



**UNIVERSITAT
JAUME I**

**Programa de Doctorat en Ciències
Escola de Doctorat de la Universitat Jaume I**

BÚSQUEDA DE NUEVOS COMPUESTOS ANTICÁNCER MULTIDIANA

**Memoria presentada por Celia Martín Beltrán para optar al grado de
doctora por la Universitat Jaume I**

Celia Martín Beltrán

Eva Falomir Ventura

Miguel Carda Usó

Castelló de la Plana, junio 2022

FINANCIACIÓN RECIBIDA

Agencias financiadoras de la doctoranda:

- Beca de Investigación para el proyecto “Diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos con potencial actividad anticáncer, antiangiogénica y antitelomerasa” asociada al proyecto P1·1B2015-75).

Agencias financiadoras del proyecto de investigación o de los recursos materiales específicos del grupo de investigación relacionados con esta Tesis:

- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I: Descubrimiento de moléculas multidiana anticáncer y estudio de su efecto sobre el microambiente tumoral mediante modelos 3D (UJI-B2021-46).
- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I: *In silico*, síntesis y evaluación biológica de agentes anticáncer multidiana con efecto inmunomodulador, antiangiogénico y antivascular (UJI-B2018-38).
- Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia, innovación y universidades. En busca de una nueva generación de agentes anticancerosos multidiana. Desde lo *in silico* hasta lo *in vitro* y desde moléculas pequeñas hasta los nanofármacos (SMOLCANCER-RTI2018-097345-B-I00).
- Proyecto financiado por la Generalitat Valenciana. Síntesis de moléculas híbridas y análogos de compuestos biológicamente activos. Evaluación de las propiedades antiangiogénicas, antimitóticas, inhibidoras de telomerasa y antimetabólicas (PROMETEO/2015/2016/027).
- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I. Diseño, síntesis y evaluación biológica de potenciales compuestos con actividad anticáncer, antiangiogénica e inhibidora de la expresión de telomerasa (P1·1B2015-75).
- Proyecto financiado por el Ministerio de Economía y competitividad. Diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos con actividad antimitótica, antiangiogénica y antitelomerasa. Análogos de estructuras naturales y no naturales (CTQ2014-52949-P).

Licencia Creative Commons



Llicència CC Reconeixement - No comercial - Compartir igual (BY-NC-SA).

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado en el grupo *Joining Medicine and Chemistry* del departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales de la Universidad Jaume I, bajo la dirección y tutela de Eva Falomir Ventura, Juan Murga Clausell y Miguel Carda Usó. A ellos me gustaría agradecerles el haberme dado la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación, desde que me aceptaron en el grupo cuando estudiaba el Máster en Química Aplicada y Farmacológica. A Juan y Miguel, me gustaría daros las gracias por todo lo que me habéis enseñado, tanto a nivel profesional como personal, desde que llegué al grupo. Siempre que he tenido alguna dificultad, habéis estado ahí para ayudarme y aconsejarme, con mucha paciencia y dedicación, cosa que valoro enormemente y por lo que siempre os estaré muy agradecida.

A ti, Eva, necesitaría otra Tesis entera para agradecerte todo lo que has hecho por mí estos años. No tengo palabras para agradecerte lo generosa y paciente que has sido conmigo desde que llegué al grupo, siempre dispuesta a ayudarme cuando el trabajo me superaba o tenía días en los que la biología se me resistía. Gracias por cuidarnos tanto como lo haces, por ser un ejemplo de ilusión, esfuerzo y trabajo, y por estar a mi lado en este camino en todo momento. Sin ti, este trabajo no hubiese sido posible.

También me gustaría agradecerle a Ana María Sánchez y a Alberto Ribes toda su paciencia conmigo cuando empecé en el mundo “plásmido”. Sé que no habrá sido fácil, ya que no sabía nada acerca de la biotecnología, pero gracias a vuestro tiempo y dedicación he conocido un campo que me ha encantado y del que espero seguir descubriendo cosas nuevas en un futuro.

A mi amiga Laura Conesa, por la paciencia y cariño que me has mostrado desde que te conocí. Gracias a ti, estoy donde estoy, porque sin tu apoyo no habría podido llegar tan lejos. He tenido la gran suerte de tenerte como referente, desde el primer día que pisé el laboratorio hasta que te fuiste a cumplir tu sueño (no dudaba en que lo conseguirías). Hacen falta más personas como tú Lau, gracias por ser tan buena compañera y, especialmente, gracias por ser tan buena amiga.

También me gustaría agradecer con especial cariño a mis compañeros y amigos de la UJI, que han estado conmigo durante estos años. A Raül, por hacerme reír y convertir los días nublados en soleados (los cambios de

tiempo siempre se te han dado bien). A mis amigos Raquel, Alberto, Amelia y Juanjo, espero que esta amistad dure siempre, gracias por todas las horas dentro y fuera del laboratorio que hemos compartido, vuestros ánimos y apoyo han sido fundamentales para mí en este tiempo. A Begoña, por todas las tardes que hemos compartido juntas haciéndonos compañía hasta altas horas, siempre con una sonrisa. También al resto de compañeros y amigos de las horas de comer, por los buenos momentos y conversaciones que hemos tenido.

A mis amigas y amigos de siempre, y a los nuevos que han llegado a mi vida en estos años, gracias por todo el apoyo, ánimos e interés en el progreso de este trabajo. Me habéis ayudado a desconectar y coger fuerzas para seguir.

A mi familia, por ser mi ejemplo a seguir y el motor de mis días. A mis abuelos, porque son el ejemplo del trabajo duro, sacrificio y esfuerzo. Gracias por cuidarme tanto, desde siempre. A mis tíos Víctor, Juan Carlos y Mayka, y a mi prima, por interesaros siempre y preguntarme cómo lo llevaba (aunque a veces la respuesta no fuera muy optimista...). A mi hermano Carlos, que has soportado mi mal humor desde que naciste, gracias por ser tan bueno conmigo y el mejor hermano que podría tener.

Me gustaría hacer un agradecimiento especial a mis padres, María José y Manuel, porque sin ellos esta Tesis no habría sido posible. Valoro muchísimo todos los sacrificios y esfuerzos que habéis tenido que hacer para que haya llegado hasta aquí, desde mis días en la carrera universitaria hasta este momento. Gracias por haberme escuchado, comprendido y dado ánimos cuando lo necesitaba, y por demostrarme que, con esfuerzo, todo es posible. Sois mi apoyo incondicional, y espero que estéis orgullosos de mí.

A David, no sabes lo importante que ha sido, y es, tu apoyo para mí. A ti quiero agradecerte tu paciencia, tu ayuda y cariño en estos años. Gracias por no separarte de mi lado, incluso en los días menos buenos, y por demostrarme que repartir el peso entre dos, hace el camino más fácil.

***No son nuestras habilidades las que muestran cómo
somos, sino nuestras elecciones***

(Albus Dumbledore)

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A549: línea celular de adenocarcinoma de pulmón

ABC: ATP-binding cassette

AcOH: ácido acético

ADME: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

ADN: ácido desoxirribonucleico

Apaf-1: Apoptotic protease activating factor-1

APC: antigen-presenting cell

ApoBDs: apoptotic bodies

ARN: ácido ribonucleico

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: adenosín trifosfato

bHLHZ: basic helix–loop–helix zipper

BMS: Bristol-Myers Squibb

BOP: benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate

CAF: cancer-associated fibroblasts

CDK: cyclin dependent kinase

CH₂Cl₂: diclorometano

c-KIT: stem cell factor receptor

CKI: cyclin dependent kinase inhibitor

c-Myc: avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

CTC: cancer stem cell

CTD: C-terminal domain

CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

CR: región rica en cisteína

DIEA: N,N-diisopropiletilamina

DME: dimethyl ether

DMEM: Dubelcco's modified eagle's medium

DMSO: dimethylsulfoxide

dNTP: deoxynucleotide triphosphate

DSF: differential scanning fluormetry

ECD: extracellular domain

EG-VEGF: endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor

EGFP: enhanced green fluorescent protein

EHS: sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

EPC: endothelial progenitor cell

ERK: Extracellular-signal regulated Kinase

Et: ethyl

EtOAc: acetato de etilo

FAM: fluorescein amidites

FBS: suero fetal bovino

FDA: Food and Drug Administration

Flt-3: FMS-like tyrosine kinase-3

FITC: fluorescein isothiocyanate

FnIII: fibronectina tipo III

FoxP3+: forkhead box P3

FSC: forward scatter

H₂NCN: cianamida

HeLa: línea celular de carcinoma de cuello de útero

HEK-293: línea celular embrionaria de riñón humano

HMEC-1: línea celular humana del endotelio microvascular

HRP: horseradish peroxidase

HT-29: línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano

hTERT: human telomerase reverse transcriptase

HTRF: Homogeneous Time-Resolved Fluorescence

IC₅₀: half maximal inhibitory concentration

Idα: dominio de inserción

IGF-1/2: insulin-like growth factor 1/2

IGF-1R: insulin-like growth factor type 1 receptor

IL-2: interleucina-2

INF-γ: interferón gamma

IR: insulin receptor

IRS1/2: insulin receptor substrate 1/2

ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)

ITSM: immunoreceptor tyrosine-based switch motif)

LNH: linfoma no Hodgkin

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MAX: MYC-associated protein X

MB: MYC box

MCF-7: línea celular de adenocarcinoma de mama humano

MDR: Multidrug resistance

MHC: major histocompatibility complexe

MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

MW: microondas

NK: natural killer

NLS: nuclear localization sequence

NMR: nuclear magnetic resonance

Nrp1: neuropilina-1

NRTK: no receptor tyrosine kinase

NSCLC: non-small cell lung cancer

NTD: N-terminal domain

p: probabilidad calculada

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

p-ERK: phospho-ERK

PD-1: programmed death-protein 1

PD-L1/2: programmed death-ligand 1/2

dppf: 1,1'-bis(diphenyl)phospino-ferrocene

PDGF: platelet-derived growth factor

PDGFR-β: platelet-derived growth factor receptor

PH: Pleckstrin homology

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PIGF: placenta growth factor

Ph: phenyl

pRb: proteína supresora tumoral del retinoblastoma

PTB: phosphotyrosine binding

PTS: protein thermal shift

RAM: reacción adversa al medicamento

ROS: reactive oxygen species

RTK: receptor tyrosine kinase

SAR: Structure-activity relationship

SBDD: structure-based drug design

SH2: Src Homology 2

SHP-1/2: Src homology región 2 domain-containing phosphatase 1/2

siRNA: small interfering RNA

SNC: Sistema Nervioso Central

SSC: side scatter

TAD: N-terminal transactivation domain

TAM: tumor-associated macrophages

TAMRA: tetramethyl-6-carboxy-rhodamine

TCR: T cell receptor

Temp. amb.: temperatura ambiente

THF: tetrahidrofurano

TKD: tyrosine kinase domain

TMB: tetrametilbencidina

TMD: transmembrane domain

TME: tumor microenvironment

T_{reg}: células T reguladoras

TSPO: translocator protein

VDAC: voltage-dependent anion channel

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor

VPF: vascular permeability factor

ABSTRACT

This Doctoral Thesis, entitled "*Búsqueda de nuevos compuestos anticáncer multidiana*", aims to identify new molecular entities with action against biological anticancer targets selectively, related to senescence (*hTERT* and *c-Myc*), angiogenesis (*VEGF* and *VEGFR-2*) and immune system evasion (*PD-L1*). The thesis is divided into seven chapters, which are briefly explained below.

In **Chapter 1**, a general introduction is made, whose objective is to know the characteristics and pathogenesis of cancer disease. This section explains the processes involved in tumor development and growth, as well as the possible therapeutic targets on which the studied compounds will direct their action.

In **Chapter 2**, the objectives that are intended to be achieved in each chapter of this Thesis are set out.

In **Chapter 3**, a schematic description of the synthetic routes by which small molecule compounds were obtained is made. A total of three families of compounds were synthesized, which were later biologically evaluated.

In **Chapter 4**, an overview of the techniques used to determine the biological activity of small molecule compounds is presented, as well as a description of the cell lines used. After this, a detailed explanation of the assays carried out with each of the three families of compounds, the results obtained and the conclusions that can be drawn from them is made.

The biological evaluation of different triazolone-type derivatives (Family 1) shows that, in general, they are able to reduce the viability of tumor cells in the low micromolar range, without affecting non-tumor cells, so this type of molecule can selectively inhibit the growth of tumor cells. Furthermore, these molecules have an epigenetic effect since they are able to modulate the expression of one or several oncogenes (*hTERT*, *c-Myc* and *PD-L1*).

On the other hand, molecules with biaryl-type units (Family 2) have a moderate action on cell viability, with IC_{50} values in the micromolar range. The study of its effect on the expression of the *hTERT*, *c-Myc* and *VEGF* genes showed that these compounds are able to down-regulate the target genes and

modulate the expression of the c-Myc protein and the secretion of VEGF into the extracellular medium.

Finally, the biological study of the molecules with a styrylurea-like structure (Family 3) was carried out on (*E*), (*Z*)-styrylurea-type entities and also on phenethylurea-type entities. In the case of the effect on cell viability, derivatives of the (*E*)-styrylurea type are the most active, being able to inhibit the growth of tumor cells in the nanomolar range. Some of the compounds showed antiangiogenic activity, being able to inhibit the formation of new vascular networks formed by HMEC-1; furthermore, these compounds inhibit the expression of both PD-L1 and c-Myc proteins. Finally, the study of the effect of the products on the proliferation of cancer cells, incubated in the presence of Jurkat T cells that express PD-1, showed that these entities can reduce the viability of tumor cells without affecting the viability of defensive cells.

In **Chapter 5**, a new line of research focused on the development of new potential biopharmaceuticals directed at anticancer targets has been proposed. A series of silencing plasmids have been developed for new targets, such as IRS (IRS1 and IRS2), which could serve as potential biopharmaceuticals in antitumor therapies. Their biological evaluation has focused on their effect on cell viability, both in tumor lines and in non-tumor cells, in which a reduction is observed when incorporating the silencing plasmid; assays were performed by flow cytometry, calculation of depopulated area and cell count using trypan blue. To find out their mechanism of action, studies were carried out on the effect of these biopharmaceuticals on the cell cycle and on the ERK and Akt signaling pathways. The results yielded by these bioagents allow us to consider them as promising biopharmaceuticals.

In **Chapter 6**, the general conclusions obtained in this Thesis are shown.

Finally, in **Chapter 7**, the publications obtained with works carried out during this Thesis appear, as well as the participations in the congresses that have been attended during this time.

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral, con título “*Búsqueda de nuevos compuestos anticáncer multidiana*”, tiene como objetivo identificar nuevas entidades moleculares con acción frente a dianas biológicas anticáncer de forma selectiva, relacionadas con la senescencia (hTERT y c-Myc), la angiogénesis (VEGF y VEGFR-2) y la evasión del sistema inmunológico (PD-L1). La tesis se estructura en siete capítulos, los cuales se explican brevemente a continuación.

En el **Capítulo 1**, se realiza una introducción general, cuyo objetivo es conocer las características y patogenia de la enfermedad del cáncer. En este apartado se explican los procesos involucrados en el desarrollo y crecimiento tumoral, así como las posibles dianas terapéuticas sobre las que los compuestos estudiados van a dirigir su acción.

En el **Capítulo 2**, se plantean los objetivos que se pretenden conseguir en cada capítulo de esta Tesis Doctoral.

En el **Capítulo 3**, se hace una descripción esquemática de las rutas sintéticas por las que se obtuvieron compuestos de moléculas pequeñas. Se consiguió sintetizar un total de tres familias de compuestos, que fueron posteriormente evaluados biológicamente.

En el **Capítulo 4**, se presenta una visión general de las técnicas empleadas para conocer la actividad biológica de los compuestos de moléculas pequeñas, así como una descripción de las líneas celulares empleadas. Tras esto, se realiza una detallada explicación de los ensayos llevados a cabo con cada una de las tres familias de compuestos, los resultados obtenidos y las conclusiones que se pueden extraer de los mismos.

La evaluación biológica de diferentes derivados de tipo triazolona (Familia 1) demuestra que, en general, son capaces de disminuir la viabilidad de las células tumorales en el rango micromolar bajo, sin afectar a las células no tumorales, por lo que este tipo de moléculas son capaces de inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerosas. Además, estas moléculas tienen un efecto epigenético ya que son capaces de modular la expresión de uno o varios oncogenes (*hTERT*, *c-Myc* y *PD-L1*).

Por su parte, las moléculas con unidades de tipo biarilo (Familia 2) presentan una moderada acción sobre la viabilidad celular, con valores de IC_{50} en el rango micromolar. El estudio de su efecto sobre la expresión de los genes *hTERT*, *c-Myc* y *VEGF* demostró que estos compuestos son capaces de regular a la baja los genes diana y de modular la expresión de la proteína *c-Myc* y la secreción de *VEGF* al medio extracelular.

