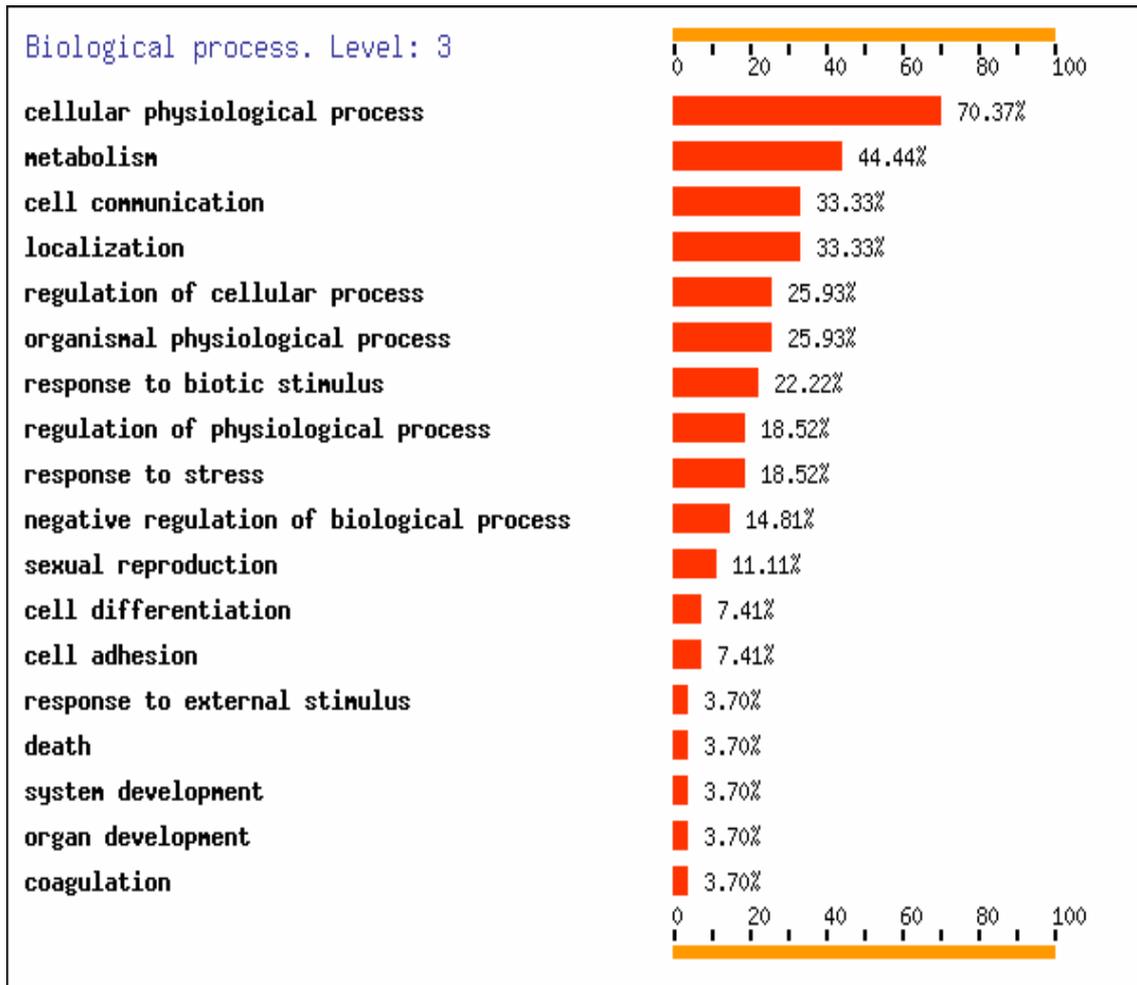


GRÁFICA 27. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-884D EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

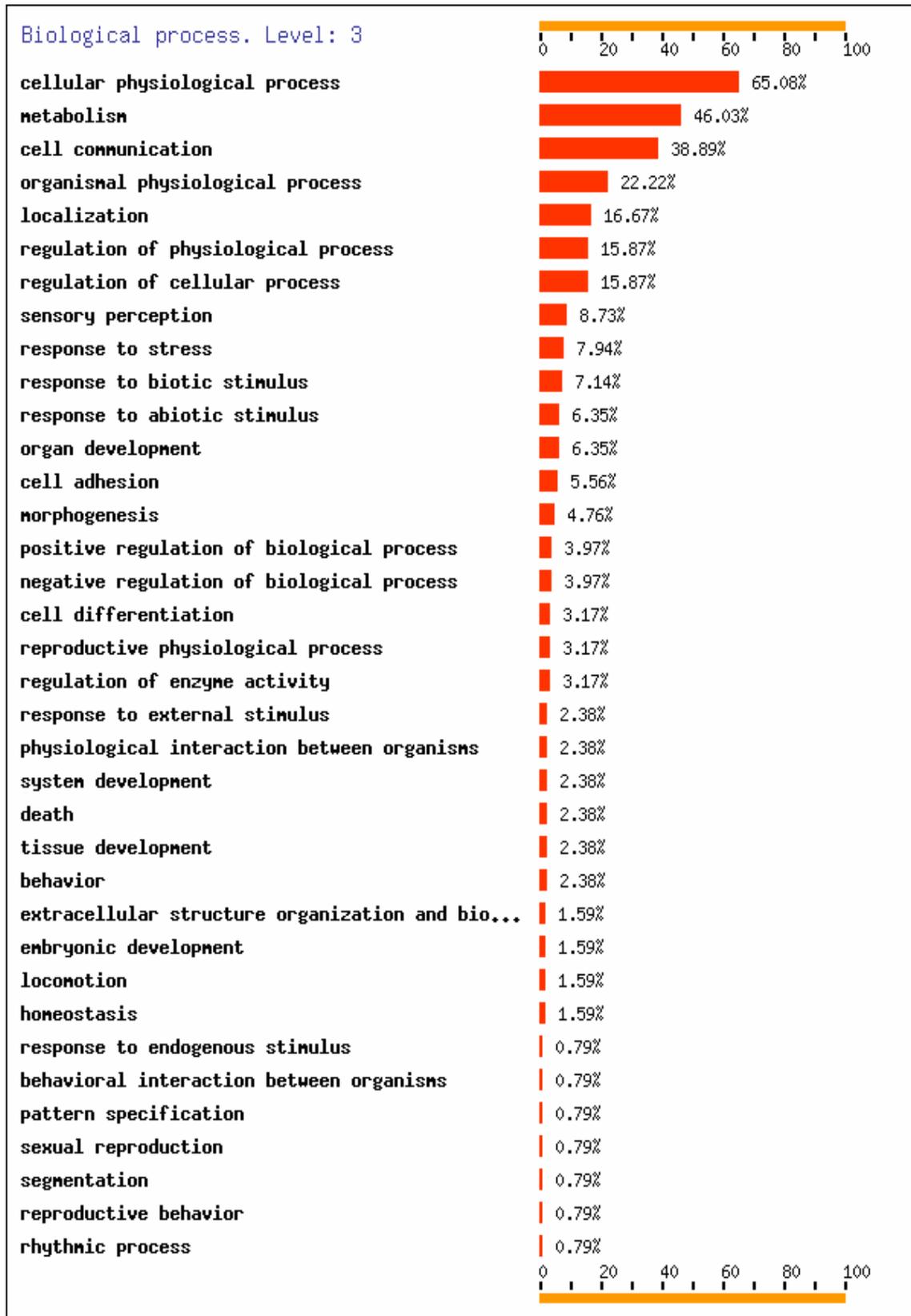


GRÁFICA 28. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-884D A EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

3.5. FÁRMACO MDG-898D (gráficas 29 y 30).



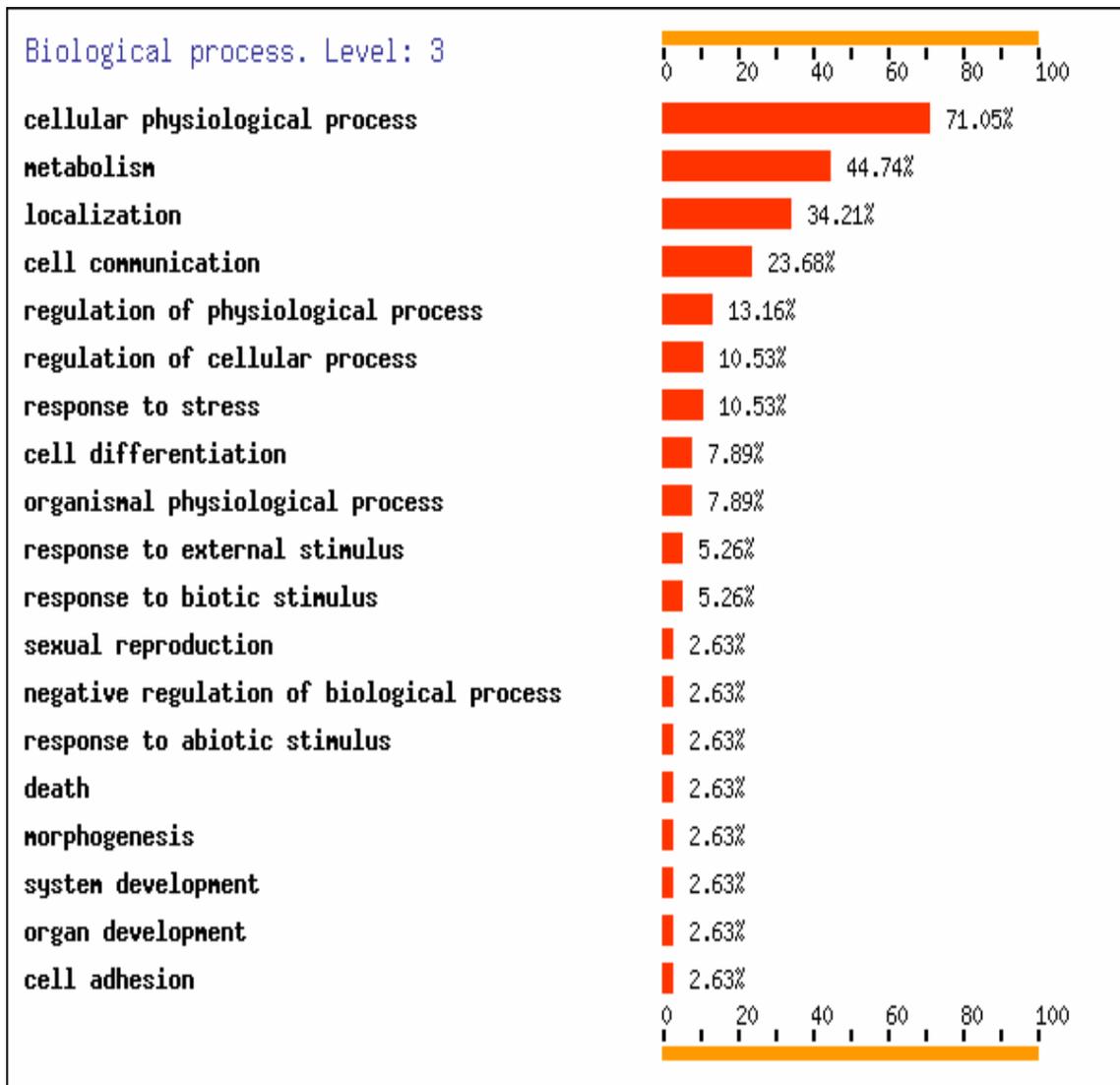
GRÁFICA 29. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-898D EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.