Finalmente, el estudio biológico de las moléculas con estructura de tipo estililurea (Familia 3) se realizó sobre entidades de tipo (*E*), (*Z*)-estirilurea y también sobre entidades de tipo fenetilurea. En el caso del efecto sobre la viabilidad celular, los derivados de tipo (*E*)-estirilurea son los más activos, siendo capaces de inhibir el crecimiento de las células tumorales en el rango nanomolar. Algunos de los compuestos presentaron actividad antiangiogénica, siendo capaces de inhibir la formación de nuevas redes vasculares formadas por HMEC-1; además, estos compuestos inhiben la expresión tanto de la proteína PD-L1 como *c-Myc*. Por último, el estudio del efecto de los productos en la proliferación de células cancerosas, cultivadas en presencia de células T Jurkat que expresan PD-1, demostró que estas entidades son capaces de reducir la viabilidad de las células tumorales sin afectar a la viabilidad de las células defensivas.

En el **Capítulo 5**, se ha planteado una nueva línea de investigación enfocada al desarrollo de nuevos biofármacos dirigidos a dianas anticáncer. Se ha desarrollado una serie de plásmidos silenciadores de unas nuevas dianas, como son los IRS (IRS1 y IRS2), que podrían servir como potenciales biofármacos en terapias antitumorales. La evaluación biológica de los mismos se ha centrado en su efecto sobre la viabilidad celular, tanto en líneas tumorales como en células no tumorales, en la que se aprecia una reducción al incorporar el plásmido silenciador; se llevaron a cabo ensayos mediante citometría de flujo, cálculo del área despoblada y recuento celular empleando azul de tripano. Para conocer su mecanismo de acción, se realizaron estudios sobre el efecto de estas biomoléculas sobre el ciclo celular y en las vías de señalización de ERK y Akt. Los resultados obtenidos para estos bioagentes nos permiten considerarlos como prometedores biofármacos.

En el **Capítulo 6**, se muestran las conclusiones generales obtenidas en esta Tesis Doctoral.

Finalmente, en el **Capítulo 7**, aparecen las publicaciones conseguidas con trabajos realizados durante esta Tesis Doctoral, así como las participaciones en los congresos a los que se ha asistido durante este tiempo.

RESUM

Aquesta Tesi Doctoral, amb títol "*Búsqueda de nuevos compuestos anticáncer multidiana*", té com a objectiu identificar noves entitats moleculars amb acció davant de dianes biològiques anticàncer de forma selectiva, relacionades amb la senescència (hTERT i c-Myc), l'angiogènesi (VEGF i VEGFR-2) i l'evasió del sistema immunològic (PD-L1). La tesi s'estructura en set capítols, que s'expliquen breument a continuació.

Al **Capítol 1**, es realitza una introducció general, l'objectiu de la qual és conèixer les característiques i patogènia de la malaltia del càncer. En aquest apartat s'expliquen els processos involucrats en el desenvolupament i el creixement tumoral, així com les possibles dianes terapèutiques sobre les quals els compostos estudiats dirigiran la seva acció.

Al **Capítol 2**, es plantegen els objectius que es pretenen assolir a cada capítol d'aquesta Tesi Doctoral.

Al **Capítol 3**, es fa una descripció esquemàtica de les rutes sintètiques per les quals es van obtenir compostos de molècules petites. Es va aconseguir sintetitzar un total de tres famílies de compostos, que van ser posteriorment avaluats biològicament.

Al **Capítol 4**, es presenta una visió general de les tècniques emprades per conèixer l'activitat biològica dels compostos de molècules petites, així com una descripció de les línies cel·lulars utilitzades. Després d'això, es fa una detallada explicació dels assaigs duts a terme amb cadascuna de les tres famílies de compostos, els resultats obtinguts i les conclusions que se'n poden extreure.

L'avaluació biològica de diferents derivats de tipus triazolona (Família 1) demostra que, en general, són capaços de disminuir la viabilitat de les cèl·lules tumorals al rang micromolar baix, sense afectar les cèl·lules no tumorals, per la qual cosa aquest tipus de molècules són capaços d'inhibir selectivament el creixement de cèl·lules canceroses. A més, aquestes

molècules tenen un efecte epigenètic, ja que són capaces de modular l'expressió d'un o més oncogens (*hTERT*, *c-Myc* i *PD-L1*).

Per la seva banda, les molècules amb unitats de tipus biaril (Família 2) presenten una moderada acció sobre la viabilitat cel·lular, amb valors d' IC_{50} al rang micromolar. L'estudi del seu efecte sobre l'expressió dels gens *hTERT*, *c-Myc* i *VEGF* va demostrar que aquests compostos són capaços de regular a la baixa els gens diana i de modular l'expressió de la proteïna *c-Myc* i la secreció de *VEGF* al medi extracel·lular.

Finalment, l'estudi biològic de les molècules amb estructura de tipus estililurea (Família 3) es va realitzar sobre entitats de tipus (*E*), (*Z*)-estirilurea i també sobre entitats de tipus fenetilurea. En el cas de l'efecte sobre la viabilitat cel·lular, els derivats de tipus (*E*)-estirilurea són els més actius, i són capaços d'inhibir el creixement de les cèl·lules tumorals al rang nanomolar. Alguns dels compostos van presentar activitat antiangiogènica i van ser capaços d'inhibir la formació de noves xarxes vasculars formades per HMEC-1; a més, aquests compostos inhibeixen l'expressió tant de la proteïna *PD-L1* com a *c-Myc*. Finalment, l'estudi de l'efecte dels productes en la proliferació de cèl·lules canceroses, cultivades en presència de cèl·lules T Jurkat que expressen *PD-1*, va demostrar que aquestes entitats són capaces de reduir la viabilitat de les cèl·lules tumorals sense afectar la viabilitat de les cèl·lules defensives.

Al **Capítol 5**, s'ha plantejat una nova línia de recerca enfocada al desenvolupament de nous biofàrmacs adreçats a dianes anticàncer. S'ha desenvolupat una sèrie de plasmidis silenciadors d'unes noves dianes, com són els IRS (*IRS1* i *IRS2*), que podrien servir com a potencials biofàrmacs en teràpies antitumorals. L'avaluació biològica dels mateixos s'ha centrat en el seu efecte sobre la viabilitat cel·lular, tant en línies tumorals com en cèl·lules no tumorals, en què s'aprecia una reducció en incorporar el plasmidi silenciador; es van dur a terme assaigs mitjançant citometria de flux, càlcul de l'àrea despoblada i recompte cel·lular emprant blau de tripà. Per conèixer el mecanisme d'acció, es van realitzar estudis sobre l'efecte d'aquests biofàrmacs sobre el cicle cel·lular i les vies de senyalització d'*ERK* i *Akt*. Els resultats donats per aquests bioagents ens porten a considerar-los com a prometedors biofàrmacs.

Al **Capítol 6**, es mostren les conclusions generals obtingudes en aquesta Tesi Doctoral.

Finalment, al **Capítol 7**, apareixen les publicacions aconseguides amb treballs realitzats durant aquesta Tesi Doctoral, així com les participacions als congressos als quals s'ha assistit durant aquest temps.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Química Médica.....	1
1.2.	Cáncer.....	4
1.2.1.	Señas de identidad del cáncer.....	8
1.2.2.	Ciclo celular y cáncer	11
1.2.3.	Apoptosis.....	14
1.2.4.	Tratamiento y resistencia.....	16
1.3.	Fármacos antineoplásicos	18
1.3.1.	Inmunoterapia.....	18
1.3.2.	Inhibidores de quinasas	33
1.3.3.	Biofármacos.....	58
2.	OBJETIVOS.....	61
3.	SÍNTESIS DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS	63
3.1.	Síntesis de los compuestos de la familia 1	63
3.2.	Síntesis de los compuestos de la familia 2.....	64
3.3.	Síntesis de los compuestos de la familia 3.....	65
4.	DESARROLLO DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS ORGÁNICAS DIRIGIDAS CON POTENCIAL EFECTO ANTICÁNCER.....	67
4.1.	Estudios de interacción de las dianas biológicas con los ligandos.....	67
4.1.1.	<i>Docking</i> molecular	67
4.1.2.	Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas.....	67
4.2.	Cultivos celulares empleados en los estudios biológicos.....	69
4.2.1.	Líneas celulares tumorales.....	70
4.2.2.	Líneas celulares no tumorales.....	73
4.3.	Estudios de viabilidad celular	74
4.3.1.	Ensayo de exclusión del azul de tripano.....	75
4.3.2.	Ensayo MTT.....	76
4.4.	Estudios de expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	77
4.5.	Estudios de expresión de las proteínas diana.....	82
4.5.1.	Cuantificación de proteína mediante ELISA.....	82
4.5.2.	Cuantificación relativa de proteína por citometría de flujo	84

4.6.	Estudios del efecto en el ciclo celular por citometría de flujo ..	85
4.7.	Estudios de la actividad antiangiogénica	86
4.8.	Evaluación biológica de la Familia 1	87
4.8.1.	Ensayo de viabilidad celular (MTT)	88
4.8.2.	Inhibición de la expresión de los genes <i>hTERT</i> , <i>c-Myc</i> y <i>PD-L1</i> mediante la técnica RT-qPCR.....	89
4.8.3.	Efecto en la expresión de las proteínas c-Myc y PD-L1 mediante el método ELISA.....	90
4.8.4.	Interacción directa con la proteína c-Myc por ELISA.....	91
4.8.5.	Interacción directa con la proteína PD-L1 con la técnica PTS....	92
4.8.6.	Conclusiones.....	92
4.9.	Evaluación biológica de la Familia 2	94
4.9.1.	Ensayo de viabilidad celular (MTT)	96
4.9.2.	Inhibición de la expresión de los genes <i>VEGF</i> , <i>hTERT</i> y <i>c-Myc</i> por la técnica RT-qPCR	97
4.9.3.	Efecto de los compuestos seleccionados en la inhibición de la producción de proteína c-Myc por la técnica ELISA.....	100
4.9.4.	Efecto de los compuestos seleccionados en la inhibición de la producción de proteína VEGFA mediante la técnica ELISA	101
4.9.5.	Conclusiones.....	102
4.10.	Evaluación biológica de la Familia 3	106
4.10.1.	Estudios de acoplamiento molecular (<i>docking</i>).....	107
4.10.2.	Ensayo de viabilidad celular (MTT)	109
4.10.3.	Efecto sobre VEGFR-2 celular en HT-29 y HMEC-1 mediante citometría de flujo	110
4.10.4.	Efecto en la formación de microtubos en células endoteliales ..	111
4.10.5.	Efecto sobre las proteínas PD-L1 y c-Myc mediante citometría de flujo	112
4.10.6.	Evaluación de la proliferación celular en co-cultivos	113
4.10.7.	Conclusiones.....	116
4.11.	Materiales y métodos	117
5.	DESARROLLO DE BIOMOLÉCULAS DIRIGIDAS CON EFECTO ANTICÁNCER	123
5.1.	Plásmidos como potenciales biofármacos.....	123
5.2.	Estudios biológicos con los plásmidos.....	126
5.2.1.	Transfección de células.....	126
5.2.2.	Ensayos de proliferación celular con sh/ <i>RS1</i>	126

5.2.3. Ensayos de proliferación celular con sh <i>IRS2</i>	133
5.2.4. Ensayos de ciclo celular con sh <i>IRS1</i>	136
5.2.5. Ensayos de ciclo celular con sh <i>IRS2</i>	139
5.2.6. Ensayos Akt/p-Akt y ERK/p-ERK con sh <i>IRS1</i> y sh <i>IRS2</i>	142
5.2.7. Conclusiones	143
5.3. Materiales y métodos.....	144
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	149
7. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL	153
7.1. Comunicaciones a congresos.....	153
7.2. Publicaciones.....	153

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Química Médica

La comisión especializada de la IUPAC definió a la Química Médica como la parte de la Química relacionada con el descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del mecanismo de acción de compuestos biológicamente activos a nivel molecular, incluyendo también en esta disciplina científica el estudio, la identificación y la síntesis de metabolitos derivados de fármacos y compuestos relacionados.¹

El objetivo de la Química Médica es obtener sustancias químicas que sean capaces de conseguir el efecto biológico que se desea en el cuerpo humano, o en el sistema vivo seleccionado.² Los fármacos, ya sean de origen natural o sintético, son sustancias químicas empleadas con fines terapéuticos, capaces de interactuar con sistemas químicos complejos de humanos o animales. La Química Médica se centra en las reacciones orgánicas y bioquímicas de los fármacos con sus dianas biológicas, así como en los procesos de síntesis y caracterización de los fármacos.³

La mayor parte de los procesos biológicos surgen como resultado de una interacción entre biomoléculas. En el año 1894, Hermann Emil Fischer describió la unión de un sustrato con el centro activo de la enzima a través del modelo de “llave-cerradura”, según el cual el sustrato encaja en el centro activo como una llave en su cerradura. Esta idea contiene la base molecular del mecanismo de acción de un fármaco. Comprender los determinantes que condicionan el reconocimiento entre un compuesto (ligando) y su diana biológica (receptor), es fundamental para determinar las características geométricas y de reactividad química que modulan la afinidad entre ligando y receptor, así como la selectividad y especificidad de dicha interacción. A su vez, todo ello es imprescindible para poder establecer una relación entre la estructura molecular del ligando y su efecto biológico.⁴

Durante muchos años, el descubrimiento de fármacos se ha basado en estudios de “ensayo y error”, empleando para ello el *screening* o cribado de una gran variedad de compuestos en determinados ensayos biológicos. Sin embargo, esta técnica presentaba una gran limitación, debido a la enorme

¹ IUPAC, *Information Bulletin, Tech. Rep.* **1974**, 13.

² Graham, L. P. *An introduction to medicinal chemistry*, 5ª ed. Oxford University Press. **2013**.

³ Wermuth, C. G. *The practice of medicinal chemistry*, 3ª ed. Elsevier. **2008**.

⁴ Pouplana, R.; Barril, X.; Luque, F. J. *LifeSciencesLab*. **2009**, 28-31.

diversidad de compuestos químicos que podían ser estudiados, haciendo que el resultado final estuviera condicionado por la elección de los mismos.⁴ Otro inconveniente era la gran cantidad de tiempo y recursos económicos necesarios para llevar a cabo todos los ensayos biológicos.

Los enfoques y metodologías empleados en el diseño de nuevos fármacos han cambiado en los últimos tiempos, impulsando nuevos avances tecnológicos para resolver estas constantes dificultades que aparecían con frecuencia cuando se buscaban nuevos tratamientos.

A la hora de diseñar nuevos compuestos es necesario valorar sus características farmacodinámicas y farmacocinéticas. La farmacodinamia estudia las acciones y los efectos de los fármacos en el organismo, por lo que su conocimiento proporciona información relevante a la hora de predecir la acción terapéutica o toxicidad de los mismos. Por su parte, la farmacocinética estudia los procesos que sufre el fármaco en el organismo, conocidos como ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción). Esto determina la cantidad de fármaco presente en el sitio en que debe ejercer su efecto biológico y, por tanto, su biodisponibilidad.⁵

En los últimos años, el diseño de fármacos se ha beneficiado de forma considerable con el desarrollo de la química computacional. A partir de un modelo hipotético sobre el mecanismo de acción frente a una diana biológica determinada, la química computacional permite identificar y optimizar compuestos de elevada afinidad como potenciales candidatos a fármacos para dicha diana. Más recientemente, también se ha empleado esta técnica para conseguir una mejora en sus propiedades farmacocinéticas que aseguran un balance entre la absorción, distribución y metabolismo del fármaco, junto a su excreción y toxicidad.⁴

El diseño de fármacos basado en estructuras (SBDD) es uno de los enfoques computacionales que resulta de utilidad en las principales fases del descubrimiento de fármacos, como la identificación de *hit* y la etapa *hit-to-lead*, tal y como se muestra en la Figura 1.1. La primera consiste en la identificación de una lista de compuestos químicos, conocidos como *hits*, que idealmente presentan cierta potencia y especificidad respecto a la diana terapéutica; la segunda hace referencia a la evaluación de los *hits*

⁵ Alvo, A.; Téllez, V.; Sedano, C.; Fica, A. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* **2016**, *76*, 136-147.

seleccionados para identificar las moléculas líderes (*leads*) prometedoras, antes de continuar hacia la optimización de *leads* potenciales a gran escala.

Se han aplicado gran variedad de enfoques computacionales en las diversas etapas del proceso de diseño de fármacos. Las etapas iniciales están destinadas a reducir el número de posibles ligandos, mientras que las etapas posteriores, durante la optimización de la molécula líder, están enfocadas a disminuir los costes experimentales y reducir el período de desarrollo del compuesto.⁶

Una vez seleccionados los compuestos líderes o *leads*, se inician los ensayos preclínicos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos estudios permiten obtener información acerca de la toxicidad, farmacodinamia, farmacocinética, estabilidad y formulación del compuesto.⁷

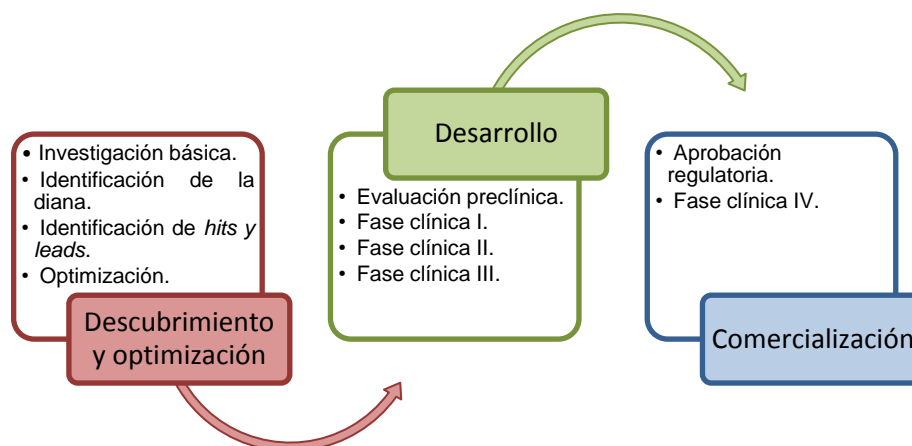


Figura 1.1. Etapas del proceso de descubrimiento de fármacos.⁸

Tras esta fase, comienzan los ensayos clínicos en humanos que se dividen en cuatro etapas: las tres primeras son previas a la comercialización del fármaco en estudio y aportan información acerca de su seguridad y eficacia, mientras que la cuarta consiste en detectar reacciones adversas al medicamento (RAM) posteriores a la comercialización del mismo (farmacovigilancia).⁷

Por todo lo anteriormente expuesto, se concluye que la Química Médica es una ciencia interdisciplinar que relaciona la Química Orgánica con las

⁶ Kalyanamoorthy, S.; Chen, Y. P. *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 831-839.