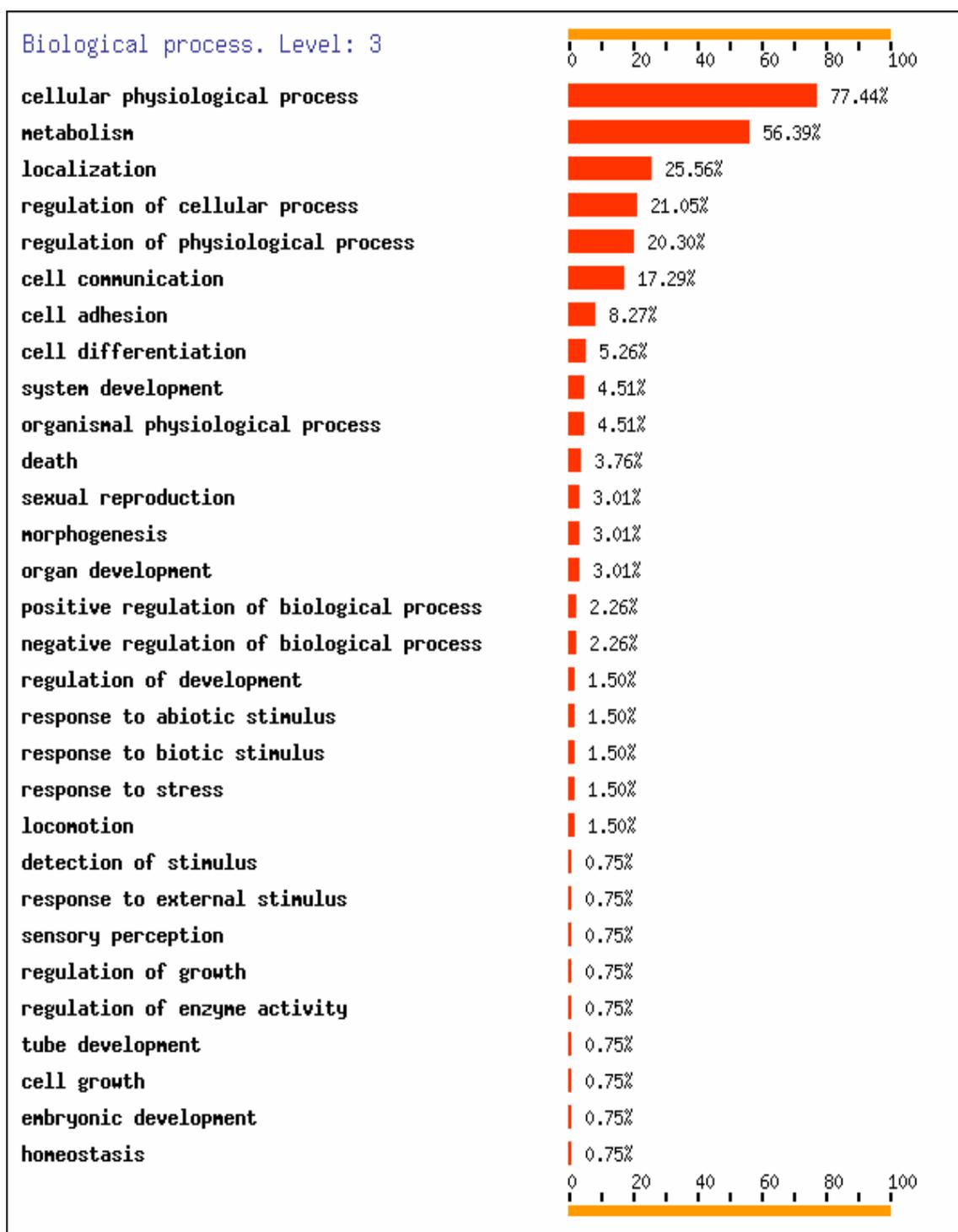
GRÁFICA 30. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-898D EN LA LÍNEA CELULAR HT-29 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

4. LÍNEA CELULAR IEC-6

4.1. FÁRMACO KS-47A (gráficas 31 y 32).

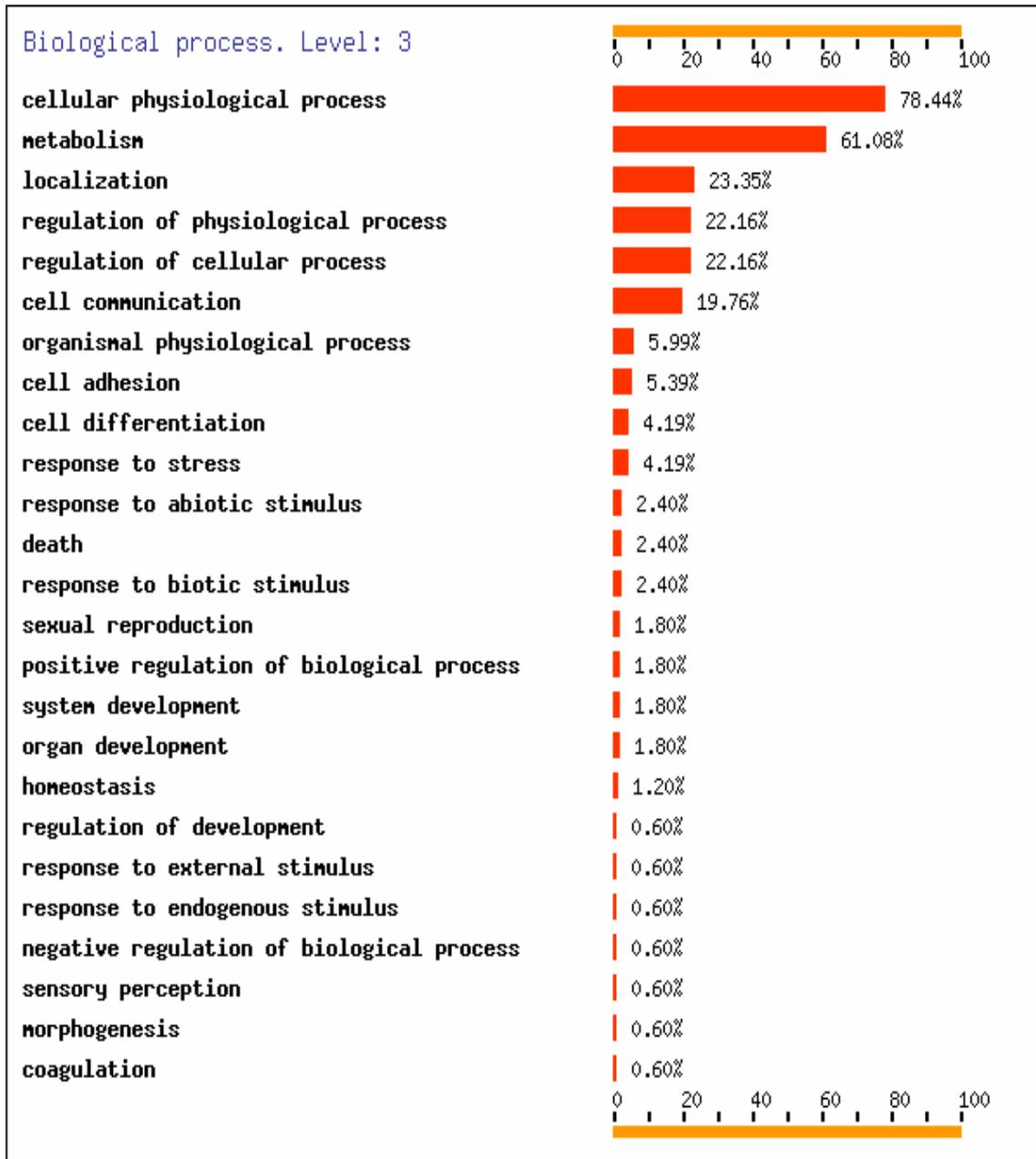


GRÁFICA 31. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO KS-47A EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

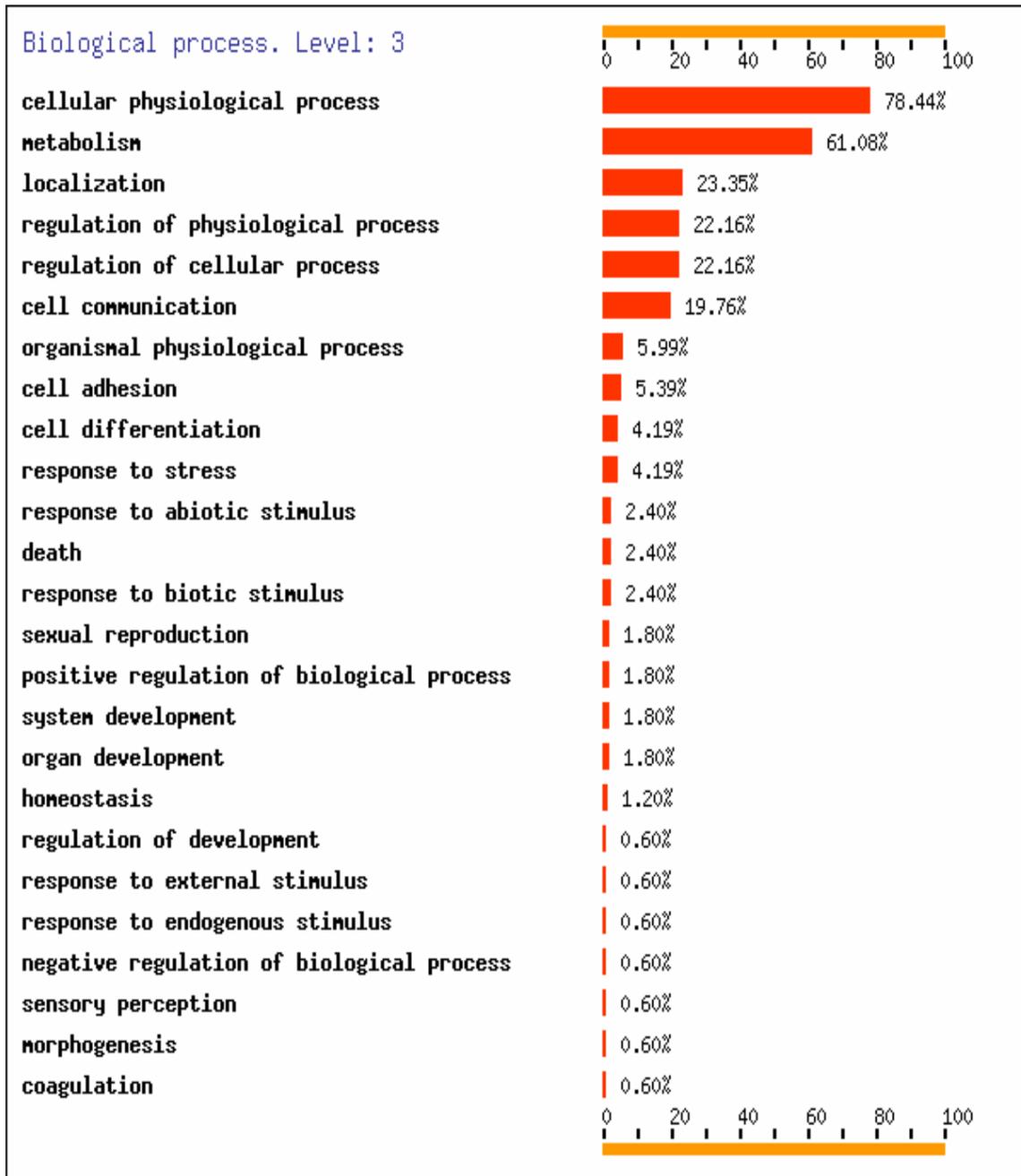


GRÁFICA 32. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO KS-47A EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

4.2. FÁRMACO KS-47B (gráficas 33 y 34).

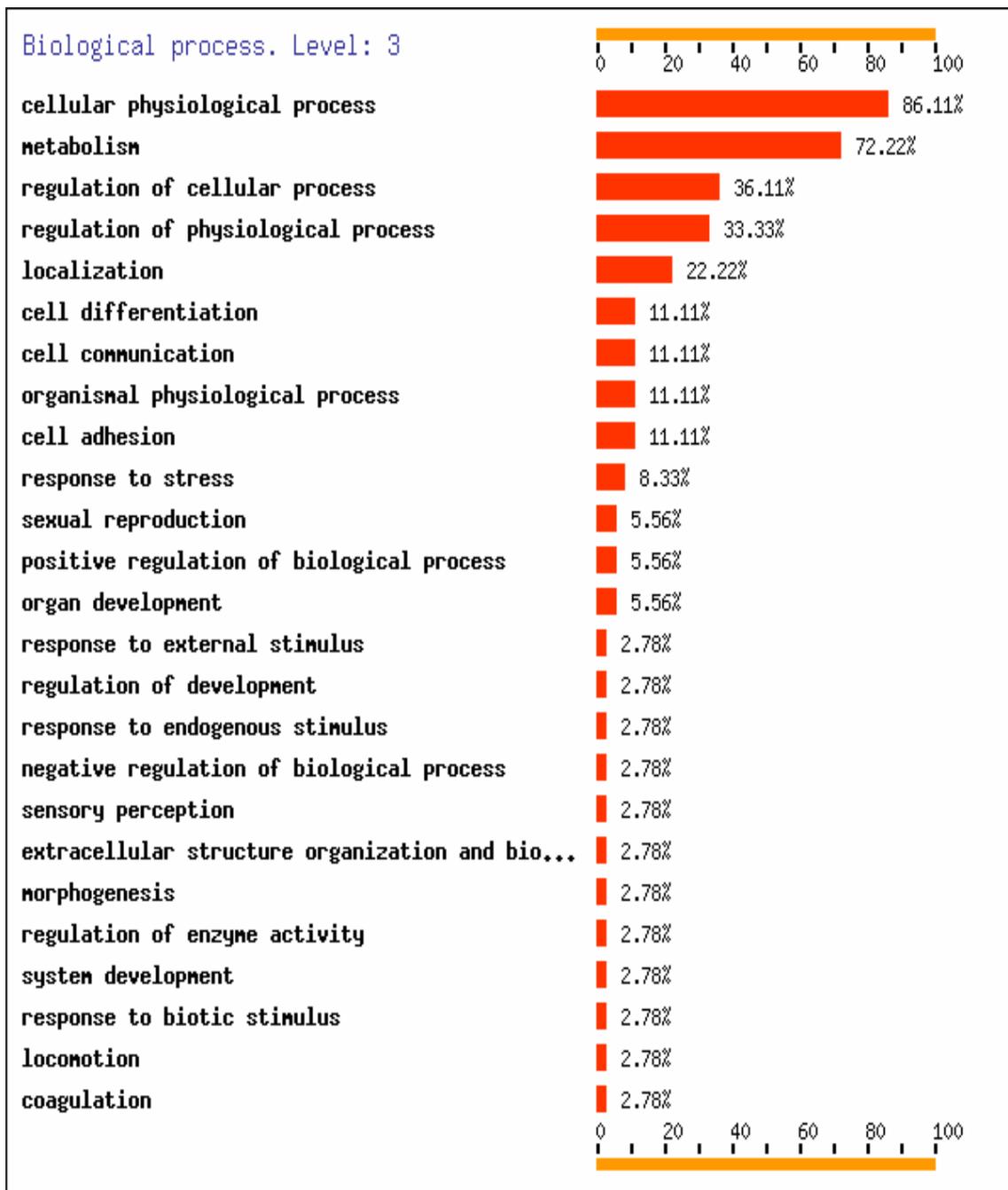


GRÁFICA 33. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO KS-47B EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