⁷ Zurita-Cruz, J. N.; Barbosa-Cortés, L.; Villasís-Keever, M. A. *Rev. Alerg. Mex.* **2019**, *66*, 246-253.

⁸ Saldívar-González, F.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L. *Educ. Quím.* **2017**, *28*, 51-58.

ciencias de la vida, tales como Bioquímica, Farmacología, Inmunología, Biología Molecular o Toxicología.³ La implicación de muchas áreas de la química (cristalografía, espectroscopía o técnicas de simulación computacional, entre otras) es necesaria para traducir en terapias efectivas el conocimiento de las bases celulares, moleculares y genéticas de enfermedades como el cáncer.⁹

1.2. Cáncer

El cáncer no es un término unitario sino una palabra que agrupa a un conjunto de enfermedades caracterizadas por procesos de crecimiento y diseminación incontrolados de células mutadas, que tienen la capacidad de invadir otros tejidos u órganos alejados del foco original, proceso conocido como metástasis.¹⁰

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. En la Figura 1.2. se muestra la distribución de los casos nuevos y muertes estimados para los diez cánceres más comunes en 2020 en hombres (A) y mujeres (B). En cuanto a los tipos de cáncer que destacan por su alta incidencia se encuentran el cáncer de mama, de pulmón, colorrectal y de próstata. Respecto a los tipos de cáncer que causaron mayor número de fallecimientos, destacan el cáncer de pulmón, de mama, colorrectal, de hígado y de estómago.¹¹

⁹ Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal chemistry of anticancer drugs*, 2ª ed. Elsevier. **2015**.

¹⁰ World Health Organization (WHO). <https://www.who.int/topics/cancer/es/>

¹¹ Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. *Int J. Cancer* **2021**. Doi: 10.1002/ijc.33588.

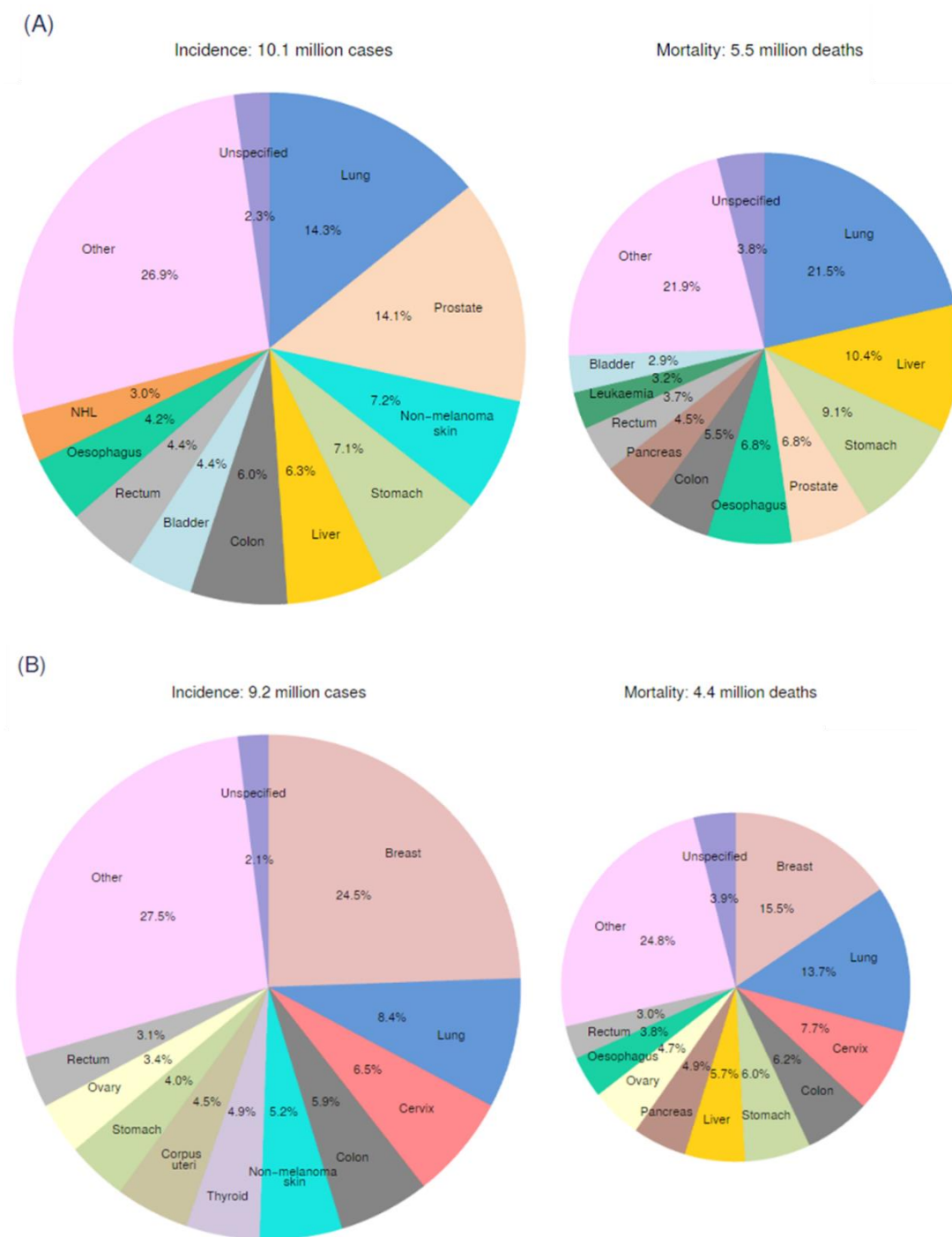


Figura 1.2. Distribución de nuevos casos y muertes estimados para los diez cánceres más comunes en 2020 en hombres (A) y mujeres (B). Para cada sexo, el área del gráfico circular refleja la proporción del número total de casos o muertes. LNH: linfoma no Hodgkin.¹¹

La carcinogénesis es el proceso por el cual las células normales se transforman en células tumorales. Esta conversión se debe a alteraciones, llamadas mutaciones, en el material genético de la célula, otorgándole la capacidad de dividirse a un ritmo mucho mayor del habitual. Las células

mutadas tienen una mayor tasa de supervivencia y crecimiento respecto de las células sanas, pudiendo así desarrollar una neoplasia.¹²

El 40% de los casos de cáncer se debe a la acción de agentes externos, llamados agentes carcinógenos, capaces de actuar sobre el organismo. Están relacionados con los hábitos de vida del individuo y son, por tanto, modificables. Algunos ejemplos serían el humo del tabaco, el consumo de alcohol, infecciones persistentes de virus, bacterias o parásitos, o la exposición a determinados tipos de radiación. En el resto de casos, los mecanismos por los que se origina el cáncer no se conocen con exactitud y pueden deberse a una predisposición genética a desarrollar ciertos tipos de neoplasias, mientras que en otras ocasiones pueden deberse a mutaciones espontáneas de genes o a la acción de algún agente externo todavía sin identificar.¹³

Las alteraciones genéticas en el proceso de carcinogénesis puede deberse a dos mecanismos principales:^{12,14}

- Activación de los protooncogenes en oncogenes. Los protooncogenes son genes involucrados en la diferenciación, crecimiento y proliferación celular, así como en la muerte celular programada, mecanismo que se conoce como apoptosis. La mutación de los protooncogenes los convierte en oncogenes, los cuales pueden hacer activar el proceso de conversión de las células normales en células cancerosas.
- Inactivación de los genes supresores de tumores. Los genes supresores de tumores se encargan de controlar la proliferación, reparación y apoptosis de las células. Su mutación conlleva la pérdida de su función y de las proteínas que codifican, por lo que los mecanismos de control y reparación internos de la célula fallan, permitiendo su proliferación y crecimiento de manera descontrolada.

La proliferación anormal de las células mutadas da lugar a la formación de tumores. En función del aspecto histológico, evolución y comportamiento biológico que presentan, se pueden clasificar en dos categorías: benignos o malignos. Los primeros tienen un crecimiento lento y su desarrollo es localizado y delimitado, es decir, no invaden tejidos adyacentes. Por el contrario, los tumores malignos crecen rápidamente y en muchos casos

¹² Sánchez, N. C. *Rev. Med. Clin. Condes.* **2013**, *24*, 553-562.

¹³ Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). <https://www.aecc.es>

¹⁴ Zakiryanova, G. K.; Wheeler, S.; Shurin, M. R. *Immunotargets Ther.* **2018**, *7*, 21-28.

generan metástasis, pudiendo migrar a otras zonas del organismo y generar nuevos tumores. Existe además el término premaligno, para referirse a un cambio tisular que podría dar lugar a un tumor maligno.¹⁵

El proceso de metástasis hace referencia a la habilidad de los tumores sólidos de alcanzar nuevos lugares en el organismo y formar tumores secundarios. Para ello, las células tumorales utilizan tanto el sistema linfático como la circulación sanguínea, ya que los capilares tienen un fino epitelio que permite el paso de células a través de ellos. Además, tanto los tumores primarios como los secundarios pueden aumentar su tamaño e infiltrarse en tejidos adyacentes, así como atravesar las cavidades corporales y pasar de un órgano a otro.¹⁶

El mecanismo de metástasis se puede dividir en dos fases y se muestra esquemáticamente en la Figura 1.3. En la primera fase se produce la etapa de translocación de las células cancerosas desde el tumor primario hasta un órgano distante. En la segunda fase se produce la colonización del órgano o tejido afectado por parte de las células tumorales.¹⁷

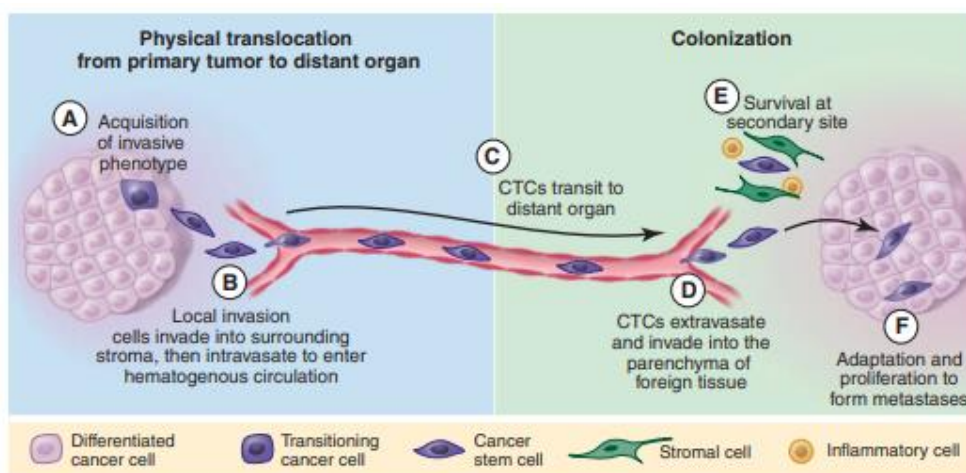


Figura 1.3. Proceso de metástasis tumoral.¹⁷

La fase A del esquema 1.3 representa el inicio del proceso de metástasis, que comienza cuando las células cancerosas presentes en el tumor primario adquieren un fenotipo invasivo. En la fase B las células tumorales invaden la matriz adyacente, lo que les permite alcanzar los vasos sanguíneos y acceder a la circulación sistémica. En la fase C las células cancerosas llegan a

¹⁵ Zaballos, P.; Garrido, A. M.; Rodero, J.; Ara, M. *Medicina Integral* **2001**, 37, 270-278.

¹⁶ Thurston, D. E.; Pysz, I. *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, 2ª ed. CRC Press. **2021**.

¹⁷ Chaffer, C. L.; Weinberg, R. A. *Science* **2011**, 331, 1559-1564.

órganos o tejidos distantes. Las células tumorales que viajan a través de la circulación son células madre del tumor primario, en inglés *cancer stem cell* (CTC), las cuales pueden sobrevivir incluso sin estar ancladas a una zona determinada del organismo. Una vez han alcanzado el órgano o tejido distante, las CTC salen de la circulación sistémica e invaden el parénquima del nuevo tejido, fase marcada con la letra D en el esquema 1.3. Para formar el nuevo tumor, las células tumorales tendrán que evadir la respuesta del sistema inmunitario y sobrevivir como una célula aislada o como un pequeño grupo de las mismas (fase E del esquema 1.3). Finalmente, para poder convertirse en un centro macrometastásico activo, la célula cancerosa deberá adaptarse al microambiente e iniciar la proliferación (fase F del esquema 1.3).

El proceso de metástasis es fundamental en el desarrollo y avance de la neoplasia. En función del tamaño del tumor y del grado de diseminación de las células cancerosas, se pueden distinguir diferentes estadios:^{18,19}

- Estadio 0: hace referencia al cáncer *in situ*, es decir, aquel que se encuentra en el lugar en el que se inició y no se ha diseminado a los tejidos adyacentes.
- Estadio I: tumor pequeño que no ha crecido profundamente en los tejidos próximos, no se ha diseminado a los ganglios linfáticos ni a otras partes del cuerpo.
- Estadio II y Estadio III: cánceres o tumores más grandes que han crecido más profundamente en los tejidos adyacentes. Es posible que se hayan diseminado a los ganglios linfáticos, pero no a otras partes del cuerpo.
- Estadio IV: el cáncer se ha diseminado a otros órganos o partes del cuerpo. Se conoce como cáncer avanzado o metastásico.

1.2.1. Señas de identidad del cáncer

Las células que progresan hacia un estado neoplásico muestran unas capacidades específicas que las distinguen de las células normales o sanas. En un artículo publicado en el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron seis propiedades comunes a todos los procesos tumorales. Posteriormente, en una revisión publicada en el año 2011, los mismos autores añadieron

¹⁸ American Society of Clinical Oncology (ASCO). <https://www.cancer.net>

¹⁹ Bajaj, J.; Diaz, E.; Reya, T. *J Cell Biol.* **2020**, *219*, 1-12.

cuatro características nuevas a las seis anteriores. Las diez señas de identidad del cáncer se definen brevemente a continuación:^{20,21}

- Desarrollo de inestabilidad genómica: mayor tendencia a mutaciones en las células cancerosas y que afectan sobre todo a los genes supresores de tumores, lo que redundará en un aumento de su división celular.
- Adquisición de potencial replicativo ilimitado (inmortalidad celular): activación en las células cancerosas para sintetizar la enzima telomerasa, evitando así el acortamiento de los telómeros, proceso fundamental para que se produzca la senescencia y la apoptosis.
- Insensibilidad a los supresores de crecimiento: resistencia de las células tumorales a la acción de los genes supresores de tumores y al control apoptótico, procesos ambos que permiten un control estricto sobre la muerte y la proliferación celular.
- Resistencia a la muerte celular programada (apoptosis): resistencia de las células cancerosas a la apoptosis mediante la activación de mecanismos intrínsecos, tales como mutaciones que evitan la detección de daños o previenen la señalización apoptótica, como ocurre con la caspasa-8, Bcl-2 y p53, que se encuentran entre las proteínas de señalización apoptóticas mutadas en muchos cánceres.
- Reprogramación del metabolismo energético: crecimiento rápido y desordenado de las células cancerosas que reprograman su metabolismo para satisfacer sus altos niveles de nutrientes y energía.
- Activación de la angiogénesis: formación por parte de las células cancerosas de nuevos vasos sanguíneos que les permiten recibir el aporte de nutrientes y oxígeno que necesitan para su crecimiento, así como un medio para la eliminación de sus desechos metabólicos.
- Evasión de la detección inmunológica por parte de los linfocitos T: evasión por parte de las células cancerosas de la acción supresora de células tumorales por parte de los linfocitos T. Estas células del sistema inmunológico adaptativo tienen la capacidad de reconocer y eliminar de forma selectiva patógenos y células tumorales, organizando una respuesta inmunitaria coordinada que abarca las respuestas innatas y adaptativas.

²⁰ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

²¹ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.

- Inflamación que promueve la progresión del tumor: secreción por parte de las células del sistema inmunitario, ubicadas en el microambiente tumoral, de factores que, en lugar de reconocer y destruir las células cancerosas, permiten el crecimiento y la metástasis.
- Inducción de señales proliferativas: liberación y respuesta por parte de las células tumorales de factores de crecimiento, sin necesidad de la estimulación por factores externos. Esto lo consiguen las células tumorales a través de tres vías de señalización principales: Akt, MAPK/ERK y mTOR. La activación de oncogenes, como *Myc*, también tiene un papel destacado.
- Invasión de los tejidos cercanos y desarrollo de metástasis: formación, fundamentalmente por vía sanguínea o linfática, de nuevos tumores distantes del tumor original. Esto permite a las células cancerosas colonizar otros órganos o tejidos y compromete las posibilidades de curación de la patología cancerosa.

En la Figura 1.4. se muestran de forma esquemática las diez señas de identidad del cáncer.

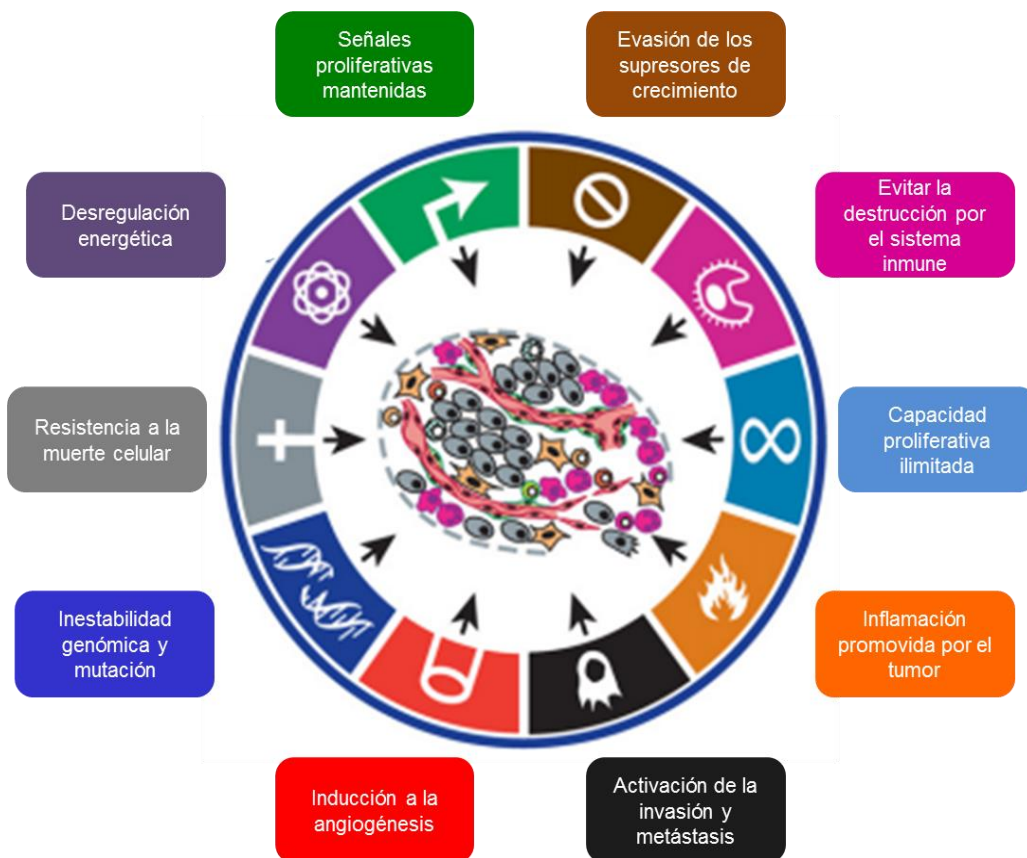


Figura 1.4. Señas de identidad del cáncer.²¹

1.2.2. Ciclo celular y cáncer

El ciclo celular es el proceso mediante el cual las células se multiplican y proliferan. El desarrollo de dicho ciclo en las células eucariotas está asociado con la expresión de un conjunto de genes específicos capaces de codificar proteínas que controlan la progresión del ciclo celular o funcionan en procesos metabólicos unidos a él. En el ciclo, la célula se divide en dos, y cada célula formada tiene los elementos estructurales y funcionales necesarios para repetir el proceso de crecimiento y división. Para ello, se necesita la replicación del genoma, una distribución equitativa de la masa celular y una disociación precisa de los cromosomas.²²

Existen dos periodos diferenciados en el ciclo celular, como se observa en la Figura 1.5. La interfase, que engloba las fases G₁, S y G₂, y la división celular, que abarca la fase M. Se puede apreciar una quinta fase, llamada G₀, en la que la célula no está en división y queda en estado de reposo, por lo que se encuentra fuera del ciclo celular.

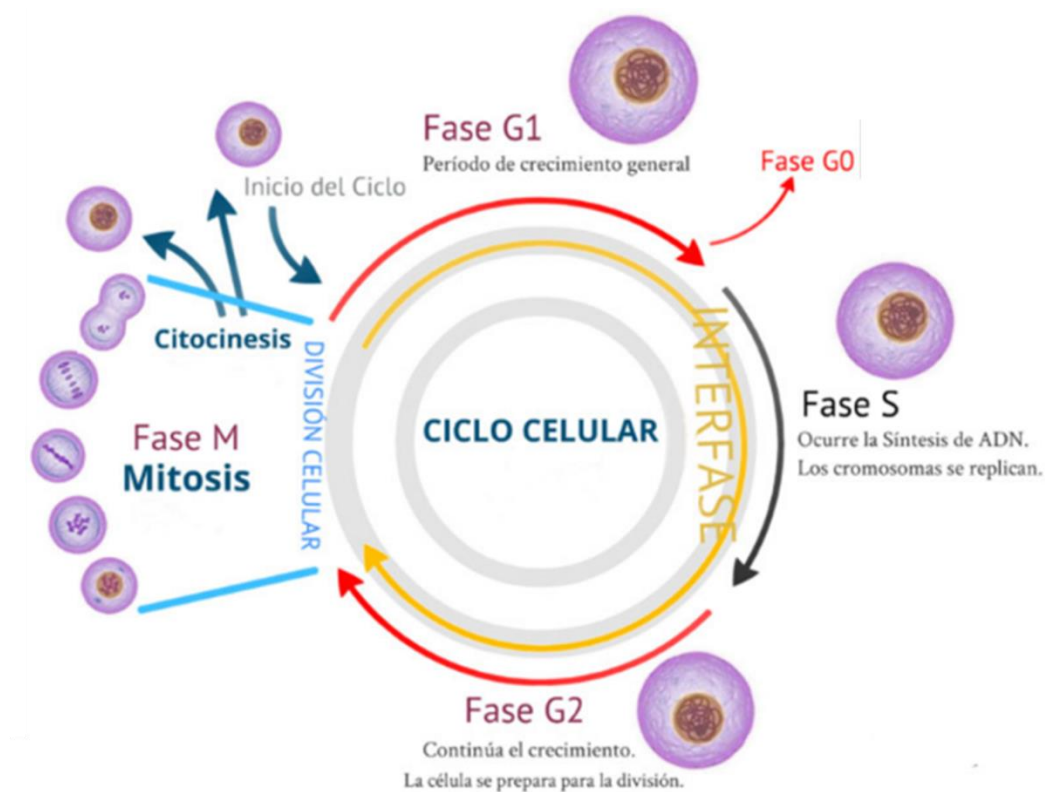


Figura 1.5. Esquema del ciclo celular eucariota.²³

²² Rodríguez, L.; Hernández, E.; Reyes, J. A. *Biotecnología Aplicada* 2004, 21, 60-69.

²³ <https://www.asturnatura.com/articulos/nucleo-mitosis-meiosis/ciclo-celular.php>

Durante la fase G_1 , conocida como la primera fase de crecimiento, la célula aumenta de tamaño y se sintetiza nuevo material citoplásmico, especialmente proteínas y ARN.

A continuación, en la fase S, o de síntesis, se produce la duplicación del ADN. Al finalizar esta etapa, el núcleo contiene el doble de ADN y proteínas nucleares, lo que asegura que cada una de las células hija tenga una copia completa del ADN de la célula progenitora.

En la fase G_2 , llamada segunda fase de crecimiento, se siguen sintetizando ARN y proteínas, por lo que la célula aumenta de tamaño. Se observan cambios visibles en la estructura celular que indican el inicio de la mitosis o división celular.

Por último, durante la fase M o mitosis se produce la división nuclear y celular, dando lugar a dos células idénticas.^{22,24} La mitosis se subdivide en profase, prometafase, metafase, anafase y telofase, tal y como se muestra en la Figura 1.6.

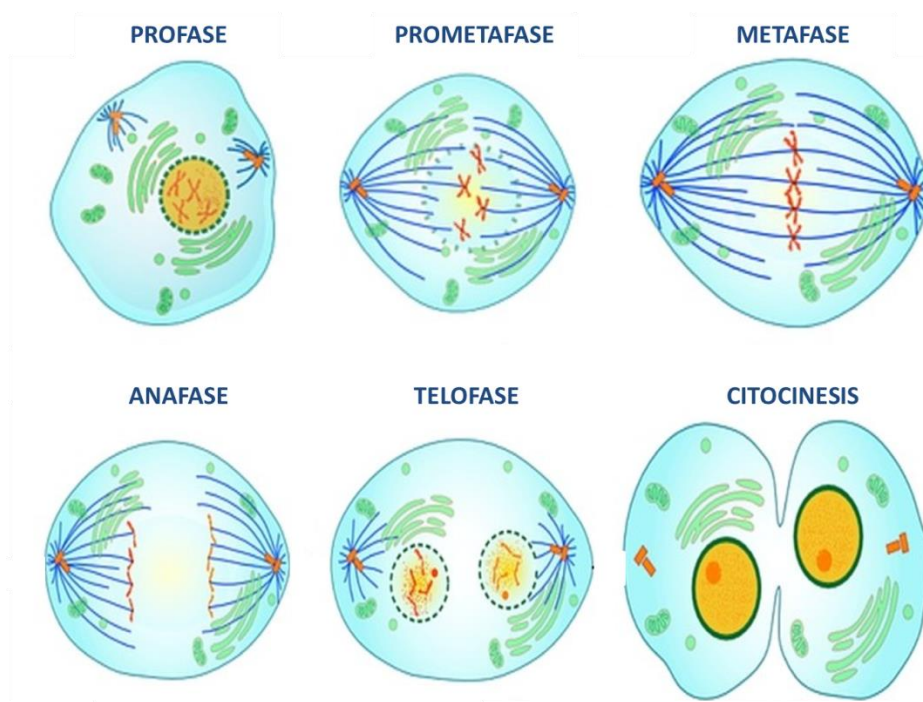


Figura 1.6. Fases de la mitosis y proceso de citocinesis en la célula eucariota.²⁵

La primera fase de la división nuclear es la profase, en la que comienza la condensación de la cromatina, de manera que los cromosomas reducen su

²⁴ Lagunas, M. C.; Valle, A.; Soto, I. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud* **2014**, *17*, 98-107.

²⁵ <https://www.todamateria.com/mitosis/>

longitud y aumentan de grosor. Los microtúbulos también disminuyen su longitud y adquieren dinamismo, en comparación con la interfase. Por su parte, los centrosomas se separan hacia los polos opuestos y organizan los microtúbulos. A continuación, la membrana nuclear se fragmenta, en una etapa conocida como prometáfase. Los microtúbulos que forman el huso se anclan al cinetocoro de los cromosomas.

En la metafase los microtúbulos unidos a los cinetocoros provocan el desplazamiento de los cromosomas al plano ecuatorial, haciendo que las cromátidas hermanas se orienten hacia los distintos polos del huso mitótico.

En la anafase, los microtúbulos tiran de los cromosomas, lo que acaba provocando la separación de las cromátidas hermanas y su desplazamiento hacia los polos opuestos de la célula.

En la telofase, se produce la descondensación cromosómica y la síntesis de la envoltura nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas.

Finalmente, para que la división mitótica sea completa, debe tener lugar el proceso de citocinesis, en el que se crea un anillo contráctil formado por actina y miosina. Este anillo ejerce presión en el ecuador de la célula dividiéndola así en dos células hijas independientes.^{26,27}

A lo largo del ciclo celular existen unos puntos de control que se encargan de regular la proliferación celular, el crecimiento y la síntesis de ADN, por lo que suponen una barrera para el desarrollo del cáncer al controlar la división inadecuada de las células. La fase G₁ es un punto importante de revisión, ya que la presencia de ADN dañado en esta fase provoca la parada del proceso de división celular. Otro punto de control a destacar es el conocido como G₂/M. En este punto de control se bloquea el inicio de la mitosis cuando el ADN ha sufrido algún daño durante G₁, S o en G₂.²⁴

La progresión de las fases del ciclo celular está controlada por una red de proteínas muy compleja y regulada. Entre esas proteínas destacan las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*) 1, 2, 4 y 6. Cuando las CDKs se unen a las ciclinas, forman el complejo CDK-ciclina, que es capaz de activar diferentes cascadas de señalización, promoviendo así la progresión del ciclo celular.²⁸

²⁶ Tineo, E.; Mavares, L.; Lubo, J. *Revista de Investigación* **2017**, *41*, 141-162.

²⁷ Civelekoglu-Scholey, G.; Cimini, D. *Interface Focus* **2014**, *4*, 1-9.

²⁸ Quezada, M. A. *ContactoS* **2007**, *65*, 5-12.

La inhibición de estas quinasas es un gran mecanismo de control del ciclo y proporciona una importante conexión con otras vías que participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y senescencia. Existe una familia de reguladores del ciclo celular que actúan como inhibidores de CDKs. A los genes que codifican dichos inhibidores se les conoce como inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs). Estos se unen a CDKs, o bien al complejo ciclina-CDK, bloqueando su actividad catalítica. Debido a esto, se clasifican como genes supresores de tumores.

Además de los CKIs, existen otros genes supresores de tumores que actúan a nivel del ciclo celular, como la proteína supresora tumoral del retinoblastoma (pRb) y la p53. La primera activa la vía Rb, la cual actúa especialmente en la fase G₁, aunque también participa en las otras fases del ciclo celular regulando procesos que pueden llevar a la célula hacia la progresión del ciclo o su detención temporal, diferenciación, senescencia o muerte celular. Por su parte, la proteína p53 se localiza en el núcleo y parece estar relacionada con diversas funciones biológicas, como el crecimiento de la célula, la progresión o detención del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis.²²

Cuando existen aberraciones en cualquier punto del ciclo celular y, por tanto, se producen desregulaciones del mismo, puede tener lugar el desarrollo de la neoplasia. La activación o sobreexpresión oncogénica de factores que potencian el ciclo y/o la inhibición de la muerte celular o de genes supresores de tumores, permiten la proliferación patológica responsable del crecimiento tumoral.²⁹

1.2.3. Apoptosis

La apoptosis consiste en un proceso de muerte celular altamente regulado, que se lleva a cabo de forma rutinaria y fisiológica en el organismo. A diferencia de la necrosis, que supone una forma más traumática de muerte de la célula, la apoptosis es un suceso racional en el que se sacrifican unas células específicas con el fin de obtener un mayor beneficio del organismo, como el mantenimiento de la homeostasis y el ajuste del ciclo de vida. La apoptosis puede ser activada tanto por señales intracelulares como por señales extracelulares.

²⁹ Intlekofer, A. M.; Finley, L. W. S. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 177-188.

La apoptosis actúa a través de la acción de un tipo de serina proteasas, conocidas como caspasas. Así, las señales responsables de la muerte celular se transmiten por vías de señalización que conducen, finalmente, a la activación de las caspasas responsables de llevar a cabo la destrucción de la célula.^{30,31}

El proceso apoptótico comienza con un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, abriéndose un poro ante un exceso de iones calcio y fosfato, lo que provoca la despolarización de la mitocondria y el desacoplamiento de la cadena respiratoria. Esta permeabilización de la membrana mitocondrial lleva a la liberación del citocromo c que, una vez en el citoplasma y junto con la molécula Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*), participa en la formación del complejo del apoptosoma. Este se encarga, en presencia de ATP, de reclutar y procesar la procaspasa 9 hasta su forma activa, la caspasa 9. En consecuencia, se inicia una cascada en la que se activan las caspasas 3 y 7, responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos de las células en apoptosis.

Por su parte, la proteína de translocación mitocondrial (TSPO, *translocator protein*) interactúa con los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC, *voltage-dependent anion channel*), para generar especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), lo que conduce a la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis y a la liberación del citocromo c. La caspasa 2, en situaciones de estrés genotóxico, también parece estar involucrada en las células apoptóticas en la liberación de citocromo c desde la mitocondria.³²

El mecanismo de apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo. Finalmente, la célula se rompe en fragmentos y se forman cuerpos apoptóticos (ApoBDs, *apoptotic bodies*), pequeñas vesículas que acaban siendo engullidas por fagocitos cercanos en un proceso llamado eferocitosis.

Actualmente, en el campo de la biomedicina se considera una vía con potencial actividad antitumoral, al provocar la muerte voluntaria de células aberrantes en respuesta a estímulos externos capaces de inducir apoptosis, como algunos fármacos de moléculas pequeñas que exhiben acción inductora de la apoptosis.^{30,31}

³⁰ Xu, X.; Lai, Y.; Hua, Z.-C. *Biosci Rep.* **2019**, *39*, 1-17.

³¹ Kaczanowski, S. *Phys. Biol.* **2016**, *13*(3):031001.

³² Sánchez, R.; Arboleda, G. *Nova* **2008**, *6*, 190-200.