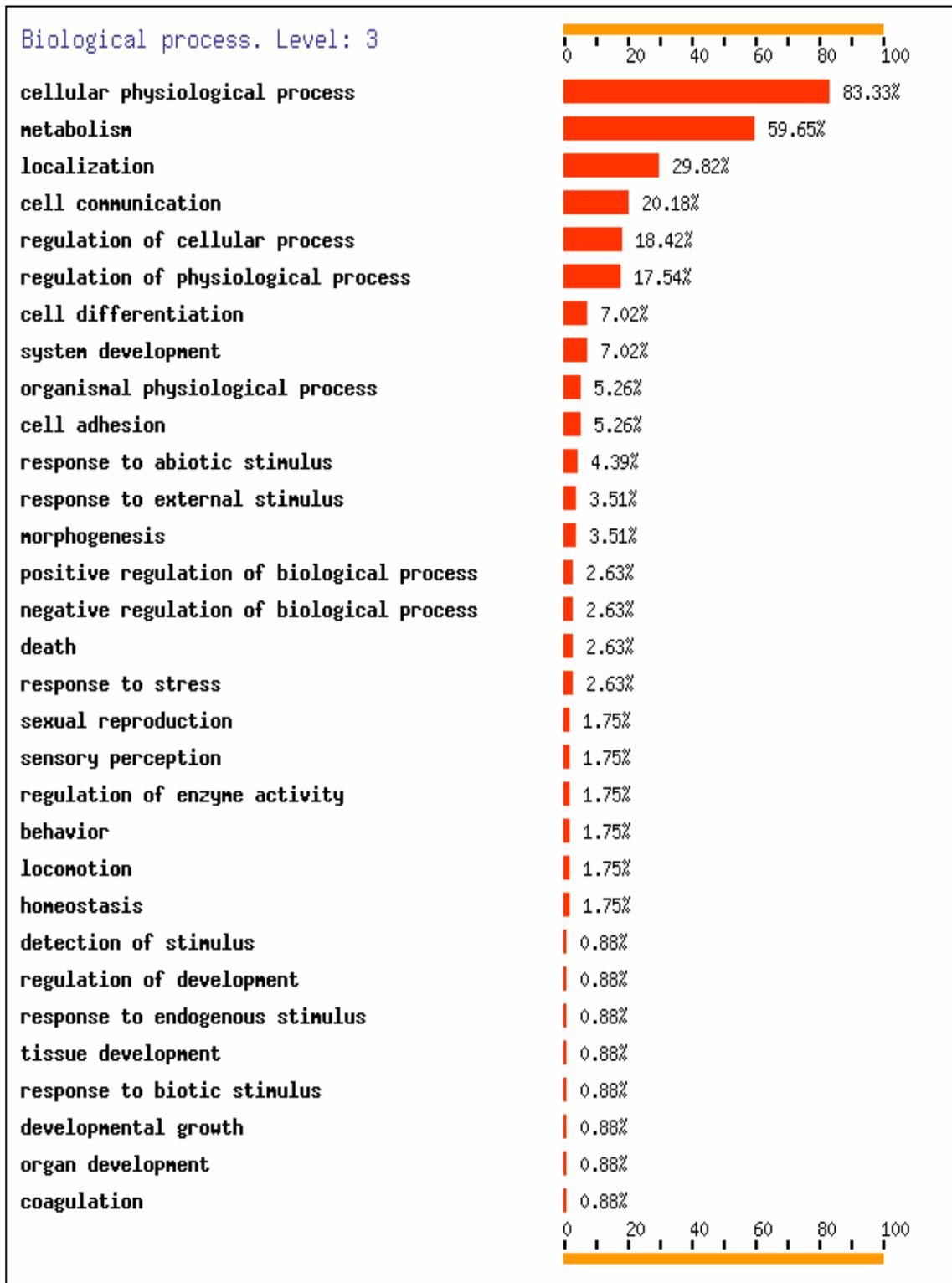


GRÁFICA 34. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO KS-47B EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

4.3. FÁRMACO MDG-828B (gráficas 35 y 36).

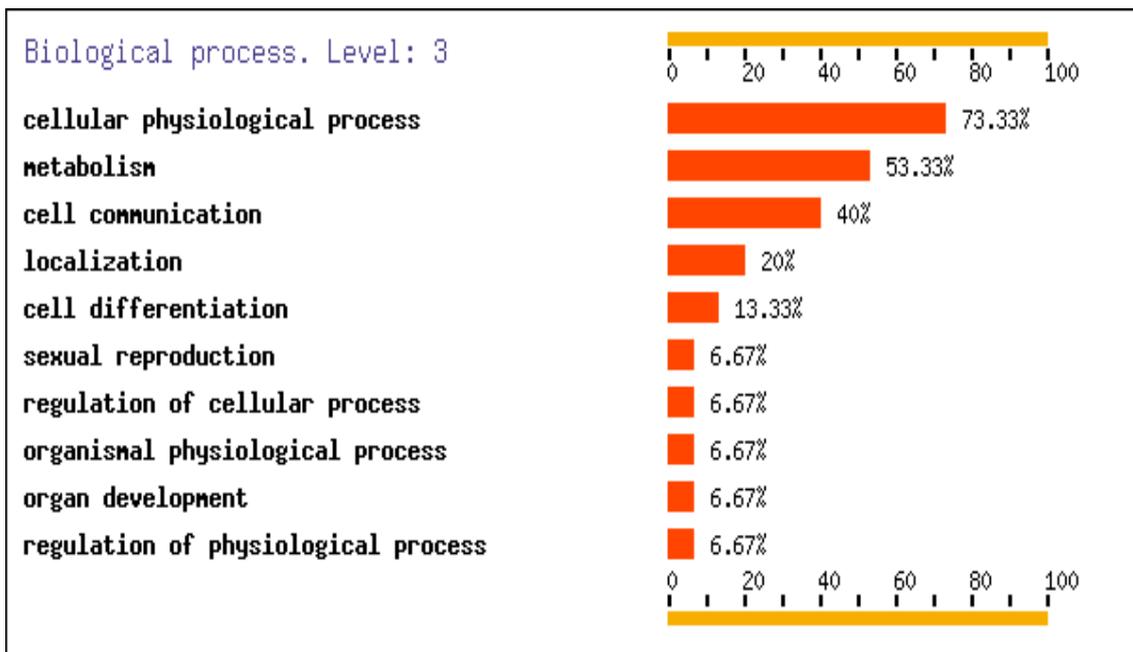


GRÁFICA 35. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-828B EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

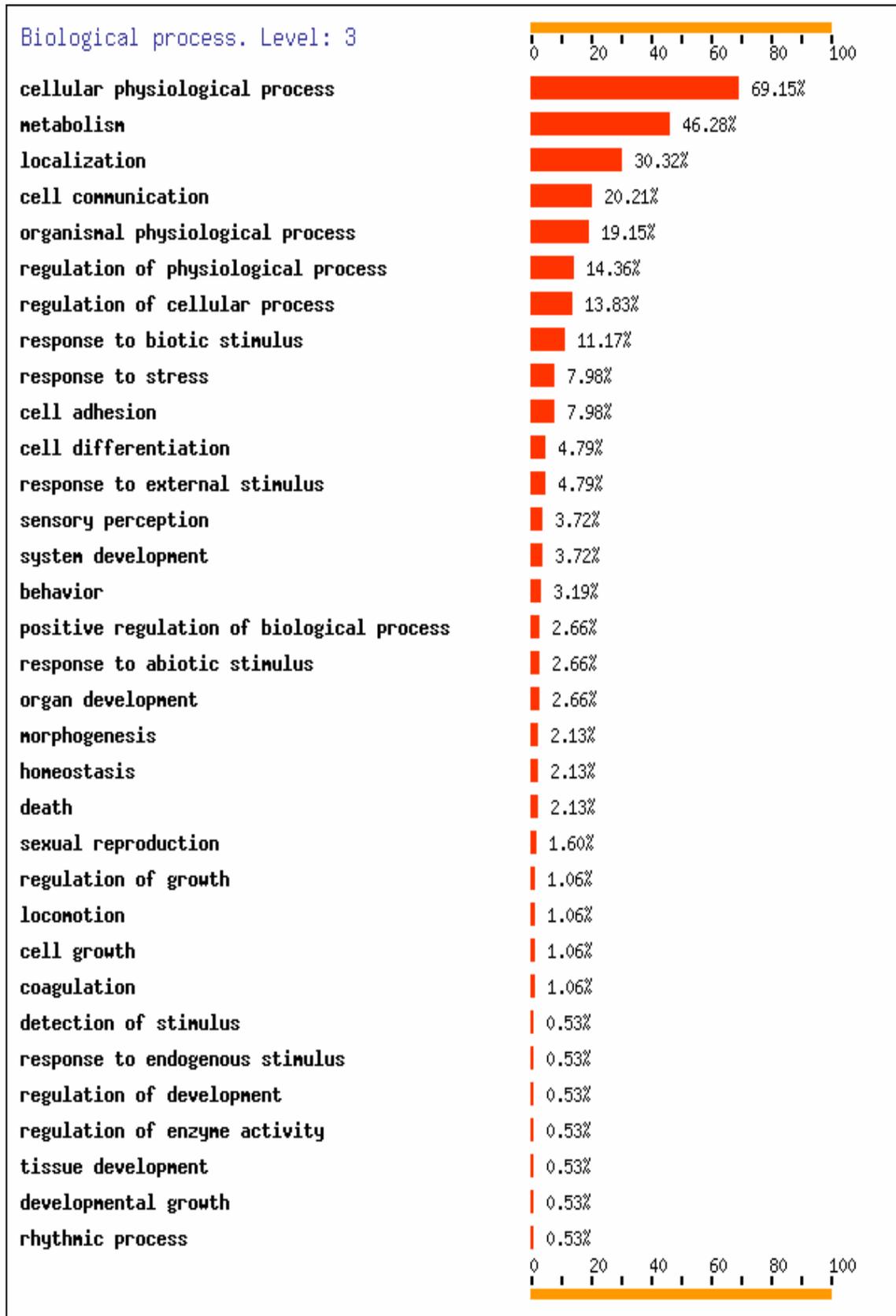


GRÁFICA 36. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-828B EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