1.2.4. Tratamiento y resistencia

Los tratamientos más empleados contra el cáncer son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y las terapias biológicas. Estos tratamientos se pueden utilizar de manera individual o combinada. La cirugía y la radioterapia son tratamientos muy eficaces en casos de tumores localizados no metastásicos, pero no resultan de utilidad cuando el cáncer se ha diseminado a diferentes zonas del cuerpo. Para el tratamiento de neoplasias con metástasis, el tratamiento de elección es el uso de fármacos (quimioterapia, terapia hormonal y terapias biológicas), ya que pueden llegar a todos los órganos y tejidos a través de la circulación sanguínea.^{33,34}

Los medicamentos tradicionales empleados en la quimioterapia se basan en compuestos citotóxicos que inhiben la rápida proliferación de las células tumorales. Sin embargo, estas sustancias también afectan a células sanas que presentan un rápido crecimiento (folículos pilosos, células de la médula ósea o células del tracto gastrointestinal), produciendo los conocidos efectos secundarios observados durante el tratamiento del cáncer. A pesar de importantes avances en este campo, como las quimioterapias combinadas o la aprobación de fármacos como el cisplatino y el paclitaxel, esta estrategia inespecífica fue, durante muchos años, el único enfoque terapéutico disponible para el tratamiento de cánceres con metástasis.

En los años cuarenta y cincuenta del siglo pasado se aprobaron por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*) los primeros compuestos destinados a combatir el cáncer y entre los que cabe mencionar al metotrexato, los fármacos antifolato o las mostazas nitrogenadas. Desde entonces los fármacos empleados en quimioterapia han evolucionado hacia tratamientos cada vez más eficaces y selectivos.

El descubrimiento de las redes de señalización celular, involucradas en el control de la proliferación y diferenciación, permitió diseñar fármacos capaces de actuar específicamente en estas vías, creando así la terapia dirigida a finales de 1990. Los tratamientos selectivos actúan sobre dianas moleculares, como receptores, factores de crecimiento o moléculas relacionadas con la apoptosis, que están presentes en tejidos sanos, pero que se encuentran

³³ Pérez-Herrero, E.; Fernández-Medarde, A. *Eur J Pharm Biopharm.* **2015**, *93*, 52-79.

³⁴ Mun, E. J.; Babiker, H. M.; Weinberg, U.; Kirson, E. D.; Von Hoff, D. D. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 266-275.

sobreexpresados o mutados en el cáncer. Estas terapias, entre las que se incluyen también la terapia hormonal y la inmunoterapia, inducen la apoptosis, estimulan el sistema inmunológico o incluyen fármacos específicos contra las células tumorales, minimizando así su efecto sobre células sanas y evitando los efectos secundarios indeseables.^{33,35}

Un aspecto fundamental en el empleo de la quimioterapia antitumoral es la aparición de resistencias por parte de las células cancerosas a los fármacos empleados. Las dos principales vías por las que se originan estos mecanismos de resistencia son:^{36,37}

- Resistencia intrínseca, debida a un fallo de la quimioterapia desde el inicio del tratamiento. En general, se debe a una mutación en algún gen supresor de tumores, como el *p53*.
- Resistencia adquirida, en la que inicialmente el tumor responde a la quimioterapia, pero más adelante se vuelve resistente al tratamiento inicial, incluso pudiendo aparecer resistencia a la terapia con otros fármacos diferentes del originalmente empleado.

La resistencia a múltiples compuestos antineoplásicos se denomina MDR, (*Multidrug resistance*) y se considera una de las principales causas de fallo clínico en el tratamiento de pacientes con neoplasia. El proceso de MDR se debe a que las células cancerosas expresan un fenotipo determinado, en el que la resistencia a un agente seleccionado se acompaña de resistencia cruzada a fármacos citotóxicos de diferente estructura y función, por lo que se puede desarrollar resistencia incluso empleando quimioterapia de combinación.

La resistencia relacionada con la glicoproteína P es el mecanismo de MDR más conocido.³⁸ El gen *MDR1* es el responsable de codificar esta glicoproteína, y se encuentra sobreexpresado en las células cancerosas. La glicoproteína P es una proteína de 170 kDa presente en la membrana celular, que forma parte de una familia de transportadores conocidos como transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Está implicada en el transporte activo de numerosas moléculas a través de la membrana plasmática,

³⁵ Lee, Y. T.; Tan, Y. J.; Oon, C. E. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *834*, 188-196.

³⁶ Ruiz, M. J.; Souvion, A.; Martínez, M. *An. Med. Interna* **2002**, *19*, 477-485.

³⁷ Astudillo-de la Vega, H.; Ruiz-García, E.; Martínez-Cedillo, J.; Ochoa-Carrillo, F. J. *GAMO* **2010**, *9*, 117-126.

³⁸ Sánchez-Suárez, P.; Benítez-Bribiesca, L. *Cancerología* **2006**, *1*, 187-199.

actuando como una bomba de expulsión ATP-dependiente. Esto provoca una disminución de la concentración intracelular de sustancias, incluidos los fármacos antitumorales.³⁹

Diferentes inhibidores o moduladores de la glicoproteína P se están investigando como estrategia terapéutica, para evitar de este modo la aparición de resistencias a los fármacos antineoplásicos. En la Figura 1.7. se muestra el mecanismo de acción de la glicoproteína P y su inhibición.⁴⁰

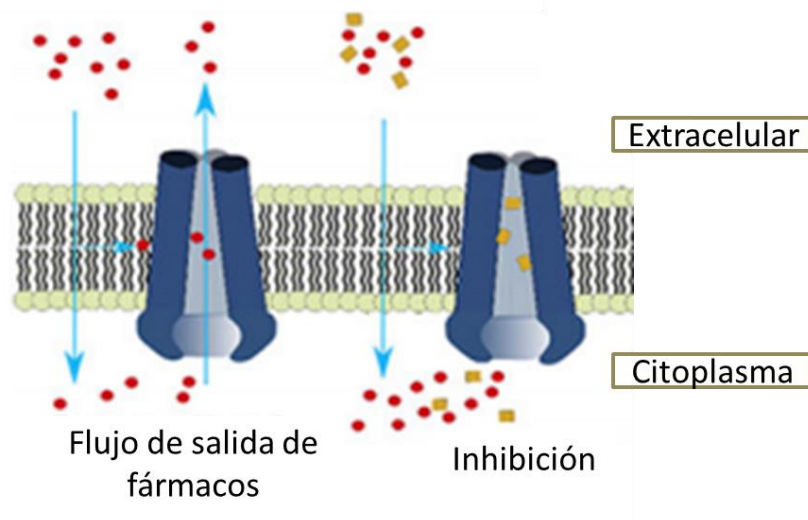


Figura 1.7. Mecanismo de acción de la glicoproteína P y su inhibición.⁴⁰

1.3. Fármacos antineoplásicos

1.3.1. Inmunoterapia

Una de las características comunes a todas las neoplasias, como se ha descrito anteriormente, es la capacidad de las células tumorales de evitar la detección y posterior destrucción por parte del sistema inmune.²¹ El estudio de los mecanismos que emplean las células cancerosas para evadir el control inmunitario ha hecho posible el desarrollo de un nuevo enfoque terapéutico: la inmunoterapia contra el cáncer. Este tratamiento ha supuesto una revolución en terapéutica ya que es la primera estrategia capaz de controlar la enfermedad durante periodos de tiempo prolongados. El desarrollo de este tratamiento ha sido posible gracias a la investigación acerca de los linfocitos T

³⁹ García-Carrasco, M.; Mendoza-Pinto, C.; Macías, S.; Vera-Recabarren, M.; Vázquez de Lara, L.; Méndez, S.; Soto-Santillán, P.; González-Ramírez, R.; Ruiz-Arguelles, A. *Autoimmun Rev.* **2015**, *14*, 594-600.

⁴⁰ Waghray, D.; Zhang, Q. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5108-5121.

y la inmunología tumoral, centrada en comprender la naturaleza de las señales que regulan la actividad de las células T.^{41,42}

La respuesta inmunitaria adaptativa, a diferencia de la innata, es capaz de responder frente a antígenos extraños de manera específica. En el caso de la activación de los linfocitos T, las células presentadoras de antígenos (APCs, *antigen-presenting cells*), entre las que se incluyen las células dendríticas, los macrófagos y las células B, procesan proteínas extrañas a péptidos pequeños, los cuales se presentan en complejos mayores de histocompatibilidad (MHCs, *major histocompatibility complexes*). MHC-I activa a las células T CD8+, mientras que MHC-II activa a las células T CD4+. Cuando se forma el complejo péptido-MHC, éste es reconocido por un único receptor de la célula T (TCR, *T cell receptor*), activándola de manera específica en un proceso conocido como señal 1, mostrado en la Figura 1.8. Además de la formación de este complejo, existe otro proceso necesario para la activación completa de la célula T y es la interacción coestimuladora entre CD28 y los ligandos B7, CD80 y CD86, representada en la misma figura y conocida como señal 2. En ausencia de coestimulación, se evita la activación completa de los linfocitos T y, a menudo, tiene lugar la apoptosis de la célula.⁴³

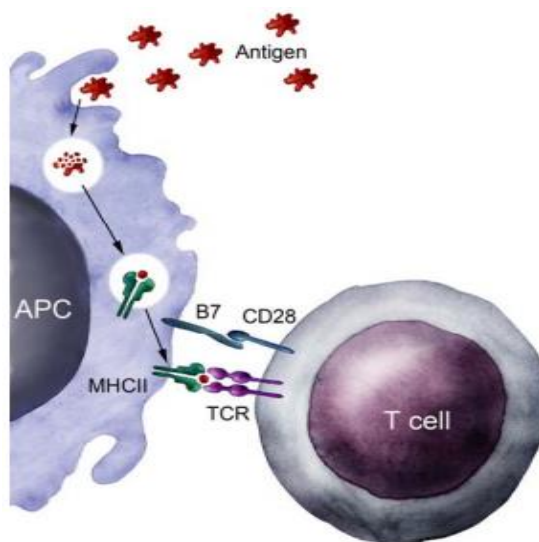


Figura 1.8. Activación de la célula T por las interacciones MHC II-TCR y B7-CD28.⁴⁴

⁴¹ Simó-Perdigó, M.; Vercher-Conejero, J.L.; Viteri, S.; García-Velloso, M. J. *Rev. Esp. Med. Nucl. Imagen Mol.* **2021**, *40*, 123-134.

⁴² Hargadon, K. M.; Johnson, C. E.; Williams, C. J. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *62*, 29-39.

⁴³ McMaster, W. G.; Kirabo, A.; Madhur, M. S.; Harrison, D. G. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 1022-1033.

⁴⁴ Sherif, A.; Winerdal, M. E.; Winqvist, O. *Egypt. J. Urol.* **2016**, *22*, 1-8.

Además del reconocimiento de antígenos específicos por parte del TCR, la activación de los linfocitos T está regulada por un equilibrio entre señales estimuladoras y señales inhibitoras proporcionadas por receptores coestimulatorios, tal y como se observa en la Figura 1.9. Los anticuerpos agonistas se unen a moléculas coestimuladoras capaces de activar a la célula T, como OX40 y CD137. De igual modo, el bloqueo de anticuerpos que se unen a moléculas coestimuladoras inhibitoras de la actividad linfocítica, como CTLA-4 y PD-1, puede aumentar la activación de los linfocitos T, con el fin de destruir la célula tumoral.⁴⁵

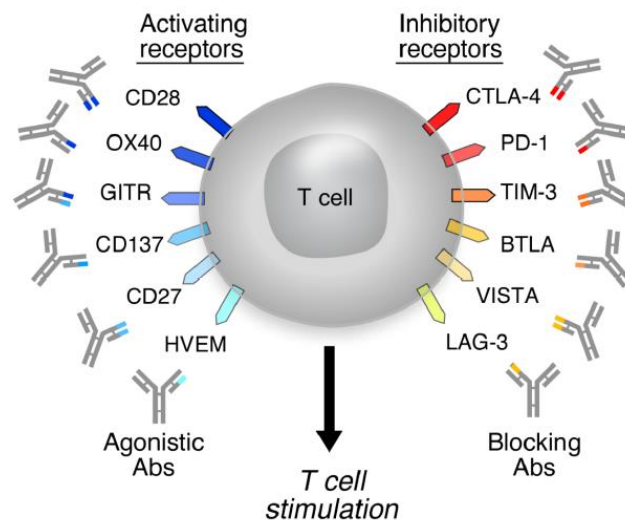


Figura 1.9. Dianas en las células T para la terapia con anticuerpos inmunorreguladores.⁴⁵

CTLA-4

El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y fue descrito por primera vez como una señal inhibitoria capaz de poner fin a la respuesta inmune. La activación de las células T es regulada negativamente por CTLA-4 de diferentes formas, tales como la competición con CD28 para unirse a sus ligandos comunes B7 (CD80 y CD86), como se muestra en la Figura 1.10. En humanos, el gen *CTLA-4* se localiza en el cromosoma 2q33, el cual consta de cuatro exones: el exón 1 codifica un péptido líder, el exón 2 el dominio de unión del ligando, el exón 3 el dominio transmembrana y, finalmente, el exón 4 el dominio citoplasmático.⁴⁶

⁴⁵ Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G. *Nature* **2011**, *480*, 480-489.

⁴⁶ Hosseini, A.; Gharibi, T.; Marofi, F.; Babaloo, Z.; Baradaran, B. *Int. Immunopharmacol.* **2020**, *80*, 1-15.

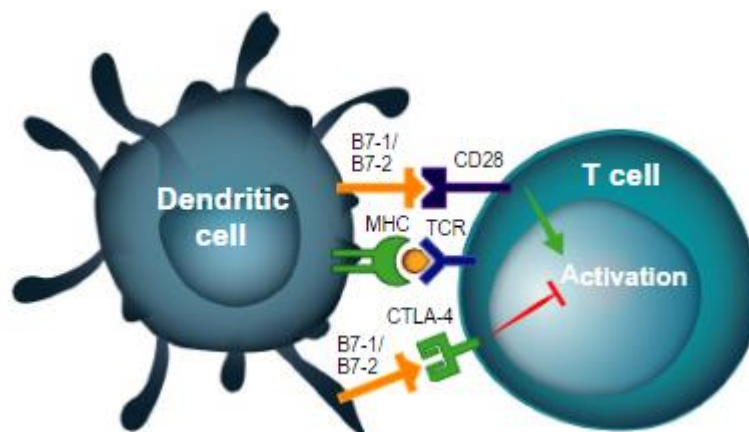


Figura 1.10. Inhibición de la activación de la célula T por la unión de los ligandos B7 a CTLA-4.⁴⁷

CTLA-4 y CD28 son receptores homólogos que realizan funciones opuestas en la activación de las células T, tanto de CD4+ como de CD8+. Estos receptores comparten unos ligandos, llamados CD80 y CD86, expresados en la superficie de las APC. CD28 interactúa con CD80 con una afinidad mayor que con CD86, llevando a cabo la coestimulación de los linfocitos T al inducir la producción de interleucina-2 (IL-2) y factores antiapoptóticos.^{48,49}

Por su parte, CTLA-4 interactúa con ambos ligandos con mayor afinidad que CD28. Así, la unión ligando-CTLA-4 inhibe la activación de las células T, ya que compite con CD28 por la unión del ligando y, de esta forma, actúa como antagonista de la coestimulación mediada por CD28. Respecto a su localización, a diferencia de CD28, que se expresa predominantemente en la membrana plasmática y coestimula las células T, CTLA-4 se encuentra principalmente en vesículas intracelulares en las células T reguladoras (T_{reg}) $FoxP3^+$ (*forkhead box P3*) o en células T convencionales activadas. Esta localización es debida a la rápida endocitosis de CTLA-4 de la membrana plasmática, haciendo que aproximadamente el 90% de CTLA-4 sea intracelular. Una vez en el interior, las moléculas de CTLA-4 se reciclan a la membrana plasmática o se degradan en los lisosomas, como se muestra en la Figura 1.11.⁵⁰

⁴⁷ LoRusso, P. M.; Schalper, K.; Sosman, J. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2020**, *33*, 390-402.

⁴⁸ Rowshanravan, B.; Halliday, N.; Sansom, D. M. *Blood* **2018**, *131*, 58-67.

⁴⁹ Grosso, J. F.; Jure-Kunkel, M. N. *Cancer Immun.* **2013**, *13*, 1-14.

⁵⁰ Buchbinder, E. I.; Desai, A. *Am. J. Clin. Oncol.* **2016**, *39*, 98-106.

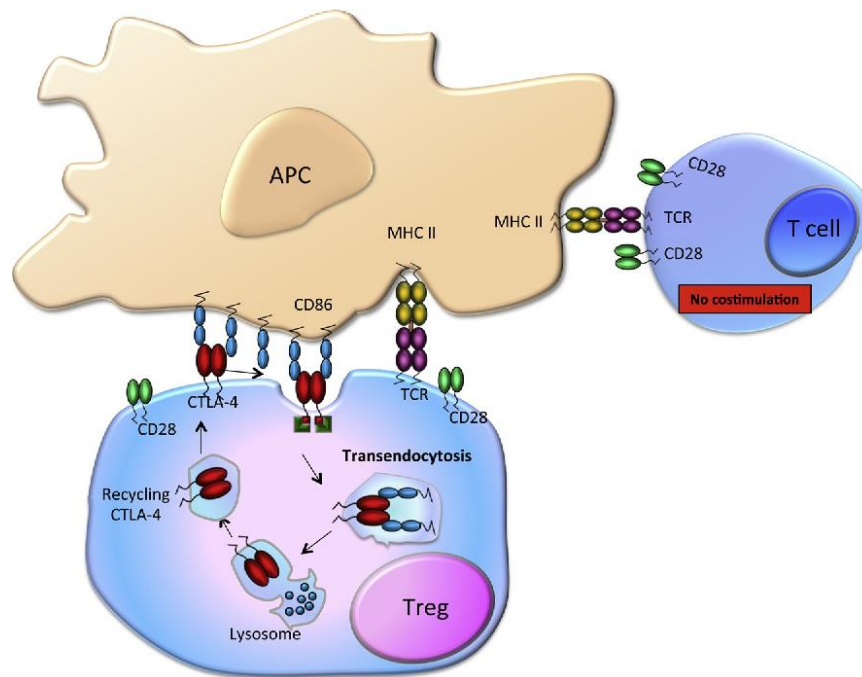


Figura 1.11. Vesículas que contienen la unión ligando (CD86)-CTLA-4 se fusionan con lisosomas: el ligando se degrada, mientras que CTLA-4 se recicla de nuevo a la superficie.⁵¹

Los mecanismos por los que CTLA-4 realiza su función no se conocen con exactitud, aunque se cree que puede actuar de diferentes modos. El más sencillo se basa en la competencia entre CD28 y CTLA-4 por la unión de sus ligandos, constituyendo un modelo de señalización inhibitoria intrínseca de la célula T. Sin embargo, existe un modelo molecular extrínseco, conocido como transendocitosis, en el que CTLA-4 captura los ligandos CD80 y CD86 y, por consiguiente, los elimina de las APC. Esto es posible gracias a que CTLA-4 es una molécula altamente endocítica capaz de unirse a ambos ligandos, lo que supone su eliminación en las células opuestas, reduciendo así la capacidad de las APC para estimular a través de CD28. De esta forma, el proceso de transendocitosis es un mecanismo específico capaz de controlar los niveles de expresión de CD80 y CD86 en las APC.⁵²

Los estudios realizados con anticuerpos específicos anti-CTLA-4 han demostrado que el bloqueo selectivo de esta diana mejora la respuesta inmunitaria antitumoral, tanto endógena como inducida. Un ejemplo es el anticuerpo humano Ipilimumab, el cual se une a CTLA-4 e impide su interacción con los ligandos B7, consiguiendo aumentar la actividad y

⁵¹ Soskic, B.; Qureshi, O. S.; Hou, T.; Sansom, D. M. *Adv. Immunol.* **2014**, *124*, 95-136.

⁵² Ovcinnikovs, V.; Ross, E. M.; Peterson, L.; Edner, N. M.; Heuts, F.; Ntavli, E.; Kogimtzis, A.; Kennedy, A.; Wang, C. J.; Bennett, C. L.; Sansom, D. M.; Walker, L. S. K. *Sci. Immunol.* **2019**, *4*, 1-30.

proliferación de células T, tal y como se muestra en la Figura 1.12. Este anticuerpo ha demostrado una mejora en la supervivencia de los pacientes con melanoma en un ensayo clínico de fase III, siendo el primer anticuerpo dirigido a células T que activa la inmunidad del paciente contra el cáncer.^{53,54}

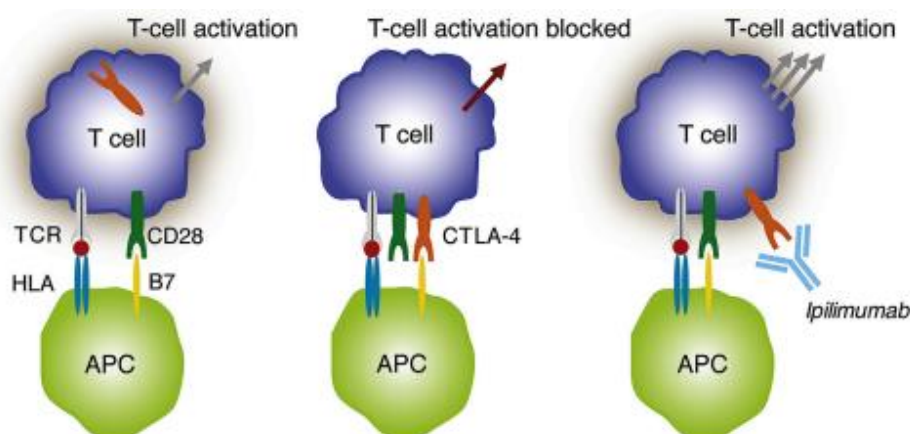


Figura 1.12. Mecanismo de acción de Ipilimumab.⁵⁴

Sin embargo, es conveniente destacar que la deficiencia de CTLA-4 en humanos provoca un síndrome complejo de desregulación inmunitaria, el cual incluye, entre otras complicaciones, procesos de autoinmunidad. Esto se debe a que las células T_{reg} no controlan la expresión de CD80 y CD86 en APC, y los pacientes presentan una disminución progresiva en el número de células B, provocado posiblemente por el agotamiento celular, consecuencia de la estimulación persistente dependiente de las células T. Las manifestaciones autoinmunes son frecuentes cuando hay deficiencia de CTLA-4, como es el caso de la artritis autoinmune, presente en el 14% de los pacientes. El fármaco Abatacept se emplea con éxito para tratar enfermedades autoinmunes y está aprobado para tratar esta patología, ya que se une a CD80 y CD86, inhibiendo la coestimulación y activación de las células T, lo que lleva a un descenso de mediadores de la inflamación.⁵⁵

PD-L1 y PD-1

La molécula de muerte programada 1 (PD-1, *programmed death 1*) es un receptor inhibitorio expresado en células inmunitarias, en las que se incluyen

⁵³ Liu, Y.; Zheng, P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2020**, *41*, 4-12.

⁵⁴ Lacouture, M. E.; Wolchok, J. D.; Yosipovitch, G.; Kähler, K. C.; Busam, K. J.; Hauschild, A. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2014**, *71*, 161-169.

⁵⁵ Lorenzetti, R.; Janowska, I.; Smulski, C. R.; Frede, N.; Henneberger, N.; Walter, L.; Schleyer, M. T.; Hüppe, J. M.; Staniek, J.; Salzer, U.; Venhoff, A.; Troilo, A.; Voll, R. E.; Venhoff, N.; Thiel, J.; Rizzi, M. *J. Autoimmun.* **2019**, *101*, 145-152.

los linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, monocitos y células asesinas naturales (NK, *natural killer*). Existen dos ligandos capaces de unirse a PD-1, como se muestra en la Figura 1.13: el ligando de muerte programada 1 (PD-L1, *programmed death-ligand 1*), también conocido como CD274 o B7-H1, y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2, *programmed death-ligand 2*), que también recibe los nombres de CD273 y B7-DC. Sin embargo, PD-L1 está más expresado tanto en células tumorales como en las sanas, por lo que la mayoría de estudios llevados a cabo se centran en la interacción PD-1/PD-L1.^{56,57,58}

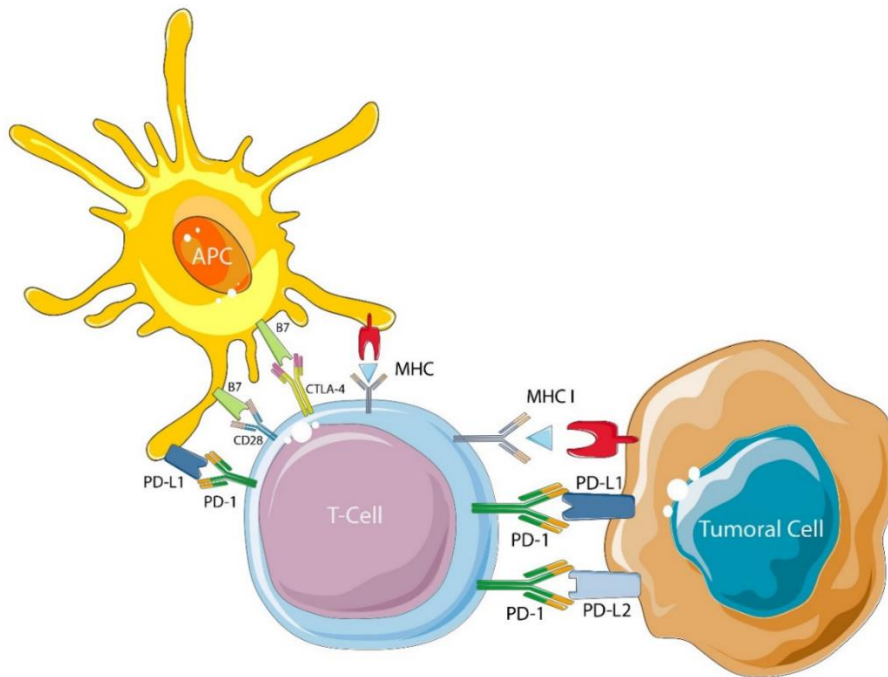


Figura 1.13. Interacción entre el receptor PD-1, presente en la célula T, con sus ligandos PD-L1 y PD-L2.⁵⁹

PD-1 es una proteína transmembrana de 55 kDa que contiene 288 aminoácidos, con un dominio N-terminal extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático, el cual está unido a dos inmunorreceptores conocidos como ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) e ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*), fundamentales para activar la vía de señalización. Estos receptores se unen a las proteínas tirosín fosfatasa SHP-1 (*Src homology región 2 domain-*

⁵⁶ Zhang, J.; Dang, F.; Ren, J.; Wei, W. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 1014-1032.

⁵⁷ Schütz, F.; Stefanovic, S.; Mayer, L.; von Au, A.; Domschke, C.; Sohn, C. *Oncol. Res. Treat.* **2017**, *40*, 294-297.

⁵⁸ Velho, P. I.; Antonarakis, E. S. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, *11*, 475-486.

⁵⁹ Perrier, A.; Didelot, A.; Laurent-Puig, P.; Blons, H.; Garinet, S. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1-30.

containing phosphatase 1) y SHP-2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2*), las cuales se fosforilan e interactúan con múltiples factores de transcripción, provocando la inhibición de los linfocitos T efectores. Por su parte, PD-L1 pertenece a la familia B7 y es una glicoproteína transmembrana de tipo 1 de 33 kDa, que contiene 290 aminoácidos con un dominio extracelular, un dominio transmembrana y otro citoplasmático que, a diferencia de PD-1, no se une a inmunorreceptores basados en tirosina.^{60,61}

Como se ha explicado anteriormente, para generar inmunidad antitumoral, es necesario un proceso integrado por varias etapas. Así, en primer lugar se produce la liberación y posterior presentación de antígenos de células cancerosas por las APC. A continuación, se amplifican y se activan las células T, las cuales se dirigen a los tumores siguiendo un gradiente de concentración de quimiocinas lo que les permite infiltrarse en ellos. Posteriormente, los linfocitos T reconocen a las células cancerosas y finalmente las destruyen. Existen numerosos factores que pueden actuar en este ciclo, ya sea estimulándolo o inhibiéndolo. Las células tumorales son capaces de resistir la apoptosis inducida por el sistema inmunológico por distintos mecanismos, entre los que se encuentran factores supresores en el microambiente tumoral TME (*tumor microenvironment*), que incluye PD-L1 y su interacción con PD-1. Por otro lado, PD-L1 no se une únicamente a PD-1, sino que también es capaz de unirse a CD80, expresado en las APC activadas, interacción que también inhibe las respuestas de las células T.^{62,63}

PD-L1 se expresa en una variedad de tipos celulares, como las de la placenta, el endotelio vascular, musculares o los linfocitos B y T. El ataque inmunológico a través de la liberación de interferón gamma (INF- γ) provoca una regulación positiva de PD-L1 por la mucosa para crear una barrera o escudo y así protegerse contra ataques autoinmunes, característicos en casos de inflamación crónica o infección. PD-L1 se une a PD-1 en las células T, lo que favorece el agotamiento de las mismas. Las células tumorales han adoptado este mecanismo regulador PD-1/PD-L1, diseñado para proteger la mucosa normal de ataques autoinmunes, como se muestra en la Figura 1.14. En su lugar, las células cancerosas sobreexpresan PD-L1 para evitar el

⁶⁰ Han, Y.; Liu, D.; Li, L. *Am. J. Cancer Res.* **2020**, *10*, 727-742.

⁶¹ Pinedo-Donelli, S.; Ball de Picón, E. *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.* **2018**, *46*, 30-37.

⁶² Kim, J. M.; Chen, D. S. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 1492-1504.

⁶³ Lei, Q.; Wang, D.; Sun, K.; Wang, L.; Zhang, Y. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 1-16.

control del sistema inmune y favorecer así el crecimiento y el desarrollo de la neoplasia.⁶⁴

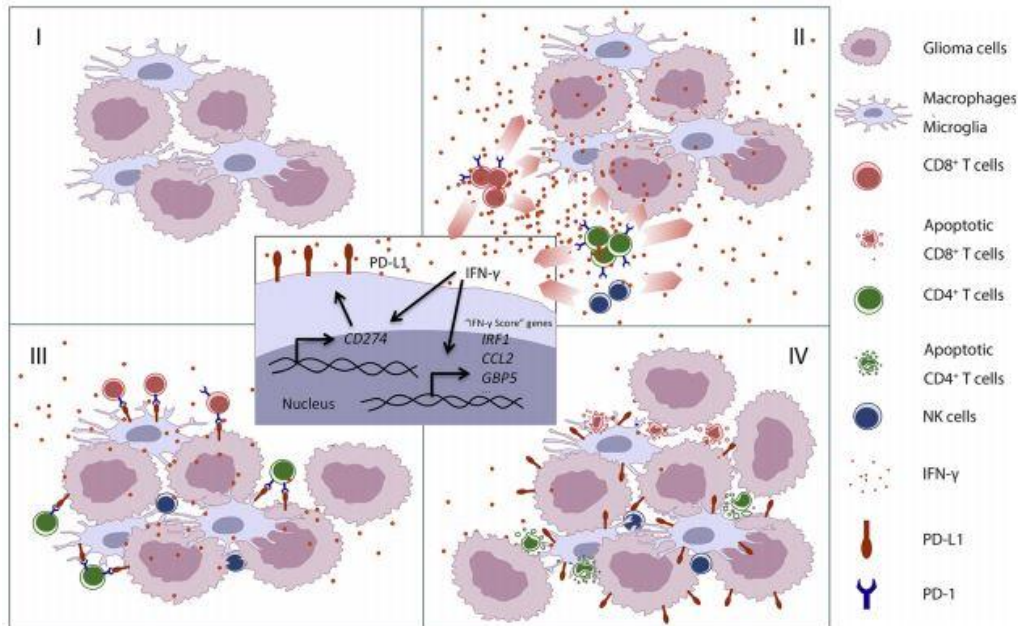


Figura 1.14. Mecanismo de regulación positiva inducida por IFN- γ de PD-L1 en el microambiente de glioma. El IFN- γ , secretado por las células T activadas y las células NK, induce la expresión de PD-L1 en las células tumorales, así como en la microglía y en las células inmunitarias infiltradas. La unión PD-L1/PD-1 hace que las células T que se infiltran en el tumor se conviertan en disfuncionales y entren en fase apoptótica.⁶⁵

La inmunoterapia contra la unión de PD-1 y PD-L1 reactiva las células T y mejora significativamente los efectos antitumorales en distintos tipos de tumores sólidos, incluidos el melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, *non-small cell lung cancer*), carcinoma urotelial y carcinoma de células renales, entre otros. No obstante, algunas investigaciones muestran que un gran número de pacientes sufrió resistencia primaria y no fue capaz de responder al bloqueo de PD-1/PD-L1, mientras que otros pacientes desarrollaron resistencia adquirida después de las respuestas iniciales. A continuación, se explica con más detalle ambos tipos de resistencias:^{63,66}

- **Resistencia primaria.** Para escapar de la terapia bloqueadora de la interacción PD-1/PD-L1, los tumores pueden crear un TME hostil a través de varios mecanismos, como una inmunogenicidad tumoral insuficiente,

⁶⁴ Patel, S. P.; Kurzrock, R. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 847-56.

⁶⁵ Qian, J.; Wang, C.; Wang, B.; Yang, J.; Wang, Y.; Luo, F.; Xu, J.; Zhao, C.; Liu, R.; Chu, Y. *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 1-13.

⁶⁶ Havel, J. J.; Chowell, D.; Chan, T. A. *Nat. Rev. Cancer.* **2019**, *19*, 133-150.

disfunción de la presentación del antígeno, un agotamiento irreversible de las células T, resistencia a la señalización de IFN- γ y la creación de un TME inmunosupresor, además de la mutación oncogénica clásica.