4.4. FÁRMACO MDG-884D (gráficas 37 y 38).

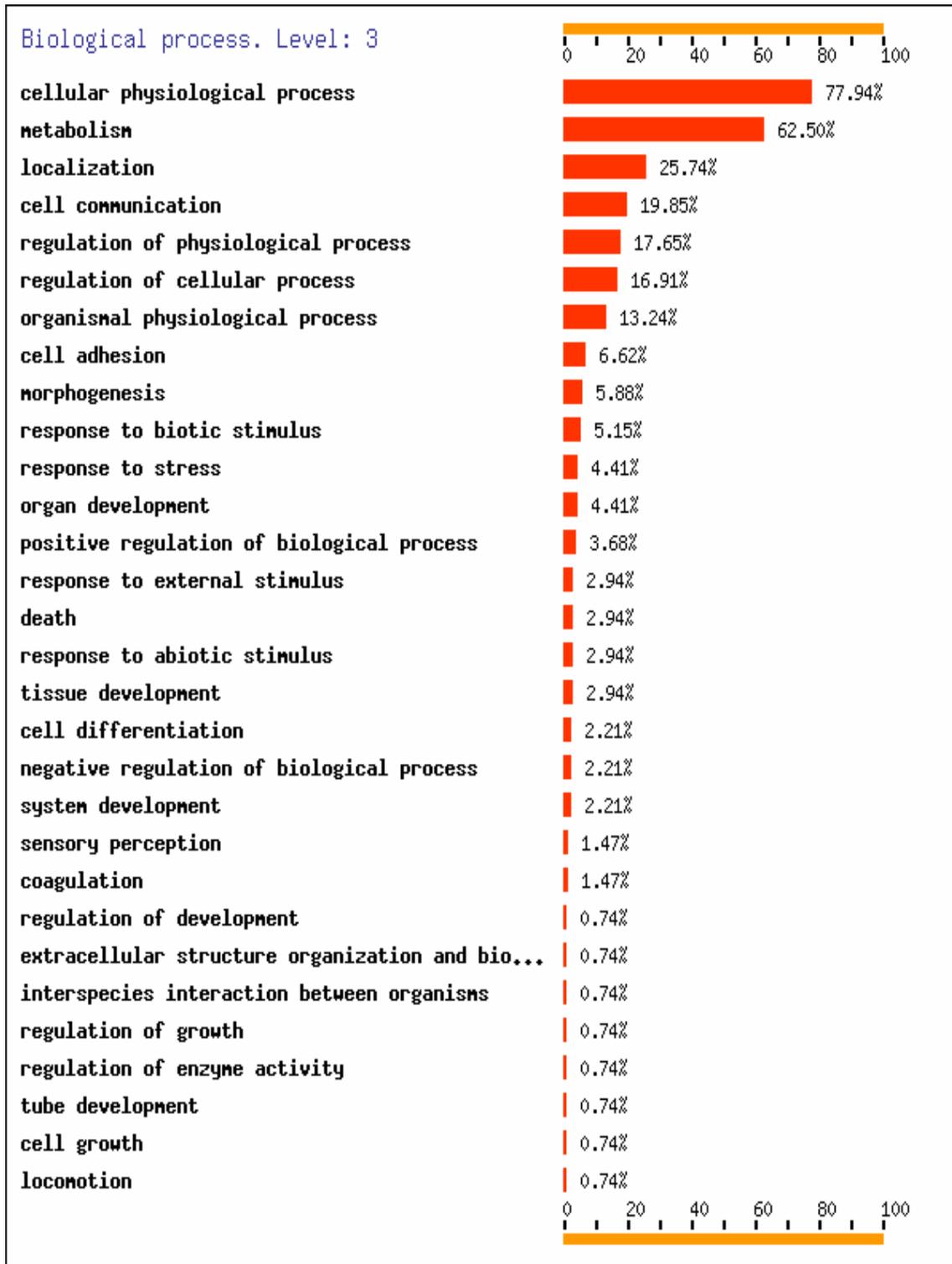


GRÁFICA 37. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-884D EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.



GRÁFICA 38. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-884D EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

4.5. FÁRMACO MDG-898D (gráficas 39 y 40).



GRÁFICA 39. PORCENTAJE DE GENES INDUCIDOS POR EL COMPUESTO MDG-898D EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.



GRÁFICA 40. PORCENTAJE DE GENES REPRIMIDOS POR EL COMPUESTO MDG-898D EN LA LÍNEA CELULAR IEC-6 AGRUPADOS POR FUNCIÓN BIOLÓGICA.

BIBLIOGRAFÍA

- ◆ Adams, J., Kauffman, M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 2004; 22: 304-311.
- ◆ Agami R., Bernards R. Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of cell cycle. *Cancer Letters* 2002; 177: 111-118.
- ◆ Amati B., Brooks M.W., Levy N., Littlewood T.D., Evan G.I., Land H. Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 1993; 72(2): 233-45.
- ◆ Ametani A., Hachimura S., Yamamoto Y., Shimizu M., Imaoka A., Yi H. K., Hashimoto K. Consecutive events of growth, differentiation and death of the small intestinal epithelial cell line, IEC-6. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996; 32(3): 127-30.
- ◆ Angel P., Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072(2-3): 129-57.
- ◆ Asaga T., Inaba M., Nagano A., Yanoma S. Induction of apoptosis in breast cancer cells by preoperative oral administration of 5-fluorouracil. *Cancer & Chemotherapy* 2001; 28: 49-53.
- ◆ Baccarelli A., Calista D., Minghetti P., Marinelli B., Albetti B., Tseng T., Hedayati M., Grossman L., Landi G., Struewing J.P., Landi M.T. XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. *Br J Cancer* 2004; 90(2): 497-502.
- ◆ Baell J.B., Huang D.C.S. Prospect for targeting the bcl-2 family of proteins to develop novel cytotoxic drugs. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 851-863.
- ◆ Barbacid M. ras gene. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
- ◆ Bassermann F., von Klitzing C., Münch S., Bai R., Kawaguchi H., Morris S.W., Peschel C., Duyster J. NIPA Defines an SCF-Type Mammalian E3 Ligase that Regulates Mitotic Entry. *Cell* 2005; 122: 45-57.

- ◆ Beaulieu J. F., Weiser M. M., Herrera L., Quaroni A. Detection and characterization of sucrase-isomaltase in adult human colon and in colonic polyps. *Gastroenterology* 1990; 98(6): 1467-77.
- ◆ Beck P. L., Rosenberg I. M., Xavier R. J., Koh T., Wong J. F., Podolsky D. K. Transforming growth factor-beta mediates intestinal healing and susceptibility to injury in vitro and in vivo through epithelial cells. *Am J Pathol* 2003; 162(2): 597-608.
- ◆ Berger A.C., Alexander H.R., Wu P.C., Tang G., Gnant M.F.X., Mixon A., Turner E.S., Libutti S.K. Tumour necrosis factor receptor I (p55) is upregulated on endothelial cells by exposure to the tumour-derived cytokine endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP-II). *Cytokine* 2000; 12: 992-1000.
- ◆ Bland K.I., Copeland III E.M. Mastectomía radical de Halsted. En: Bland K.I., Copeland III E.M. editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000. P.872-886.
- ◆ Bosman F.T. The hamartoma-adenoma-carcinoma sequence. *J Pathol* 1999; 188: 1-2.
- ◆ Brittan M., Wright N. A. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002; 197(4): 492-509.
- ◆ Bruno S., Ardelt B., Skierski J.S., Traganos F., Darzynkiewicz Z. Different effects of staurosporine, an inhibitor of protein kinases, on the cell cycle and chromatin structure of normal and leukemic lymphocytes. *Cancer Res* 1992; 52(2): 470-3.
- ◆ Bundgaard H., Nielsen N.M. Prodrugs and drug delivery systems. 74. Facile hydrolysis of *N*-(acyloxymethyl)amide derivatives and implications for the design of prodrugs of NH-acidic compounds and of carboxylic acids. *Acta Pharm Suec* 1987; 24: 233-246.
- ◆ Burgess A. W. Growth control mechanisms in normal and transformed intestinal cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; 353(1370): 903-9.

- ◆ Burt R.W., Jacoby R.F. Polyposis syndromes. In: Yamada T., editor. Text book of Gastroenterology. 3rd edition. Philadelphia: Lipincott Raven; 1999. P. 1995-2022.
- ◆ Bush A., Mateyak M., Dugan K., Obaya A., Adachi S., Sedivy J., Cole M. *c-myc* null cells misregulate *cad* and *gadd45* but not other proposed *c-Myc* targets. *Genes and development* 1998; 12(24): 3797-3802.
- ◆ Calero F. Cáncer de mama IV. Tratamiento locorregional. Factores de pronóstico. Ganglio centinela. Tratamiento coadyuvante. En: Cabero L., editors. Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción. 1^a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2003. P. 1716-1729.
- ◆ Calhau C., Martel F., Hipolito-Reis C., Azevedo I. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clinical Biochemistry* 2000; 33(7): 571.
- ◆ Cammisuli S., Winiski A., Nussbaumer P., Hiestand P., Stutz A., Weckbecker G. SDZ 281-977: a modified partial structure of lavendustin A that exerts potent and selective antiproliferative activities in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 1996; 65(3): 351-9.
- ◆ Campos J., Saniger E., Marchal J.A., Aiello S., Suárez I., Boulaiz H. New médium oxacyclic O,N-Acetals and related open analogs: biological activities. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 887-916.
- ◆ Canman C.E., Kastan M.B. Role of p53 in apoptosis. En: Kaufmann S.H. editors. 1^a ed. San Diego. Academic Press. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology* 1997; 41: 1-34.
- ◆ Cariou S., Catzavelos C., Slingerland J.M. Prognostic implications of expression of the cell cycle inhibitor protein p27Kip1. *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 52: 29-41.
- ◆ Carlson B., Lahusen T., Singh S., Loaiza-Pérez A., Worland P.J., Pestell R. Down-regulation of cyclin D₁ by transcriptional repression in MCF-7

- human breast carcinoma cells induced by flavopiridol. *Cancer Research* 1999; 59: 4634-4641.
- ◆ Carroll K. M., Wong T. T., Drabik D. L., Chang E. B. Differentiation of rat small intestinal epithelial cells by extracellular matrix. *Am J Physiol* 1988; 254(3 Pt 1): G355-60.
 - ◆ Castedo M., Perfettini J-L., Roumier T., Kroemer G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death and Differentiation* 2002; 9:1287-1293.
 - ◆ Ciocca D.R., Gago F.R. Factores pronósticos en el cáncer de mama y lesiones relacionadas. En: Pérez López F.R., editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P. 155-174.
 - ◆ Clarke P.A., Poele R., Wooster R., Workman P. Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. *Biochem Pharmacol* 2001; 62(10): 1311-36.
 - ◆ Clatworthy J. P., Subramanian V. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev* 2001; 101(1-2): 3-9.
 - ◆ Clurman B.E., Porter P. New insights into the tumor suppression function of p27^{kip1}. *Proc. National Academy of Sciences* 1998; 95: 15158-15160.
 - ◆ Cooper G., Hausman R. *The cell. A molecular approach*. ASM Press, Washington, 3ª edición, 2004.
 - ◆ Coradini D., Daidone M.G. Biomolecular prognostic factors in breast cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2004; 16(1): 49-55.
 - ◆ Corkins M. R., Vanderhoof J. A., Slentz D. H., MacDonald R. G., Park J. H. Growth stimulation by transfection of intestinal epithelial cells with an antisense insulin-like growth factor binding protein-2 construct. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211(3): 707-13.

- ◆ Cornelissen M., Philippé J., De Sitter S., De Ridder L. Annexin V expression in apoptotic peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation. *Apoptosis* 2002; 7: 41-47.
- ◆ Cory S., Adams J.M. The bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 647-656.
- ◆ Corzo C., Petzold M., Mayol X., Espinet B., Salido M., Serrano S., Real F.X., Sole F. RxFISH karyotype and MYC amplification in the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 425-6.
- ◆ Cristóbal I., Quevedo P. Diagnóstico de certeza. En: Díaz-Rubio E., Escudero M., editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, S.A.; 1998. P. 95-130.
- ◆ Cyr M.G., Moulton A.W. Terapia de reposición hormonal y riesgo de cáncer de mama. En: Bland K.I., Copeland III E.M. editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000. P. 1495-1508.
- ◆ Chacón J.I., Álvarez A. Tratamiento neoadyuvante. En: Lombardía J., Rodríguez I., Carreira M.C., editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon S.A.; 2002. P.343-348.
- ◆ Chadderton A., Villeneuve D.J., Gluck S., Kirwan-Rhude A.F., Gannon B.R., Blais D.E. Role of specific apoptotic pathways in the restoration of paclitaxel-induced apoptosis by valspodar in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 231-244.
- ◆ Chantret I., Chevalier G., Dussaulx E., Zweibaum A. A and H blood group antigens as markers of sucrase-isomaltase from the enterocyte-like differentiated human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2. *Cancer Res* 1987; 47(5): 1426-33.

- ◆ Chen ST, Pan TL, Tsai YC, Huang CM. Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Letters* 2002; 181: 95-107.
- ◆ Chen W.J., Chang C.Y., Lin J.K. Induction of G₁ phase arrest in MCF-7 human breast cancer cells by pentagalloylglucose through the down-regulation of CDK4 and CDK2 activities and up-regulation of the CDK inhibitors p27^{Kip} and p21^{Cip}. *Biochemical Pharmacology* 2003; 65: 1777-1785.
- ◆ Chen X., Lowe M., Herliczek T., Hall M.J., Danes C., Lawrence D.A., Keyomarsi K. Protection of Normal Proliferating Cells Against Chemotherapy by Staurosporine-Mediated, Selective, and Reversible G₁ Arrest. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92: 1999-2008.
- ◆ Chen Y.Q., Hsieh J.T., Yao F., Fang B., Pong R.C., Cipriano S.C., Kreplut F. Induction of apoptosis and G₂/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 1999; 18: 2747-2754.
- ◆ Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. FADD, a novel death domain-containing protein interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81: 505-512.
- ◆ Chung H.H., Benson D.R., Schultz P.G. Probing the structure and mechanism of Ras protein with an expanded genetic code. *Science* 1993; 259: 806-809.
- ◆ Dahiya R., Deng G. Molecular prognostic markers in breast cancer. *Breast cancer Research and Treatment* 1998; 52: 185-200.
- ◆ Dang C.V., Lewis B.C. Role of Oncogenic Transcription Factor c-Myc in Cell Cycle Regulation, Apoptosis and Metabolism. *J Biomed Sci* 1997; 4(6): 269-278.
- ◆ Dang C.V., Resar L.M., Emison E., Kim S., Li Q., Prescott J.E., Wonsey D., Zeller K. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res* 1999; 253(1): 63-77.