- *Resistencia adquirida.* Tras generar una respuesta inicial al bloqueo de PD-1/PD-L1, algunos pacientes pueden mostrar resistencia al tratamiento debido a que, durante el curso de la terapia, las células tumorales capaces de escapar de la inmunidad antitumoral ocupan gradualmente una proporción mayoritaria. Esto se debe a la capacidad de seleccionar subclones tumorales que pueden evitar la inmunidad anticancerosa. Por otro lado, la resistencia adquirida también puede deberse a la activación de vías inhibitorias compensatorias, independientes de PD-1/PD-L1, y al re-agotamiento de las células T, así como a una interrupción en la presentación de antígenos.⁶⁷

Existen diferentes estrategias para revertir esta resistencia a la terapia anti PD-1/PD-L1, como son aumentar la amplificación de los linfocitos T, revertir su agotamiento y potenciar su infiltración en el tumor. Además, también se puede mejorar el microambiente inmunosupresivo y establecer la combinación con otras terapias.⁶³ Es necesario profundizar en el estudio de los mecanismos reguladores de la expresión de PD-L1, con el fin de obtener posibles estrategias terapéuticas y biomarcadores para mejorar la respuesta a la inmunoterapia.⁶⁸

Una de los métodos que se emplea en la clínica para actuar sobre los puntos de control inmunitarios son los anticuerpos monoclonales, como nivolumab, pembrolizumab y cemiplimab, dirigidos a PD-1, o bien atezolizumab, avelumab y durvalumab, que actúan sobre PD-L1. La investigación en este campo fue reconocida en el año 2018 con el Premio Nobel de Medicina a James P. Allison y Tasuku Honjo. Sin embargo, el empleo en terapéutica de estos anticuerpos presenta una serie de desventajas como son la ausencia de biodisponibilidad oral, mala difusión y problemas de permeabilidad debido a su alto peso molecular. Además, estas terapias pueden causar problemas de toxicidad e inmunogenicidad, ocasionando reacciones adversas graves relacionadas con el sistema inmunitario, siendo letales en los casos más severos. Una posible alternativa

⁶⁷ Nowicki, T. S.; Hu-Lieskovan, S.; Ribas, A. *Cancer J.* **2018**, *24*, 47-53.

⁶⁸ Cha, J. H.; Chan, L. C.; Li, C. W.; Hsu, J. L.; Hung, M. C. *Mol Cell.* **2019**, *76*, 359-370.

magnética nuclear, conocido como SAR (*Structure-activity relationship*)-by-NMR (*Nuclear magnetic resonance*). Finalmente, se verificó que estas moléculas se unían a PD-L1. Respecto a su mecanismo de acción, para evaluar la afinidad de los compuestos con PD-L1 y PD-L2, se utilizó la técnica de fluorimetría diferencial de barrido (DSF, *differential scanning fluormetry*). El ensayo mostró que la unión de estas moléculas induce la estabilización térmica de la proteína diana y, además, los resultados sugieren que se unen de manera específica a PD-L1, pero no a PD-L2. Por último, se realizó la cristalización de los compuestos unidos a la proteína y se determinaron los sitios de unión, tal y como se muestra en las Figuras 1.16 y 1.17.^{69,70}

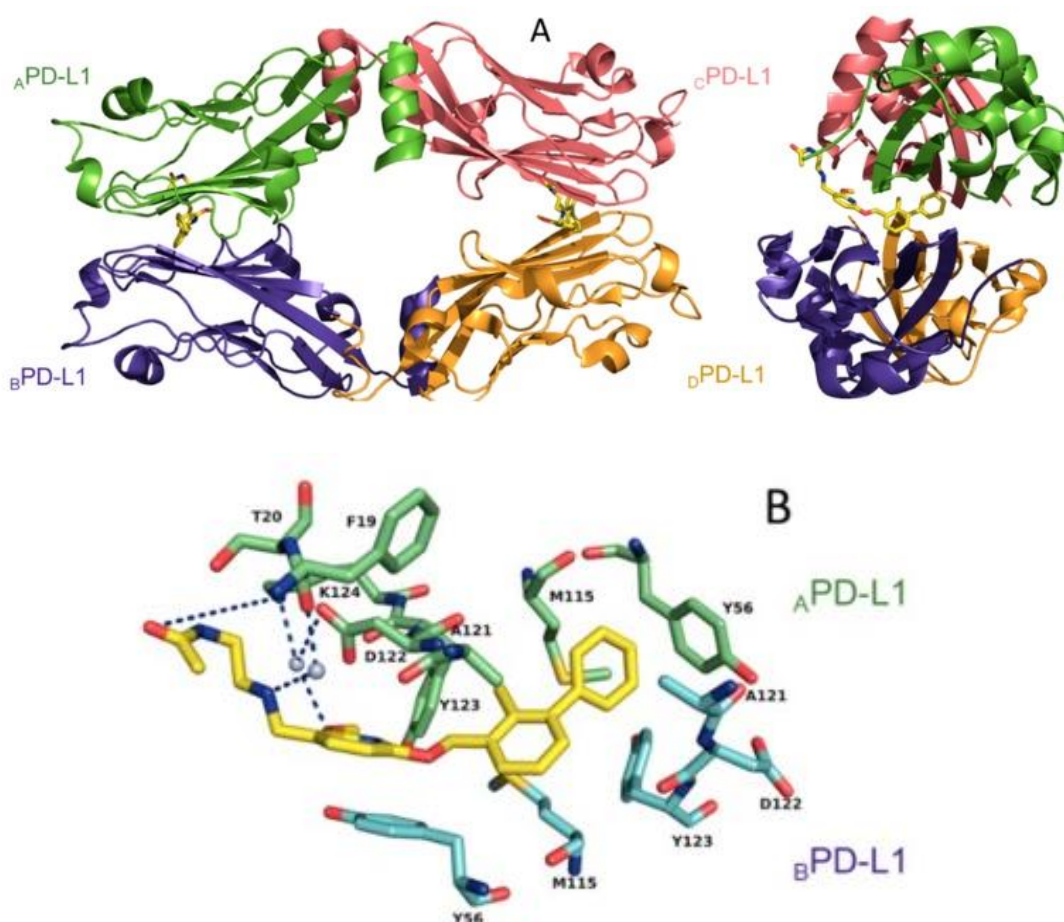


Figura 1.16. A. Estructura cristalizada del complejo BMS-202/PD-L1. La unidad asimétrica contiene cuatro moléculas de PD-L1, organizadas en dos dímeros. Cada dímerno se une a una sola molécula de BMS-202 (representado en color amarillo) en la interfaz de dicho dímerno. B. Interacciones de BMS-202 en la zona de unión del dímerno PD-L1. El compuesto se une a una cavidad hidrófoba formada tras la dimerización de PD-L1.⁶⁹

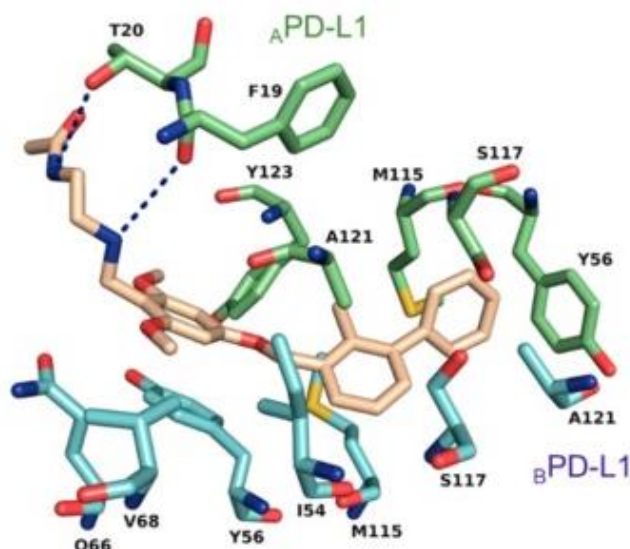


Figura 1.17. Interacciones de BMS-37 (representado en color salmón) en la zona de unión con PD-L1. Este compuesto se une a la cavidad hidrofóbica formada tras la unión de PD-L1.⁶⁹

Las moléculas como BMS-202 inhiben la interacción PD-1/PD-L1 al unirse al bolsillo hidrofóbico de PD-L1, formado por los aminoácidos Tyr56, Met115, Ile116, Ala121 y Tyr123, modificando la dimerización de la proteína PD-L1. De esta forma, la inhibición se produce por dos mecanismos complementarios. En uno de ellos la región de interacción PD-1/PD-L1 es ocupada por el inhibidor, bloqueando esta conexión. En el otro se produce la modificación del dímero PD-L1 de manera que la interacción entre PD-1 y PD-L1 no se puede producir.⁷¹

Una de las proteínas que es capaz de regular la expresión de PD-L1 en múltiples tipos de cáncer es *c-Myc*, que es un factor de transcripción oncogénico.⁶⁸ Cuando *c-Myc* está altamente expresado se produce un aumento de la expresión de PD-L1, suprimiendo tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa y favoreciéndose, de esta forma, el crecimiento tumoral. La inactivación de *c-Myc*, *in vitro* o *in vivo*, disminuye la expresión de ARNm y de la proteína PD-L1. Esto hace suponer que el desarrollo de una terapia que combine un inhibidor de *c-Myc* con inmunoterapia dirigida a PD-L1 podría ser una estrategia de tratamiento prometedora para determinados tipos de cáncer.^{72,73}

⁷¹ Martín-Beltrán, C.; Gil-Edo, R.; Hernández-Ribelles, G.; Agut, R.; Marí-Mezquita, P.; Carda, M.; Falomir, E. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 337.

⁷² Casey, S. C.; Tong, L.; Li, Y.; Do, R.; Walz, S.; Fitzgerald, K. N.; Gouw, A. M.; Baylot, V.; Gütgemann, I.; Eilers, M.; Felsner, D. W. *Science* **2016**, *352*, 227-31.

⁷³ Liang, M. Q.; Yu, F. Q.; Chen, C. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, *12*, 379-388.

Oncogen c-Myc

La familia *Myc* está integrada por tres genes humanos, conocidos como *c-Myc*, *l-Myc* y *n-Myc*. El protooncogen *c-Myc* presenta un homólogo viral, el gen *v-Myc*, el cual provoca mielocitomatosis en aves. El oncogén *v-Myc* presenta mutaciones que le confieren más potencia en los procesos de transformación, proliferación y apoptosis celular, favoreciendo la inmortalidad de las células cancerosas y, por tanto, la progresión del tumor en algunos tipos celulares de mamíferos y aves.⁷⁴

En las células normales, la regulación positiva de la expresión del gen *Myc* se produce en respuesta a diferentes señales mitóticas y de desarrollo celular. La proteína *Myc* es un factor de transcripción que actúa frente a estas señales y provoca cambios en la expresión génica, favoreciendo el crecimiento y la proliferación celular. En las células tumorales se producen alteraciones genéticas que impiden la regulación normal de la expresión de *Myc*, dando lugar a niveles elevados de proteína *Myc*, debido a mutaciones puntuales que aumentan la expresión, estabilidad y actividad de esta proteína. Pequeños cambios en la expresión de *Myc* ocasionan consecuencias en la célula y favorecen la formación de tumores. De igual modo, se ha visto que muchos tipos de cáncer presentan alteraciones en genes de la familia *Myc* asociadas con un aumento de ARNm y de proteína, y que la expresión del mismo es necesario para el inicio y el desarrollo tumoral.^{75,76}

Por lo que respecta a su conformación, la proteína *Myc* presenta una estructura básica de cremallera hélice-lazo-hélice (bHLHZ, *basic helix-loop-helix zipper*). Está compuesta por 439 aminoácidos y consta de un dominio N-terminal (NTD, *N-terminal domain*), un dominio C-terminal (CTD, *C-terminal domain*) y una región central.⁷⁷

El dominio NTD contiene, a su vez, el dominio de activación de la transcripción (TAD, *N-terminal transactivation domain*) y unos dominios tipo caja (MB, *MYC box*, I y II), relacionados con su estabilidad y activación y que

⁷⁴ Lee, C. M.; Reddy, E. P. *Oncogene* **1999**, *18*, 2997-3003.

⁷⁵ Schaub, F. X.; Dhankani, V.; Berger, A. C.; Trivedi, M.; Richardson, A. B.; Shaw, R.; Zhao, W.; Zhang, X.; Ventura, A.; Liu, Y.; Ayer, D. E.; Hurlin, P. J.; Cherniack, A. D.; Eisenman, R. N.; Bernard, B.; Grandori, C. *Cell Syst.* **2018**, *6*, 282-300.

⁷⁶ Le Grand, M.; Mukha, A.; Püschel, J.; Valli, E.; Kamili, A.; Vittorio, O.; Dubrovskaya, A.; Kavallaris, M. *Theranostics* **2020**, *10*, 6411-6429.

⁷⁷ Sammak, S.; Hamdani, N.; Gorrec, F.; Allen, M. D.; Freund, S.M.V.; Bycroft, M.; Zinzalla, G. *Biochemistry* **2019**, *58*, 3144-3154.

facilitan su asociación con cofactores. Por su parte, la zona central consta de una secuencia de localización nuclear (NLS, *nuclear localization sequence*) y los dominios caja MBIII y MBIV, que regulan la función apoptótica de MYC. Por último, el dominio CTD contiene el dominio bHLHZ, el cual facilita la interacción de Myc con su cofactor transcripcional MAX, permitiendo su unión al ADN.⁷⁸ En la Figura 1.18 se muestra la proteína Myc dimerizada con el factor de transcripción MAX (*Myc-associated protein X*), unida al ADN.

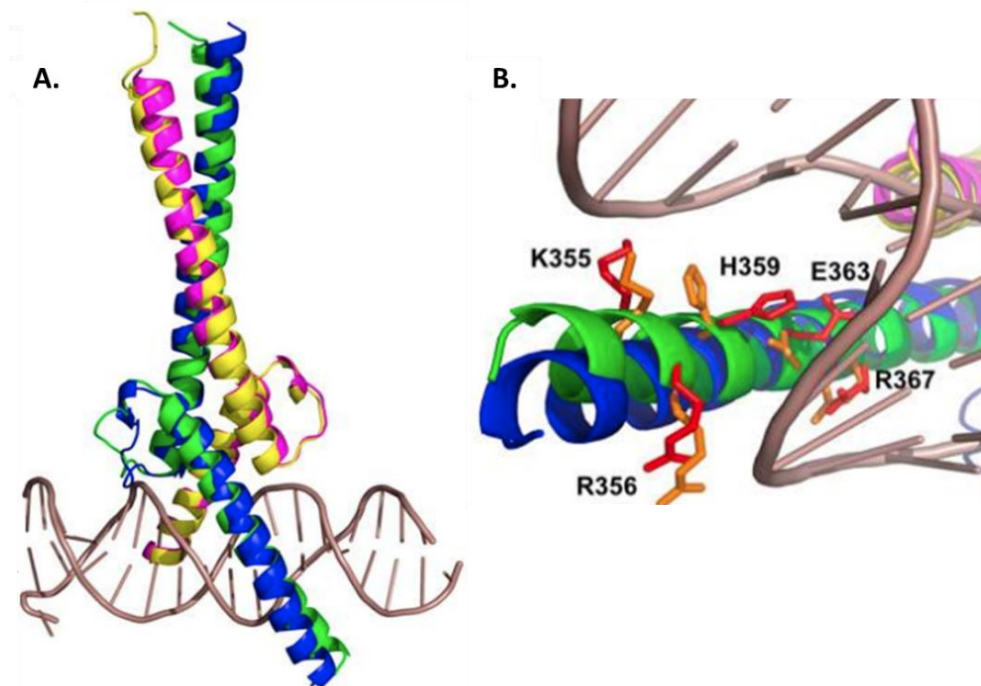


Figura 1.18. Complejo c-Myc/MAX unido al ADN. A. c-Myc está representado en color azul y verde, mientras que MAX está representado en magenta y amarillo. B. Interacciones de los aminoácidos Lys355, Arg356, His359, Glu363, y Arg367 de Myc con el ADN.⁷⁷

El dímero Myc/MAX se une al ADN en secuencias específicas, denominadas cajas E (E boxes) 5'-CA[C/T]GTG-3'. La unión de Myc es capaz de activar la transcripción de promotores que presentan la secuencia CACGTG. El heterodímero unido al ADN interacciona, mediante la región NTD de Myc, con múltiples proteínas implicadas en la transcripción de diversos genes. Sin embargo, los estudios muestran que cuando la proteína Myc se encuentra sola, es inactiva y no es capaz de formar homodímeros ni de unirse al ADN, por lo que su dimerización con MAX es fundamental para llevar a cabo su función. En cambio, la proteína MAX, cuando aparece

⁷⁸ Allen-Petersen, B. L.; Sears, R. C. *BioDrugs* **2019**, 33, 539-553.

aislada, sí que es capaz de formar homodímeros con facilidad y de unirse al ADN.⁷⁹

Debido al importante papel que la elevada expresión de *Myc* tiene en el desarrollo de la neoplasia, esta familia de genes se ha convertido en una importante diana terapéutica. Algunas de las estrategias empleadas en clínica consisten en inhibir el proceso de transcripción, silenciando el gen *Myc* y reduciendo así la expresión y actividad de la proteína. Otro método se basa en la utilización de compuestos que se unen al dominio bHLHZ, ya que éste es necesario para la dimerización de Myc con MAX y, por tanto, se bloquearía de este modo la unión al ADN. De igual modo, el uso de pequeñas moléculas como KI-MS2-008, cuya estructura se muestra en la Figura 1.19, capaces de activar la formación del homodímero MAX/MAX, permiten la degradación de Myc.⁸⁰ Por último, la inhibición de la regulación postraduccional de Myc también puede resultar de utilidad, pues la expresión y actividad de Myc están reguladas por una serie de proteínas que pueden convertirse en una posible diana terapéutica.⁷⁸

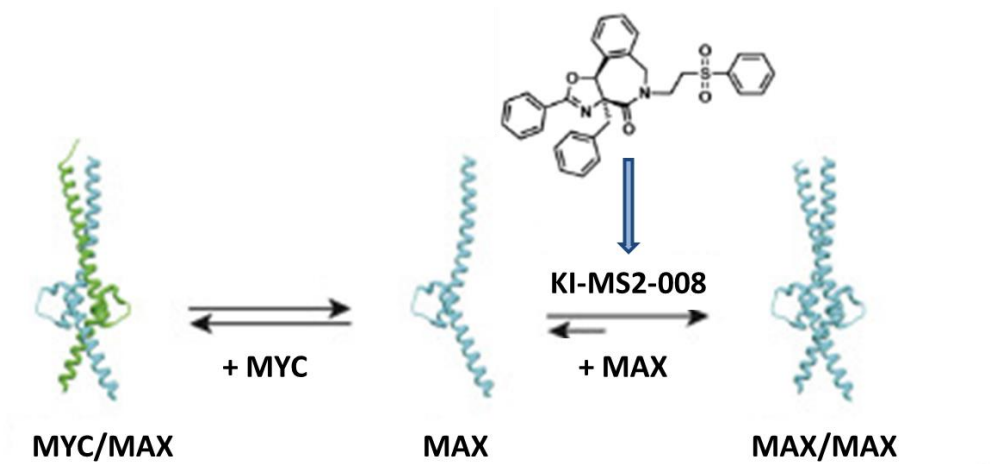


Figura 1.19. Estructura del compuesto KI-MS2-008 y su mecanismo de acción. Esta molécula pequeña activa la formación del homodímero MAX/MAX, reduciendo así el nivel de transcripción de la proteína Myc.⁸⁰

1.3.2. Inhibidores de quinasas

Las quinasas son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde el ATP a residuos específicos de tirosina, serina y/o

⁷⁹ Ospina, M.; Muñetón, C. M. *Iatreia* **2011**, *24*, 389-401.