- ◆ Dash B. C., El-Deiry W. S. Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. *Methods Mol Biol* 2004; 280: 99-161.
- ◆ Denmeade S.R., McCloskey D.E., Hahm H.A., Isaacs J.T., Davidson N.E. Apoptosis in hormone-responsive malignancies. En: Kaufmann S.H. editors. 1^a ed. San Diego. Academic Press. Apoptosis: pharmacological implications and therapeutic opportunities. *Advances in Pharmacology* 1997; 41: 553-614.
- ◆ Denny W.A. Prodrug strategies in cancer therapy. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2001; 36: 577-595.
- ◆ Dignass A. U. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7(1): 68-77.
- ◆ Eberhart C.E., Coffey R.J., Radhika A., Giardiello F.M., Ferrenbach S., Dubois R.N. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1997; 107: 1183-1188.
- ◆ Ekert P.G., Read S.H., Silke J., Marsden V.S., Kaufmann H., Hawkins C.J., Gerl R., Kumar S., Vaux D.L. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol* 2004; 165: 835-842.
- ◆ Elledge R.M., Allred D.C. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 52: 79-98.
- ◆ Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.
- ◆ Engle M. J., Alpers D. H. The two mRNAs encoding rat intestinal alkaline phosphatase represent two distinct nucleotide sequences. *Clin Chem* 1992; 38(12): 2506-9.
- ◆ Evan I.G., Vousden K.H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 2001; 411: 342-347.

- ◆ Falcón O., Falcón O. Cáncer de mama. Generalidades. En: Lombardía J., Rodríguez I., Carreira M.C, editors. La mama paso a paso. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon S.A.; 2002. P.253-258.
- ◆ Fan M. Z., Stoll B., Jiang R., Burrin D. G. Enterocyte digestive enzyme activity along the crypt-villus and longitudinal axes in the neonatal pig small intestine. *J Anim Sci* 2001; 79(2): 371-81.
- ◆ Faust M., Kartarius S., Schwindling S.L., Montenarh M. Cyclin H is a new binding partner for protein kinase CK2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 296: 13-19.
- ◆ Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
- ◆ Fernández A., Salas F., Feu J., Grases P.J., López L. Anatomía de la mama normal. En: Fernández A. et al., editors. Mastología. 2ª ed. Barcelona: Masson S.A.; 2000. P. 31-52.
- ◆ Figueiredo-Pereira M.E., Chen W.E., Li J., Johdo O. The Antitumor Drug Aclacinomycin A, Which Inhibits the Degradation of Ubiquitinated Proteins, Shows Selectivity for the Chymotrypsin-like Activity of the Bovine Pituitary 20 S Proteasome. *J Biol Chem* 1996; 271: 16455-16459.
- ◆ Fogh J. Human tumor cells in vitro. New York and London: Plenum Press 1975; 115-59.
- ◆ Fowble B., Roser C., Hanlon A. Cirugía conservadora y radioterapia para el cáncer de mama estadio I y II. En: Bland K.I., Copeland III E.M. editors. La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000. P. 1190-1197.
- ◆ Fridman J.S., Lowe S.W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22: 9030-9040.
- ◆ Fuse E., Kuwabara T., Sparreboom A., Sausville E., Figg W. Review of UCN-01 Development: A lesson in the Importance of Clinical

Pharmacology. The Journal of Clinical Pharmacology 2005; 45: 394:403.

- ◆ Gadbois D.M., Hamaguchi J.R., Swank R.A., Bradbury E.M. Staurosporine is a potent inhibitor of p34cdc2 and p34cdc2-like kinases. Biochem Biophys Res Commun 1992; 184(1): 80-5.
- ◆ Gali-Muhtasib H., Bakkar N. Curr Cancer Drugs Targets 2002; 2: 309.
- ◆ García E. Embriología y Anatomía. En: Lombardía J., Rodríguez I., Carreira M.C., editors. La mama paso a paso. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon S.A.; 2002. P. 3-9.
- ◆ García-Porrero J. A., Hurlé J. M. Anatomía humana. McGraw-Hill-Interamericana de España, S. A. U., Madrid, 2005.
- ◆ Gardner R.J.M., Kool D., Edkins E., Walpole I.R., Macrae F.A., Nasioulas S., Scott W.J.H. The clinical correlates of a 3' truncating mutation (codons 1982-1983) in the adenomatous polyposis gene. Gastroenterology 1997; 113: 326-331.
- ◆ Garret M.D., Workman P. Millennium review. Discovering novel chemotherapeutic drugs for the third millennium. Eur J Cancer 1999; 35: 2010-2030.
- ◆ Garrido F., López M.A. Inmunología e inmunoterapia para ginecólogos oncólogos. 1ªed. Madrid: SEGO; 2000. P. 59-132
- ◆ Georgiev I. P., Georgieva T. M., Pfaffl M., Hammon H. M., Blum J. W. Insulin-like growth factor and insulin receptors in intestinal mucosa of neonatal calves. J Endocrinol 2003; 176(1): 121-32.
- ◆ Germain R.N., Margulies D.H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. Annu Rev Immunol 1993; 11: 403-450.
- ◆ Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan A. P., Blumenstock C., Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. Nature 1998; 391(6665): 357-62.

- ◆ Golsteyn R.M. Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle. *Cancer Letters* 2005; 217: 129-138.
- ◆ Gooch J.L., Yee D. Strain-specific differences in formation of apoptotic DNA ladders in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Letters* 1999; 144: 31-37.
- ◆ Goodrich D.W., Lee W.H. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155(1): 43-61.
- ◆ Goulb T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-537.
- ◆ Greenblatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M., Harris C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research* 1994; 54: 4855-4878.
- ◆ Grem J.L., Nguyen D., Monahan B.P., Kao V., Geoffroy F.J. Sequence-dependent antagonism between fluorouracil and paclitaxel in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 477-486.
- ◆ Greten F.R., Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett* 2004; 206: 193-199.
- ◆ Grewal R., Mahmood A. Coordinated secretion of alkaline phosphatase into serum and intestine in fat-fed rats. *Indian J Gastroenterol* 2004; 23(5): 175-7.
- ◆ Gronbaek K., Straten P.T., Ralfkiaer E., Ahrenkiel V., Andersen M.K., Hansen N.E., Zeuthen J., Hou-Jensen K., Guldborg P. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998; 92: 3018-3024.
- ◆ Guan R.J., Fu Y., Holt P.R., Pardee A.B. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* 1999; 116: 1063-1071.

- ◆ Guillén J.G., Smith A.J., La Calle J.P., Ruo L. Gastrointestinal polyposis syndromes. *Curr Probl Surg* 1999; 36: 219-223.
- ◆ Guinee V.F. Epidemiología del cáncer de mama. En: La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000. P.345-357.
- ◆ Hall J.M., Lee M.K., Newman B., Morrow J.E., Anderson L.A., Huey B., King M.C. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250(4988): 1684-9.
- ◆ Hamilton A., Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: A review of the literature on HER-2, p53 and Bcl-2. *Annals of Oncology* 2000; 11: 647-663.
- ◆ Hamilton S.R., Liu B., Parsons R.E., Papadopoulos N., Jen J., Powell S.M., Krush A.J., Berk T., Cohen Z., Tetu B., Burger P.C., Wood P., Ataqi F., Booker S.V., Petersen G.M., Offerhaus G.J.A., Tersmette A.C., Giardiello F.M., Vogelstein B., Kinzler K.W. The molecular basis of Turcot's Syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332: 839-847.
- ◆ Hanada M., Sugawara K., Kaneta K., Toda S., Nishiyama Y., Tomita K., Yamamoto H., Konishi M., Oki T. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiot* 1992; 45(11): 1746-52.
- ◆ Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- ◆ Hauri H. P., Sterchi E. E., Bienz D., Fransen J. A., Marxer A. Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 1985; 101(3): 838-51.
- ◆ He K.L., Ting A.T. A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(17): 6034-45.
- ◆ He Y., Chu S. H., Walker W. A. Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells. *J Nutr* 1993; 123(6): 1017-27.

- ◆ Hedge I., Qi R. Microarray overview I. *BioTechniques* 2000; 29: 548-62.
- ◆ Hemminki A., Markie D., Tomlinson I., Avizienyte E., Roth S., Loukola A., Bignell G., Warren W., Aminoff M., Hoglund P., Jarvinen H., Kristo P., Pelin K., Ridanpaa M., Salovaara R., Bodmer W., Olschwang S., Olsen A.S., Stratton M.R., de la Chapelle A., Aaltonen L.A. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998; 391: 184-187.
- ◆ Hemminki A. The molecular basis and clinical aspects of Peutz-Jeghers syndrome. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 735-750.
- ◆ Herold C., Ganslmayer M., Ocker M., Herrmann M., Geerts A., Hahn E.G., Schuppan D. Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J Hepatol* 2002; 36: 233-240.
- ◆ Hinnebusch B. F., Ma Q., Henderson J. W., Siddique A., Archer S. Y., Hodin R. A. Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. *J Gastrointest Surg* 2002; 6(3): 403-9.
- ◆ Hirata K., Horie T. Stimulation of intestinal epithelial restitution by prostaglandin E(1) analogue. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51(3): 216-20.
- ◆ Hoheisel J.D., Diehl F., Scheideler M., Hauser N., Aign V., Matysiak S., Beier M. Improving DNA-Chip Technology Chemical Aspects. *Functional Genome Analysis, Deutsches Krebsforschungszentrum* 2001: 1-9.
- ◆ Holbro T., Civenni G., Hynes N.E. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research* 2003; 284: 99-110.
- ◆ Houde M., Laprise P., Jean D., Blais M., Asselin C., Rivard N. Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* 2001; 276(24): 21885-94.
- ◆ Howe J.R., Mitros F.A., Summers R.W. The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 751-756.

- ◆ Hsu H., Xiong J., Goeddel D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995; 81: 495-504.
- ◆ Ikegaki N., Katsumata M., Minna J., Tsujimoto Y. Expression of bcl-2 in small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 1994; 54: 6-8.
- ◆ Ishikawa T., Zhang S.S., Qin X., Takahashi Y., Oda H., Nakatsuru Y., Ide F. DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models. *Cancer Sci* 2004; 95(2): 112-7.
- ◆ Isselbacher K.J., Braunwald E., Wilson J.D., Martín J.B., Fauci A.S., Kasper D.L. Harrison: Principios de Medicina Interna. 13ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España; 1994. P. 2089-2104.
- ◆ Jasleen J., Ashley S. W., Shimoda N., Zinner M. J., Whang E. E. Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro. *Dig Dis Sci* 2002; 47(5): 1135-40.
- ◆ Jazaeri A.A., Yee C.J., Sotiriou C., Brantley K.R., Boyd J., Liu E.T. Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(13): 990-1000.
- ◆ Jeffrey R., Gerald L., James S., Edwin C., Mark A., Nick L. Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2003; 3(5): 573-585.
- ◆ Jehle P. M., Fussgaenger R. D., Blum W. F., Angelus N. K., Hoefflich A., Wolf E., Jungwirth R. J. Differential autocrine regulation of intestine epithelial cell proliferation and differentiation by insulin-like growth factor (IGF) system components. *Horm Metab Res* 1999; 31(2-3): 97-102.
- ◆ Jenne D.E., Reimann H., Nezu J., Friedel W., Loff S., Jeschke R., Muller O., Back W., Zimmer M. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 1998; 18: 38-43.
- ◆ Jimeno A. Fármacos moduladores del ciclo celular. Programa de Desarrollo de Nuevas Drogas. Sydney Kimmel Comprehensive Cancer Center. Universidad Johns Hopkins, Baltimore 2005.

- ◆ Joe A.K., Liu H., Suzui M., Vural M.E., Xiao D., Weinstein I.B. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 893-903.
- ◆ Johnson G.L., Lapadat R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science* 2002; 298(5600): 1911-1912.
- ◆ Johnson K.R., Wang L., Miller M.C., Willingham M.C., Fan W. 5-Fluorouracil interferes with paclitaxel cytotoxicity against human solid tumour cells. *Clin Cancer Res* 1997; 10: 1739-1745.
- ◆ Jonson K.A., Kramer B.S., Anderson M.J. Tratamiento sistémico adyuvante del cáncer de mama. En: Bland K.I., Copeland III E.M. editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2003. P. 1215-1254.
- ◆ Junqueira L. C., Carneiro J. *Histología básica. Texto y atlas*. Masson, S.A., Barcelona, 4ª edición, 1996.
- ◆ Kallakury B.V., Figge J., Leibovich B., Hwang J., Rifkin M., Kaufman R., Figge H.L., Nazeer T., Ross J.S. Increased bcl-2 protein levels in prostatic adenocarcinomas are not associated with rearrangements in the 2.8 kb major breakpoint region or with p53 protein accumulation. *Mod Pathol* 1996; 9: 41-47.
- ◆ Kerr J.F.R., Winterford C.M., Harmon B.V. Apoptosis its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013-2026.
- ◆ Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972; 26: 239-257.
- ◆ Kim J. W., Adachi H., Shin-ya K., Hayakawa Y., Seto H. Apoptolidin, a new apoptosis inducer in transformed cells from *Nocardiosis* sp. *J Antibiotics* 1997; 50(7): 628- 30.

- ◆ King J.E., Dozois R.R., Lindor N.M. Care of patients and their families with familial adenomatous polyposis. *May Clin Proc* 2000; 75: 57-67.
- ◆ Kirkin V., Joos S., Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1644: 229-249.
- ◆ Kitagawa M., Higashi H., Takahashi I.S., Okabe T., Ogino H., Taya Y., Hishimura S., Okuyama A. A cyclin-dependent kinase inhibitor, butyrolactone I, inhibits phosphorylation of RB protein and cell cycle progression. *Oncogene* 1994; 9(9): 2549-57.
- ◆ Ko L.J., Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10: 1054-1072.
- ◆ Kojima H., Hidaka H., Matsumura K., Fujita Y., Nishio Y., Maegawa H., Haneda M., Yasuda H., Fujimiya M., Kikkawa R., Kashiwagi A. Concerted regulation of early enterocyte differentiation by insulin-like growth factor I, insulin, and transforming growth factor-beta1. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110(3): 197-206.
- ◆ Korinek V., Barker N., Moerer P., van Donselaar E., Huls G., Peters P. J., Clevers H. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998; 19(4): 379-83.
- ◆ Krajewski S., Krajewska M., Turner B.C., Pratt C., Howard B., Zapata J.M. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 1999; 6: 29-40.
- ◆ Krengel U.I., Schlichting A., Scherer R., Schumann M., Frech M., John J., Kabsch W., Pai B.F., Wittinghofer A. Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* 1990; 62: 539-548.
- ◆ Kumagai H., Sato N., Yamada M., Mahony D., Seghezzi W., Lees E., Arai K., Masai H. A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(7): 5083-95.

- ◆ Kuo S-M., Morehouse Jr. H.F., Lin C-P. Effect of antiproliferative flavonoids on ascorbic acid accumulation in human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Letters* 1997; 116: 131-137.
- ◆ Kuo S-M. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letters* 1996; 110: 41-48.
- ◆ Kuratko C.N., Constante B.J. Linoleic acid and tumor necrosis factor- α increase manganese superoxide dismutase activity in intestinal cells. *Cancer Letters* 1998; 130: 191-196.
- ◆ Laken S.J., Petersen G.M., Gruber S.B., Oddoux C., Ostrer H., Giardiello F.M., Hamilton S.R., Hampel H., Markowitz A., Klimstra D., Jhanwar S., Winawer S., Offit K., Luce M.C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 1997; 17: 79-83.
- ◆ Lane D.P. The p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 359: 15-16.
- ◆ Lane D.P., Lu X., Hupp T., Hall P.A. The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 345: 277-280.
- ◆ Lanzós E. Papel de la radioterapia. En: Díaz-Rubio E., Escudero M., editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, S.A.; 1998. P. 131-140.
- ◆ Larrad A. Fisiología y evolución madurativa de la mama. En: Lombardía J., Rodríguez I., Carreira M.C., editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon S.A.; 2002. P.11-18.
- ◆ Lauwers G.Y., Scott G.V., Karpeh M.S. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer* 1995; 75: 2209-2213.
- ◆ Le Du M. H., Millan J. L. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49808-14.

- ◆ Lee C. S., Kaestner K. H. Clinical endocrinology and metabolism. Development of gut endocrine cells. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18(4): 453-62.
- ◆ Leedham S. J., Brittan M., McDonald S. A., Wright N. A. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med* 2005; 9(1): 11-24.
- ◆ Leek R.D., Kaklamanis L., Pezzella F., Gatter K.C., Harris A.L. bcl-2 in normal human breast and carcinoma, association with oestrogen receptor-positive, epidermal growth factor receptor-negative tumours and in situ cancer. *Br J Cancer* 1994; 69: 135-139.
- ◆ Lester S., Ramzy S., Cotran R. La mama femenina. En: Robbins D., editors. *Patología estructural y funcional*. 6^a ed. México: Editorial Interamericana S.A.; 1999. P. 1137-1139.
- ◆ Lesuffleur T., Barbar A., Dussaulx E., Zweibaum A. Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res* 1990; 50: 6334-43.
- ◆ Levenson A.S., Jordan V.C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research* 1997; 57: 3071-3078.
- ◆ Lewis J.S., Meeke K., Osipo C., Ross E.A., Kidawi N., Li T., Bell E., Chandel N.S., Jordan V.C. Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(23): 1746-59.
- ◆ Ligueros M., Jeung D., Tang B., Hochhauser D., Reidenberg M.M., Sonenberg M. Gossypol inhibition of mitosis, cyclin D1 and Rb protein in human mammary cancer cells and cyclin-D1 transfected human fibrosarcoma cells. *British Journal of cancer* 1997; 76(1): 21-28.
- ◆ Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocrine-Related Cancer* 1999; 6: 13-16.
- ◆ Liu L., Han L., Wong D. Y., Yue P. Y., Ha W. Y., Hu Y. H., Wang P. X., Wong R. N. Effects of Si-Jun-Zi decoction polysaccharides on cell

- migration and gene expression in wounded rat intestinal epithelial cells. *Br J Nutr* 2005; 93(1): 21-9.
- ◆ Liu Z., Lu X., Zhong S. ASPP: Apoptotic specific regulator of p53. *Biochimica et biophysica acta* 2005; 1756: 77-80.
 - ◆ Logan C. Y., Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 781-810.
 - ◆ Lohrisch C., Piccart M. HER2/neu as a predictive factor in breast cancer. *Clinical Breast Cancer* 2001; 2: 129-135.
 - ◆ Lombardía J., Fernández M.L. La mama durante el embarazo y la lactancia. Cuidados especiales. En: Lombardía J., Rodríguez I., Carreira M.C., editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon S.A.; 2002. P. 177-181.
 - ◆ López F., Rodríguez J. Diagnóstico precoz del cáncer de mama. Papel del médico de atención primaria. En: Lombardía J., Rodríguez J., Carreira M.C., editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon S.A.; 2002. P. 267-276.
 - ◆ López L.J., Roldán M.J. Factores pronóstico. En: Lombardía J., Rodríguez I., Carreira M.C., editors. *La mama paso a paso*. 1ª ed. Madrid. Ediciones Ergon S.A.; 2002. P.315-320.
 - ◆ Lu Q.L., Elia G., Lucas S., Thomas J.A. Bcl-2 proto-oncogene expression in Epstein-Barr-virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 53: 29-35.
 - ◆ Lukas J., Lukas C., Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* 2004; 3(8-9): 997-1007.
 - ◆ Lundberg A.S., Weinberg R.A. Control of cell cycle and apoptosis. *European Journal of Cancer* 1999; 35(14): 1886-1894.
 - ◆ Luo X., He Q., Huang Y., Sheikh M. S. Transcriptional upregulation of PUMA modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced

apoptosis via Bax activation. *Cell death and differentiation* 2005; 12: 1310-1318.

- ◆ Lynch H.T., Smyrk T.C., Watson P., Lanspa S.J., Lynch J.F., Lynch P.M., Cavalieri R.J., Boland C.R. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104: 1535-1549.
- ◆ MacCarthy D.O., Glowacki N., Schell K., Emler C.A., Albertini M.R. Antigenicity of human melanoma cells transfected to express the B7-1 co-stimulatory molecule (CD80) varies with the level of B7-1 expression. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2000; 49 (2): 85-93.
- ◆ Macgregor P.F., Squire J.A. Application of Microarrays to the Analysis of Gene Expression in Cancer. *Clinical Chemistry* 2002; 48: 1170-1177.
- ◆ Madison B. B., Braunstein K., Kuizon E., Portman K., Qiao X. T., Gumucio D. L. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 2005; 132(2): 279-89.
- ◆ Magnaldo T. Xeroderma pigmentosum: from genetics to hopes and realities of cutaneous gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2004; 4(2): 169-179.
- ◆ Malumbres M., Barbacid M. To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1: 222-231.
- ◆ Man A. L., Prieto-Garcia M. E., Nicoletti C. Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? *Immunology* 2004; 113(1): 15-22.
- ◆ Marchal J.A., Boulaiz H., Suárez I., Saniger E., Campos J., Carrillo E. Growth inhibition, G₁-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by novel highly lipophilic 5-fluorouracil derivatives. *Investigational New Drugs* 2004; 22: 379-389.
- ◆ Mariadason J. M., Nicholas C., L'Italien K. E., Zhuang M., Smartt H. J., Heerdt B. G., Yang W., Corner G. A., Wilson A. J., Klampfer L., Arango D., Augenlicht L. H. Gene expression profiling of intestinal

epithelial cell maturation along the crypt-villus axis. *Gastroenterology* 2005; 128(4): 1081-8.

- ◆ Márquez A., Alba E. Cáncer de mama avanzado: tratamiento quimioterápico. En: Díaz-Rubio E., Escudero M., editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, S.A.; 1998. P. 201-214.
- ◆ Márquez M., Ordi J. Histología de los órganos genitales y de la mama. En: Cabero L., editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2003. P. 39-49.
- ◆ Martín P. G., Soto J. M. *Enfermería Anatómo-fisiológica*. Masson-Salvat, Barcelona, 1994.
- ◆ Martínez J.C. Biología molecular y cáncer. En: Herruzo A.J., Rodríguez-Escudero F.J., Comino R., editors. *Avances en Oncología Ginecológica y Mamaria*. 1ª ed. Granada. Proyecto Sur de Ediciones; 1995. P. 15-25.
- ◆ Massey-Harroche D. Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microsc Res Tech* 2000; 49(4): 353-62.
- ◆ McCormack S. A., Blanner P. M., Zimmerman B. J., Ray R., Poppleton H. M., Patel T. B., Johnson L. R. Polyamine deficiency alters EGF receptor distribution and signaling effectiveness in IEC-6 cells. *Am J Physiol* 1998; 274(1 Pt 1): C192-205.
- ◆ McGee D. W., Elson C. O., McGhee J. R. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect Immun* 1993; 61(11): 4637-44.
- ◆ McKnight J.J., Gray S.B., O'Kane H.F., Johnston S.R., Williamson K.E. Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer. *J Urol* 2005; 173: 683-690.
- ◆ Melino G., Bernassola F., Ranalli M., Yee K., Zong W.X., Corazzari M., Knight R.A., Green D.R., Thompson C., Vousden K.H. p73 Induces

- apoptosis via PUMA transactivation and BAX mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 2004; 279: 8076-83.
- ◆ Meijer L., Borgne A., Mulner O., Chong J.P., Blow J.J., Inagaki N., Inagaki M., Delcros J.G., Moulinoux J.P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997; 243(1-2): 527-36.
 - ◆ Menke C.H., Villanova J., Cavalheiro J.A., Cericatto R., Goldberg E. Tratamiento quirúrgico del cáncer de mama y mamoplastia oncológica. En: Pérez López F.R., editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P.195-206.
 - ◆ Meyn R.E., Stephens L.C., Hunter N.R., Milas L. Kinetics of cisplatin-induced apoptosis in murine mammary and ovarian adenocarcinomas *Int .J. Cancer* 1995; 60: 725-729.
 - ◆ Middelburg R., de Haas R.R., Dekker H., Kerkhoven R.M., Pohlmann P.R., Fuentes-Albuero A., Mohar A., Pinedo H.M., Lankelma J. Induction of p53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis Messenger RNA by Chemotherapeutic Treatment of Locally Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 1863-1869.
 - ◆ Milas L., Hunter N.R., Kurdoglu B., Mason K.A., Meyn R.E., Stephens L.C. Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol *J. Cancer Chemoth and Pharm* 1995; 35:297-303.
 - ◆ Miller L.D., Long P.M., Wong L., Mukherjee S., McShane L.M., Liu E.T. Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell* 2002; 2: 353-361.
 - ◆ Moreno J., Rodríguez-Escudero F.J. Otras terapéuticas oncológicas: citostáticos, radioterapia, otras radiaciones ionizantes. En: Cabero L., editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2003. P.1825-1834.

- ◆ Nakano K., Vousden K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-94.
- ◆ Nigg E.A. Mitotic Kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 9: 168-173.
- ◆ Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H., Tamai K., Tokino T., Nakamura Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000; 102: 849-862.
- ◆ Ohki R., Nemoto J., Murasawa H., Oda E., Inazawa J., Tanaka N., Taniguchi T. Reprimo, a New Candidate Mediator of the p53-mediated Cell Cycle Arrest at the G₂ Phase. *J Biol Chem* 2000; 275: 22627-22630.
- ◆ Okamura S., Arakawa H., Tanaka T., Nakanishi H., Ng C.C., Taya Y., Monden M., Nakamura Y. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell*. 2001; 8(1): 85-94.
- ◆ Olashaw N., Pledger W.J. Paradigms of growth control: relation to cdk activation. *Signal Transduction Knowledge Environment* 2002; 7.
- ◆ Osborn J. A review of radioactive and non-radioactive-based techniques used in life science applications. Part I: Blotting techniques. *Innovations Forum Life Science News* 6, Amersham Pharmacia Biotech 2000: 1-4.
- ◆ Osborne C., Wilson P., Tripathy D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: Potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist* 2004; 9: 361-377.
- ◆ Osborne C.K., Ravdin P.M. Adjuvant systemic therapy of primary breast cancer. En: Harris J.R., Lippman M.E., Morrow M. *Diseases of the breast*. 2^a ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2000. P. 599-632.
- ◆ Ostrakhovitch E.A., Cherian M.G. Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis* 2005; 10: 111-121.

- ◆ Owen-Schaub L.B., van Golen K.L., Hill L.L., Price J.E. Fas and Fas ligand interactions suppress melanoma lung metastasis. *J Exp Med* 1998; 188: 1717-1723.
- ◆ Pacheco C., Tejada A., Moreno L. Nuestra experiencia con el tratamiento conservador del cáncer de mama. En: Pérez López F.R., editors. *Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento*. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P.175-186.
- ◆ Papazisis K. T., Geromichalos G. D., Dimitriadis K. A.m Kortsaris A.H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *J Immunol Methods* 1997;208 (2): 151-8.
- ◆ Park E.J., Kim J.H., Seong R.H., Kim C.G., Park S.D., Hong S.H. Characterization of a novel mouse cDNA, ES18, involved in apoptotic cell death of T-cells. *Nucleic Acids Research* 1999; 27: 1524-1530.
- ◆ Parone P.A., James D., Martinou J.C. Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie* 2002; 84: 105-111.
- ◆ Parsons R., Li G.M., Longley M., Modrich P., Liu B., Berk T., Hamilton S.R., Kinzler K.W., Vogelstein B. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science* 1995; 268: 738-740.
- ◆ Pérez P., Martín M. Tratamiento sistémico adyuvante en cáncer de mama precoz. En: Díaz-Rubio E, Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, S.A.; 1998. P. 141-155.
- ◆ Piera J. Cáncer de mama avanzado: tratamiento hormonoterápico. En: Díaz-Rubio E., Escudero M, editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, S.A.; 1998. P. 189-200.
- ◆ Pierkarz R.L., Robey R., Sandor V., Bakke S., Wilson W.H., Dahmouch L., Kingma D.M., Turner M.L., Altemus R., Bates S.E. Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood* 2001; 98 (9): 2865-2868.

- ◆ Pinto D., Gregorieff A., Begthel H., Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003; 17(14): 1709-13.
- ◆ Pinto M., Appay M. D., Simon-Assmann P., Chevalier G., Dracopoli N., Fogh J., Zweibaum A. Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol. Cell* 1982; 44: 193-196.
- ◆ Plaschke J., Kruger S., Dietmaier W., Gebert J., Sutter C., Mangold E., Pagenstecher C., Holinski-Feder E., Schulmann K., Moslein G., Ruschoff J., Engel C., Evans G., Schackert H.K. Eight novel MSH6 germline mutations in patients with familial and nonfamilial colorectal cancer selected by loss of protein expression in tumor tissue. *Hum Mutat* 2004; 23(3): 285.
- ◆ Ponder B. Genetic testing for cancer risk. *Science* 1997; 278(5340): 1050-4.
- ◆ Popovich N. Mediated electrochemical detection of nucleic acids for drug discovery and clinical diagnostics. *IVD Technology* 2001; 7: 36-42.
- ◆ Porter E. M., Bevins C. L., Ghosh D., Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(1): 156-70.
- ◆ Posey S.C., Bierer B.E. Actin Stabilization by Jasplakinolide Enhances Apoptosis Induced by Cytokine Deprivation. *J Biol Chem* 1999; 274: 4259-4265.
- ◆ Potten C., Wilson J. Apoptosis. The life and death of cells. Cambridge University Press, Cambridge, 2004.
- ◆ Pozo-Guisado E., Álvarez-Barrientos A., Mulero-Navarro S., Santiago-Josefat B., Fernández-Salguero P.M. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64: 1375-1386.
- ◆ Pringault E., Robine S., Louvard D. Structure of the human villin gene. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1991; 88(23): 10811-5.

- ◆ Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998; 95: 5-8.
- ◆ Pronk G.J., Bos J.L. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1198: 131-147.
- ◆ Puthalakath H., Villunger A., O'Reilly L.A., Beaumont J.G., Coultas L., Cheney R.E., Huang D.C.S., Strasser A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*. 2001; 293(5536): 1829-32.
- ◆ Quaroni A., Wands J., Trelstad R. L., Isselbacher K. J. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 1979; 80(2): 248-65.
- ◆ Rae C., MacEwan D.J. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-3 increase expression of type II tumour necrosis factor receptor, increasing susceptibility to tumour necrosis factor-induced apoptosis. Control of leukaemia cell life/death switching. *Cell Death Differ.* 2004; 2: 162-71.
- ◆ Ramachandran A., Madesh M., Balasubramanian K. A. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(2): 109-20.
- ◆ Ramjaun A.R., Tomlinson S., Eddaoudi A., Downward J. Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGFbeta-induced apoptosis. *Oncogene*. 2006 Aug 14.
- ◆ Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y., Li Y., Sawai H., Reed J.C., Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275: 967-969.
- ◆ Rasbridge S.A., Gillett C.E., Seymour A.M., Patel K., Richards M.A., Rubens R.D. The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma. *British Journal Cancer* 1994; 70: 335-341.

- ◆ Richardson L.L., Pedigo C., Ann H.M. Expresión of deoxyribonucleic acid repair enzymes during spermatogenesis in mice. *Biol Reprod* 2000; 62: 789-796.
- ◆ Rodríguez J.R., Rodríguez J.R. Ciclo celular. Bases de la quimioterapia. En: Herruzo A.J., Menjón S., Rodríguez-Escudero F.J. Avances y controversias en Ginecología oncológica en 1998. 1ª ed. Granada. Proyecto Sur de Ediciones S.L.; 2000. P. 21-68.
- ◆ Rodríguez-Serrano F., Marchal J.A., Ríos A., Martínez-Amat A., Boulaiz H., Prados J., Perán M., Caba O., Carrillo E., Hita F., Aránega A. Exogenous nucleosides modulate proliferation of IEC-6 intestinal epithelial cell line. *Journal of Nutrition* 2006:000.
- ◆ Román J.M. La cirugía en el cáncer de mama: desde la mastectomía hasta el tratamiento conservador. En: Díaz-Rubio E., Escudero M., editors. *Cáncer de mama*. 1ª ed. Madrid: International Marketig & Communications, S.A.; 1998. P.121-130.
- ◆ Rommel C., Hafen E. Ras: a versatile cellular switch. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 412-418.
- ◆ Romrell L.J., Bland K.I. Anatomía de la mama, la axila, la pared torácica y sitios metastásicos relacionados. En: *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000. P.19-37.
- ◆ Ronen A., Glickman B.W. Human DNA Repair Genes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2001; 37: 241-283.
- ◆ Rosenbloom A.L. Fisiología de la glándula mamaria: desarrollo y función normales y anormales. En: *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000. P.38-50.
- ◆ Rosenwald A., Wright G., Chan W.C., Connors J.M., Campo E., Fisher R.I. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1937-1947.

- ◆ Ross M. H., Kaye G. I., Pawlina W. Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. Editorial Panamericana, Buenos Aires, 2005.
- ◆ Rousset M., Laburthe M., Pinto M., Chevalier G., Rouyer-Fessard C., Dussaulx E., Trugnan G., Boige N., Brun J. L., Zweibaum A. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2: modulation by forskolin. *J Cell Physiol* 1985; 123(3): 377-85.
- ◆ Ruiz E. Manual de patología mamaria. 1ª ed. Barcelona: Editorial JIMS S.A.; 1993.
- ◆ Russo J., Russo I.H. Desarrollo y aspectos patogenéticos del cáncer de mama humano. En: Pérez López F.R., editors. Cáncer de mama: biología, diagnóstico y tratamiento. 1ª ed. Zaragoza. SEISGE, 2000. P. 7-16.
- ◆ Ryan Q.C., Headlee D., Acharya M., Sparreboom A., Trepel J.B., Ye J., Figg W.D., Hwang K., Chung E.J., Murgo A., Melillo G., Elsayed Y., Monga M., Kalnitskiy M., Zwiebel J., Sausville E.A. Phase I and Pharmacokinetic Study of MS-275, a Histone Deacetylase Inhibitor, in Patients With Advanced and refractory solid tumors or Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23 (17): 3912-3922.
- ◆ Samuels-Lev Y., O'Connor D.J., Bergamaschi D., Trigiante G., Hsieh J.K., Zhong S., Campargue I., Naumovski L., Crook T., Lu X. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*. 2001; 4: 781-94.
- ◆ Sancho E., Batlle E., Clevers H. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 763-70.
- ◆ Sancho E., Batlle E., Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 695-723.
- ◆ Sandhu C., Garbe J., Bhattacharya N., Daksis J., Pan Ch., Yaswen P., Koh J., Slingerland J.M., Stampfer M.R. Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes,

and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(5): 2458-67.

- ◆ Sandhu C., Slingerland J. Deregulation of the cell cycle in cancer. *Cancer Detection and Prevention* 2000; 24: 107-118.
- ◆ Saniger E., Campos J.M., Entrena A., Marchal J.A., Boulaiz H., Aránega A. Neighbouring-group participation as the key step in the reactivity of acyclic and cyclic salicyl-derived O,O-acetals with 5-fluorouracil. Antiproliferative activity, cell cycle dysregulation and apoptotic induction of new O,N-acetals against breast cancer cells. *Tetrahedron* 2003; (59): 8017-8026.
- ◆ Santonja J.J., Sanz E. Establecimiento y mantenimiento de la lactancia. En: Cabero L., editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2003. P. 462-471.
- ◆ Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 544(2-3); 99-106.
- ◆ Sato N., Nakano T., Kawakami H., Idota T. In vitro and in vivo effects of exogenous nucleotides on the proliferation and maturation of intestinal epithelial cells. *J Nutr Sci Vitaminol* 1999; 45(1): 107-18.
- ◆ Saunders D.E., Lawrence W.D., Christensen C., Wappler N.L., Ruan H., Deppe G. Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 1997; 70: 214-220.
- ◆ Schmidt K., Gust R., Jung M. Inhibitors of histone deacetylase suppress the growth of MCF-7 breast cancer cells. *Arch Pharm* 1999; 332: 353-357.
- ◆ Schneider J. Implicaciones pronósticas de la biología molecular en los tumores ginecológicos. En: Herruzo A.J., Rodríguez-Escudero F.J., Comino R., editors. *Avances en Oncología Ginecológica y Mamaria*. 1ª ed. Granada. Proyecto Sur de Ediciones; 1995. P. 39-56
- ◆ Schonhoff S. E., Giel-Moloney M., Leiter A. B. Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 2004; 145(6): 2639-44.

- ◆ Schulze A., Downward J. Navigating gene expression using microarrays - a technology review. *Nature Cell Biology* 2001; 3: E190-E195.
- ◆ Senderowicz A. M. Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs* 1999; 17(3): 313-20.
- ◆ Seton-Rogers S.E., Brugge J.S. ErbB2 and TGF-beta: a cooperative role in mammary tumor progression? *Cell Cycle* 2004; 3(5): 597-600.
- ◆ Shan B., Chang C.Y., Jones D., Lee W.H. The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression. *Mol Cell Biol* 1994; 14(1): 299-309.
- ◆ Shih C., Shilo M., Goldfarb A., Dannenberg A., Weinberg R.A. Passage of phenotype of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1979; 76: 5714-5718.
- ◆ Shibata D., Reale M.A., Lavin P., Silverman M., Fearon E.R., Steele G., Jessup J.M., Loda M., Summerhayes I.C. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; 335: 1727-1732.
- ◆ Ship M.A., Ross K.N., Tamayo P., Weng A.P., Kutok J.L., Aguiar R.C. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002; 8: 68-74.
- ◆ Sielecki TM, Boylan JF, Benfield PA, Trainor GL. Cyclin-dependent kinase inhibitors: Useful targets in cell cycle regulation. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000; 43(1): 1-18.
- ◆ Siles E., Villalobos M., Jones L., Guerrero R., Eady J.J., Valenzuela M.T., Nunez M.I., McMillan T.J., Ruiz de Almodovar J.M. Apoptosis after gamma irradiation. Is it an important cell death modality? *Br J Cancer* 1998; 78: 1594-1599.
- ◆ Simstein R., Burow M., Parker A., Weldon C., Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Experimental Biology and Medicine* 2003; 228(9): 995-1003.

- ◆ Slingerland J., Pagano M. Regulation of the Cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 183:10-17.
- ◆ Sonoyama K., Rutatip S., Kasai T. Gene expression of activin, activin receptors, and follistatin in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278(1): G89-97.
- ◆ Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. Aas T., Geisler S., Johnsen H. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874.
- ◆ Sosogi A., Gao F., Tomimatsu T., Hirata K., Horie T. Non-steroidal anti-inflammatory drugs affect the methotrexate transport in IEC-6 cells. *Life Sciences* 2003; 73(4): 437-446.
- ◆ Sotiriou C., Powles T.J., Dowsett M., Jazaeri A.A., Feldman A.L., Assersohn L. Gene expression profiles derived from needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4: R3.
- ◆ Soubeyran P., Andre F., Lissitzky J. C., Mallo G. V., Moucadel V., Roccabianca M., Rechreche H., Marvaldi J., Dikic I., Dagorn J. C., Iovanna J. L. Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* 1999; 117(6): 1326-38.
- ◆ Soule H., McGrath C.M. Immortal human mammary epithelial cell lines. U.S. Pat. 5,026,637 dated June 25, 1991.
- ◆ Spirio L., Olschwang S., Groden J., Robertson M., Samowitz W., Joslyn G., Gelbert L., Thliveris A., Carlson M., Otterud B., Lynch H., Watson P., Lynch P., Laurent-Puig P., Burt R., Hughes J.P., Thomas G., Leppert M., White R. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993; 75: 951-957.
- ◆ Stappenbeck T. S., Gordon J. I. Rac1 mutations produce aberrant epithelial differentiation in the developing and adult mouse small intestine. *Development* 2000; 127(12): 2629-42.

- ◆ Stattin P. Prognostic factors in prostate cancer. *Scand. J Urol Nephrol Suppl* 1997; 185: 1-46.
- ◆ Staunton M.J., Gaffney E.F. Basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122: 310-319.
- ◆ Stepanova E.V., Zagrekova E.I., Ermilova V.D., Turbin A.D., Petrovichev N.N., Vysotskaia I.V. Molecular-biological markers as prognostic factors in breast cancer of I-IIA stage. *Arkhiv Patologii* 2003; 65(3): 14-18.
- ◆ Strasser A., Harris A.W., Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991; 67: 889-899.
- ◆ Sturm A., Sudermann T., Schulte K. M., Goebell H., Dignass A. U. Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid. *Gastroenterology* 1999; 117(2): 368-77.
- ◆ Styblo T.M., Wood W.C. Factores pronósticos tradicionales para el cáncer de mama. En: *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2ª ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000. P.425-433.
- ◆ Suh E., Traber P. G. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 1996; 16(2): 619-25.
- ◆ Sun X., Rotenberg S.A. Overexpression of Protein Kinase C α in MCF-10A Human Breast Cells Engenders Dramatic Alterations in Morphology, Proliferation, and Motility. *Cell Growth and Differentiation* 1999; 10: 343-352.
- ◆ Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *The Lancet Oncology* 2004; 5: 27-36.
- ◆ Sympath D., Plunkett W. *Curr. Opin. Oncol* 2001; 13: 484.
- ◆ Tabel G., Hoa N. T., Tarnawski A., Chen J., Domek M., Ma T. Y. Helicobacter pylori infection inhibits healing of the wounded duodenal epithelium in vitro. *J Lab Clin Med* 2003; 142(6): 421-30.

- ◆ Takakashi R., Shimazaki C., Inaba T., Okano A., Hatsuse M., Okamoto A. A newly developed bisphosphonate, YM529, is a potent apoptosis inducer of human myeloma cells. *Leukemia Research* 2001; 25: 77-83.
- ◆ Tan T.L., Essers J., Citterio E., Swagemakers S.M., de Wit J., Benson F.E., Hoejmakers J.H., Kanaar R. Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol* 1999; 9: 325-328.
- ◆ Tanikawa C., Matsuda K., Fukuda S., Nakamura Y., Arakawa H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2003; 5(3): 216-23.
- ◆ Teitz T., Wei T., Valentine M.B., Vanin E.F., Grenet J., Valentine V.A., Behm F.G., Look A.T., Lahti J.M., Kidd V.J. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000; 6: 529-535.
- ◆ Thiébault K., Mazelin L., Pays L., Llambi F., Joly M., Scoazec J., Saurin J., Romeo G., Mehlen P. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100(7): 4173–4178.
- ◆ Thoreux K., Senegas-Balas F., Bernard-Perrone F., Giannarelli S., Denariáz G., Bouley C., Balas D. Modulation of proliferation, second messenger levels, and morphotype expression of the rat intestinal epithelial cell line IEC-6 by fermented milk. *J Dairy Sci* 1996; 79(1): 33-43.
- ◆ Tomasini R., Samir A.A., Carrier A., Isnardor D., Cecchinelli B., Soddu S., Malissen B., Dagorn J., Iovanna J.L., Duseti N.J. TP53INP1s and Homeodomain-interacting Protein Kinase-2 (HIPK2) Are Partners in Regulating p53 Activity. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 37722-37729.
- ◆ Tsujii M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-716.
- ◆ Tsujimoto Y. Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 1989; 4: 1331-1336.

- ◆ Tuhacek L. M., Mackey A. D., Li N., DeMarco V. G., Stevens G., Neu J. Substitutes for glutamine in proliferation of rat intestinal epithelial cells. *Nutrition* 2004; 20(3): 292-7
- ◆ Underwood J.M., Imbalzano K.M., Weaver V.M., Fischer A.H., Imbalzano A.N., Nickerson J.A. The ultrastructure of MCf-10A acini. *J Cell Physiol* 2006; 208(1): 141-8.
- ◆ Upperman J. S., Potoka D. A., Zhang X. R., Wong K., Zamora R., Ford H. R. Mechanism of intestinal-derived fungal sepsis by gliotoxin, a fungal metabolite. *J Pediatr Surg* 2003; 38(6): 966-70.
- ◆ Ursin G., London S., Stanczyk F.Z. A pilot study of urinary estrogen metabolites (16-OHE₁, and 2-OHE₁) in postmenopausal women with and without breast cancer. *Environ Health Perspect* 1997; 105 (Suppl 3): 601-5.
- ◆ van de Wetering M., Sancho E., Verweij C., de Lau W., Oving I., Hurlstone A., van der Horn K., Battle E., Coudreuse D., Haramis A. P., Tjon-Pon-Fong M., Moerer P., van den Born M., Soete G., Pals S., Eilers M., Medema R., Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002; 111(2): 241-50.
- ◆ van't Veer L.J., Dai H., Vand Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536.
- ◆ Vaux D.L. Toward an understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; 90: 786-789.
- ◆ Veronesi U. Cirugía conservadora y radioterapia en la enfermedad estadios I y II: la experiencia europea. En: Bland K.I., Copeland III E.M. editors. *La mama. Manejo multidisciplinario de las enfermedades benignas y malignas*. 2^a ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana S.A.; 2000. P. 1209-1214.

- ◆ Viallard J.F., Lacombe F., Belloc F., Pellegrin J.L., Reiffers J. Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire: aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/Radiother* 2001; 5: 109-129.
- ◆ Villunger A., Michalak E.M., Coultas L. p53 and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 2003; 302: 1036-8.
- ◆ Virtanen C., Honjoh D., Kimura M., Shimane M., Miyoshi T., Nomura H. Integrated classification of lung tumors and cell lines by expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12357-12362.
- ◆ Walters J. R. Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21(2): 135-40.
- ◆ Wallach D., Kovalenko A.V., Varfolomeev E.E., Boldin M.P. Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 279-288.
- ◆ Wang E., Miller L.D., Ohnmacht G.A., Mocellin S., Perez-Diez A., Petersen D. Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness. *Cancer Res* 2002; 62: 3581-3586.
- ◆ Wang S.C., Hung M.C. HER2 overexpression and cancer targeting. *Seminars in Oncology* 2001; 28 (Suppl 16): 115-124.
- ◆ Wang Y., Prywes R. Activation of the c-fos enhancer by the erk MAP kinase pathway through two sequence elements: the c-fos AP-1 and p62TCF sites. *Oncogene* 2000; 19(11): 1379-85.
- ◆ Wang Z., Chen W. W., Li R. L., Wen B., Sun J. B. Effect of gastrin on differentiation of rat intestinal epithelial cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2003; 9(8): 1786-90.
- ◆ Wang Z.J., Ellis I., Zauber P., Iwama T., Marchese C., Talbot I., Xue W.H., Yan Z.Y., Tomlinson I. Allelic imbalance at the LKB1 (SKT11) locus in tumours from patients with Peutz-Jeghers' syndrome provides evidence for a hamartoma-(adenoma)-carcinoma sequence. *J Pathol* 1999; 188: 9-13.

- ◆ Warri A.M., Houvinen R.L., Laine A.M., Martikainen P.M., Härkönen P.L. Apoptosis in toremifene-induced growth inhibition of human breast cancer cells in vivo and in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1412-1418.
- ◆ Winer E.P, Morrow M., Osborne C.K., Harris J.R. Cancer of the Breast. En: De vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A., editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6^a ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
- ◆ Wolpert S., Wong M. L., Bass B. L. Matrix alters the proliferative response of enterocytes to growth factors. *Am J Surg* 1996; 171(1): 109-12.
- ◆ Wong Y. W., Low M. G. Phospholipase resistance of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor on human alkaline phosphatase. *Clin Chem* 1992; 38(12): 2517-25.
- ◆ Wood R.D., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T. Human DNA Repair Genes. *Science* 2001; 5507 (291): 1284-1289.
- ◆ Wooster R. Cancer classification with DNA microarrays: is less more? *Trends in Genetics* 2000; 16: 327-329.
- ◆ Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., Gumbs C., Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378(6559): 789-92.
- ◆ Wright N. A. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol* 2000; 81(2): 117-143.
- ◆ Wrobel C.N., Debnath J., Lin E., Beausoleil S., Rousell M., Brugge J.S. Autocrine CSF-1R activation promotes Src-dependent disruption of mammary epithelial architecture. *J Cell Biol* 2004; 165(2): 263.
- ◆ Xercavins J., Salicrú S., Sabadell M.D. Cáncer de mama I. Epidemiología y factores de riesgo. Prevención primaria. Diagnóstico precoz. Lesiones no palpables. Clínica y desarrollo. Clasificación TNM. Biología del carcinoma mamario (marcadores). En: Cabero L., editors. *Tratado de Ginecología, Obstetricia y Medicina de la Reproducción*. 1^a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2003. P. 1692-1702.

- ◆ Yoshikawa R., Kusonoki M., Yanagui H., Noda M., Furuyama J., Yamamura T. Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: A novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res* 2001; 61: 1029-1037.
- ◆ Young-Ae K., Byung C., Yong L., Dong P., Sook-Hee R., Kun-Young P. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncology Reports* 2004; 11(2): 441-446.
- ◆ Yu J., Zhang L., Hwang P.M., Kinzler K.W., Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7 : 673-82.
- ◆ Yu J., Wang Z., Kinzler K.W., Vogelstein B., Zhang L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100: 1931-6.
- ◆ Zaharevitz D.W., Gussio R., Leost M., Senderowicz A.M., Lahusen T., Kunick C., Meijer L., Sausville E.A. Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Cancer Res* 1999; 59(11): 2566-9.
- ◆ Zamora P., Espinosa E., González M. Cáncer de mama. Clasificación y concepto. *Medicine* 2001; 8(57): 3041-3049.
- ◆ Zapata J.M., Krajewski S., Huang R-P., Takayama S., Wang H-G., Adamson E. Expression of multiple apoptosis-regulatory genes in human breast cancer cell lines and primary tumors. *Breast Cancer Research and Treatment* 1998; 47: 129-140.
- ◆ Zeller K.I., Jegga A.G., Aronow B.J., O'Donnell K.A., Dang C.V. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biology* 2003; 4: R69.

- ◆ Zhang L., Zhou W., Velculescu V.E., Kern S.E., Hruban R.H., Hamilton S.R., Vogelstein B., Kinzler K.W. Gene Expression Profiles in Normal and Cancer Cells. *Science* 1997; 276(5316): 1268 – 1272.
- ◆ Zhou X.P., Woodford-Richens K., Lehtonen R., Kurose K., Aldred M., Hampel H., Launonen V., Virta S., Pilarski R., Salovaara R., Bodmer W.F., Conrad B.A., Dunlop M., Hodgson S.V., Iwama T., Jarvinen H., Kellokumpu I., Kim J.C., Leggett B., Markie D., Mecklin J.P., Neale K., Phillips R., Piris J., Rozen P., Houlston R.S., Aaltonen L.A., Tomlinson I.P.M., Eng C. Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Gent* 2001; 69: 704-711.
- ◆ Zhu J., Zhang S., Jiang J., Chen X. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275(51): 39927-39934.
- ◆ Zhong C., Kinch M.S., Burrige K. Rho-stimulated Contractility Contributes to the Fibroblastic Phenotype of Ras-transformed Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* 1997; 8(11): 2329.2344.
- ◆ Zweibaum A. Differentiation of human colon cancer cells: a new approach to colon cancer. *Bull Acad Natl Med* 1993; 177(1): 63-71; discussion 71-3.
- ◆ Zweibaum A., Hauri H. P., Sterchi E., Chantret I., Haffen K., Bamat J., Sordat B. Immunohistological evidence, obtained with monoclonal antibodies, of small intestinal brush border hydrolases in human colon cancers and foetal colons. *Int J Cancer* 1984; 34(5): 591-8.