⁸⁰ Struntz, N. B.; Chen, A.; Deutzmann, A.; Lin, C. Y.; Felsher, D. W.; Koehler, A. N. *Cell Chem. Biol.* **2019**, *26*, 711-723.

treonina, presentes en otras proteínas o sustratos.⁸¹ Este mecanismo es fundamental en la regulación de diversos procesos celulares, como el crecimiento, diferenciación o muerte de la célula, ya que se produce un cambio de conformación en la proteína fosforilada. Las quinasas alternan entre una conformación activa y una o más conformaciones inactivas. Cuando los mecanismos que regulan estos cambios sufren mutaciones puede producirse un crecimiento y proliferación celular patogénico. Por ello, estas enzimas desempeñan un papel crítico en el desarrollo tumoral.⁸²

La reacción de fosfotransferencia es un proceso altamente conservado, que depende de un conjunto de características estructurales del sitio activo que son comunes a todas las quinasas. Como se muestra en la Figura 1.20, cada quinasa consta de una estructura característica bilobular, con un lóbulo N-terminal y un lóbulo C-terminal y en cuya interfaz se encuentra el sitio de unión del ATP. El lóbulo N-terminal está formado por una hoja β de cinco hebras, acoplada a una hélice α (hélice α C). El bucle α C- β 4 es la única parte de este lóbulo que se encuentra firmemente anclado al lóbulo C-terminal, y se conoce como bisagra. Otro elemento fundamental en el lóbulo N-terminal es el bucle P, rico en glicina y bastante flexible, cuya función es posicionar correctamente los grupos fosfato del ATP para el proceso de catálisis.

Por su parte, el lóbulo C-terminal contiene principalmente hélices α y una hoja β . El subdominio helicoidal constituye el núcleo de la quinasa, en cuya superficie se fijan los sustratos de péptidos y proteínas, mientras que el subdominio β contiene la mayor parte de la maquinaria catalítica necesaria para la transferencia de grupos fosfato desde el ATP hacia el sustrato. En el lóbulo C-terminal también se encuentra el bucle de activación que contiene una secuencia conservada de DFG (Asp-Phe-Gly), en la que el aspartato se coordina con un catión Mg^{2+} que es fundamental para la acción fosforilante de la quinasa.^{83,84}

⁸¹ Pucheta-Martínez, E.; Saladino, G.; Morando, M. A.; Martínez-Torrecedrada, J.; Lelli, M.; Sutto, L.; D'Amelio, N.; Gervasio, F. L. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24235.

⁸² Shaw, A. S.; Kornev, A. P.; Hu, J.; Ahuja, L. G.; Taylor, S. S. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 1538-1546.

⁸³ Taylor, S. S.; Kornev, A. P. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 65-77.

⁸⁴ Dar, A. C.; Dever, T. E.; Sicheri, F. *Cell.* **2005**, *122*, 887-900.

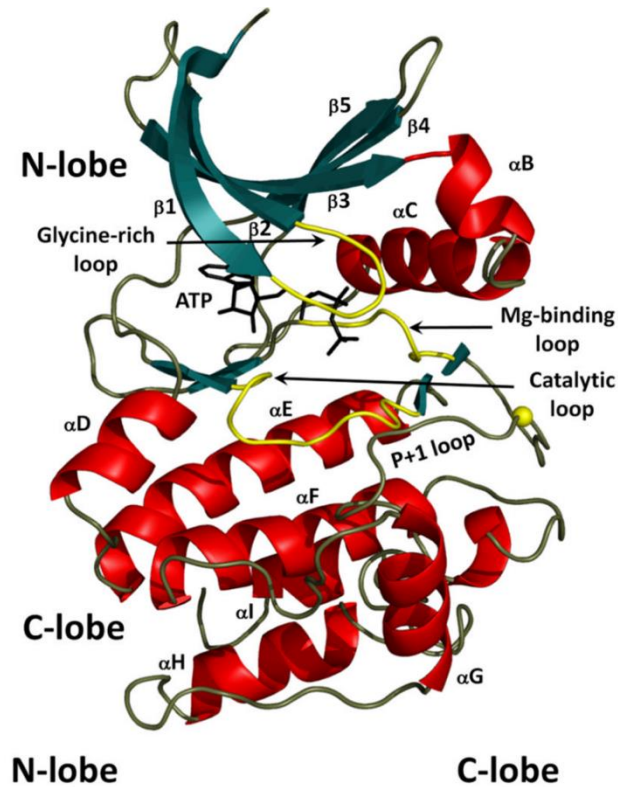


Figura 1.20. Estructura de una proteína quinasa unida a ATP.⁸⁵

La actividad de las proteínas quinasas está correlacionada con dos estructuras llamadas espinas o columnas R y C, las cuales presentan residuos hidrofóbicos que pueden ser ensamblados o desensamblados, dependiendo de la presencia del ATP o del sustrato.⁸⁵

- *Columna reguladora R.* Está implicada en la unión del sustrato y su correcto ensamblaje depende de la conformación del bucle de activación. Esta espina presenta cuatro residuos hidrofóbicos: Leu 106 en la hoja β4, Leu 95 en la hélice αC, Phe 185 en el motivo conservado DFG y Tyr 164 en el motivo conservado HRD, presente en el bucle catalítico.
- *Columna catalítica C.* Presenta el anillo de adenina del ATP y crea una conexión entre el lóbulo N-terminal y el C-terminal. En este último se encuentra la hélice αF (Met 128 y Leu 172) que se conecta con la espina reguladora por un residuo de aspartato (Asp 220) y que es un elemento estructural esencial en la activación de las quinasas.

Las quinasas presentan un equilibrio entre su estado inactivado y el estado activado, tal y como se muestra en la Figura 1.21 y en la Figura 1.22.

⁸⁵ Jura, N.; Zhang, X.; Endres, N. F.; Seeliger, M. A.; Schindler, T.; Kuriyan, J. *Mol. Cell.* **2011**, *42*, 9-22.

En el primero, también conocido como *DFG-out*, el bucle de activación se dirige hacia la zona de unión al ATP e impide la entrada del mismo, debido al bloqueo producido por la fenilalanina del dominio DFG. Esto se debe a que las columnas C y R están desmontadas, lo que provoca la ubicación de la fenilalanina del motivo DFG en el bolsillo catalítico. Por el contrario, en el estado activado, o *DFG-in*, el bucle de activación se sitúa lejos del bolsillo catalítico, permitiendo la entrada del ATP. En este estado, las columnas C y R están ensambladas, por lo que la fenilalanina se mantiene alejada y el aspartato del dominio DFG ocupa el bolsillo de unión, permitiendo a la quinasa realizar su actividad catalítica.^{85,86}

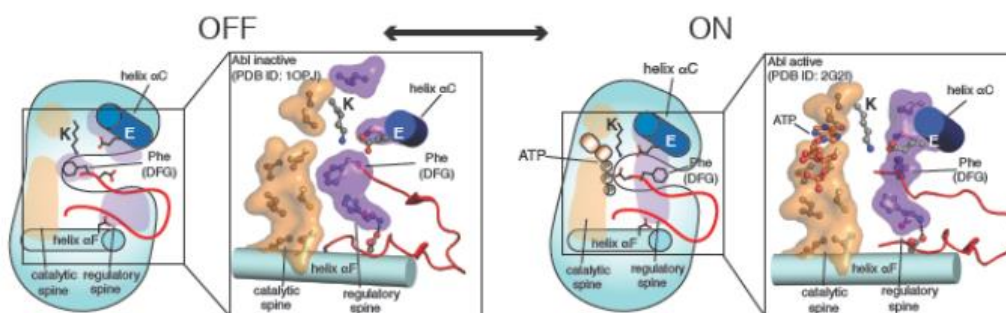


Figura 1.21. Representación del desmontaje de las columnas hidrofóbicas (columna R y C) en el estado inactivo de una quinasa y de su ensamblaje en el estado activo. Las ampliaciones de la derecha muestran los residuos correspondientes a las columnas R y C en la quinasa Abl inactiva y en la quinasa Abl activa.⁸⁵

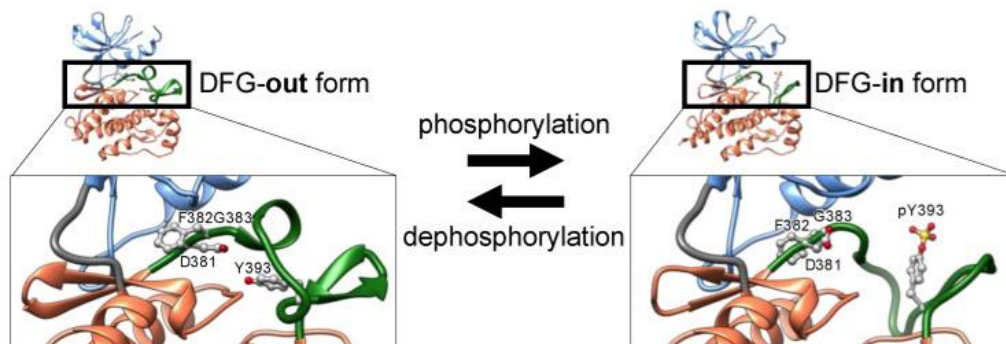


Figura 1.22. Cambio conformacional de la quinasa Abl entre los estados *DFG-out* inactivo y *DFG-in* activo mediante la fosforilación y desfosforilación del bucle de activación. La orientación del grupo fenilo de F382 se altera dinámicamente en la transición.⁸⁷

La secuenciación del genoma humano permitió identificar, aproximadamente, 518 proteínas quinasa, de las cuales 90 son tirosina

⁸⁶ Wang, Z.; Cole, P. A. *Methods Enzymol.* **2014**, 548, 1-21.

⁸⁷ Umezawa, K.; Kii, I. *Molecules* **2021**, 26, 651.

quinasas, y de estas 58 son tirosina quinasa receptoras (RTKs, *receptor tyrosine kinases*) y 32 son quinasas no receptoras (NRTKs). Los RTKs son una clase de enzimas que se autofosforilan y/o fosforilan un residuo de tirosina de otra proteína.⁸⁸ Las RTKs están implicadas en la comunicación entre las células y su entorno extracelular⁸⁹ y tienen un importante papel en el crecimiento, diferenciación, movilización y metabolismo celular.⁹⁰ Su estructura general se muestra en la Figura 1.23 y consta de:

- Un dominio N-terminal extracelular (ECD, *extracellular domain*), con una zona de unión para los ligandos.
- Un dominio transmembrana (TMD, *transmembrane domain*) en forma de hélice.
- Una región intracelular, formada por una región reguladora yuxtamembrana, un dominio de tirosina quinasa (TKD, *tyrosine kinase domain*) y una cola C-terminal.

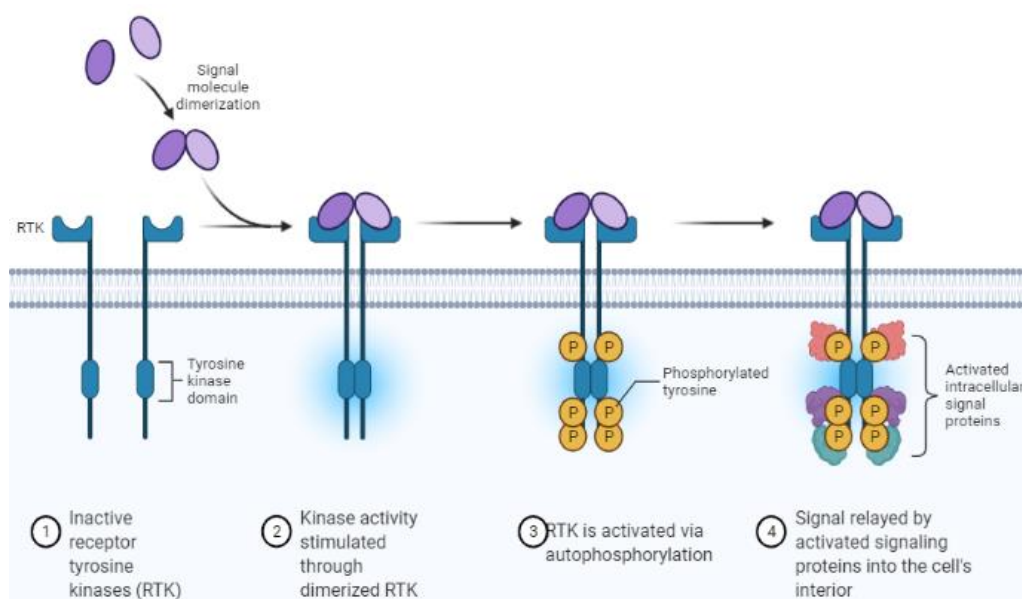


Figura 1.23. Estructura general de los RTKs y su proceso de activación, a través de la unión del ligando al RTK, lo que provoca la dimerización del receptor e inicia un mecanismo de autofosforilación. Imagen elaborada con BioRender.

En general, cuando no está presente el ligando, los RTKs se encuentran acopladas en la membrana plasmática de la célula como monómeros, los cuales constituyen la forma inactiva del receptor. Tras la unión del ligando, se

⁸⁸ Kashyap, M. K.; Abdel-Rahman, O. *Mol. Cancer*. **2018**, *17*, 54.

⁸⁹ Trenker, R.; Jura, N. *Curr Opin Cell Biol*. **2020**, *63*, 174-185.

⁹⁰ Du, Z.; Lovly, C. M. *Mol Cancer* **2018**, *17*, 58.

produce la homo o heterodimerización del receptor y su activación a través de varios mecanismos. La mayor parte de los RTKs se activan a través de un proceso conocido como transfosforilación, mientras que otros lo hacen mediante cambios conformacionales provocados por la interacción de los dominios tirosina quinasa. Independientemente del mecanismo, el resultado es la fosforilación de residuos de tirosina en la región citosólica, que son lugares de acoplamiento de proteínas de señalización intracelular. Estas proteínas se unen a un sitio concreto del receptor, mediante un dominio que suele ser el SH2 (Src Homology 2) o el de unión a una fosfotirosina (PTB, *phosphotyrosine binding*).⁹¹

Las mutaciones genéticas de los RTKs afectan a la correcta transmisión de señales en la célula y causan alteraciones en funciones tan importantes como la proliferación, la diferenciación y la migración celular. Esto hace que tengan un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo de diferentes tipos de cáncer y, en consecuencia, se hayan convertido en prometedoras dianas terapéuticas contra esta enfermedad. El receptor de insulina (IR, *insulin receptor*) y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*) son dos ejemplos de RTKs que han despertado el interés en el campo de la investigación, con el objetivo de diseñar posibles inhibidores de estos receptores y detener así el proceso tumoral.

1.3.2.1. Terapia antiangiogénica

El sistema circulatorio sanguíneo es esencial para que los tejidos obtengan nutrientes y oxígeno, además de retirar sustancias de desecho y mantener de este modo la homeostasis celular. Está constituido por la sangre, el corazón y los vasos sanguíneos, los cuales se dividen a su vez en las siguientes estructuras, representadas en la Figura 1.24.^{92,93}

⁹¹ Esteban-Villarrubia, J.; Soto-Castillo, J. J.; Pozas, J.; San Román-Gil, M.; Orejana-Martín, I.; Torres-Jiménez, J.; Carrato, A.; Alonso-Gordo, T.; Molina-Cerrillo, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8529.

⁹² Ortega, A. *Anatomofisiología y patología básicas*. Altamar S.L. **2019**.

⁹³ Vidal, L. *Anatomofisiología y patología básicas*. Paraninfo. **2012**.

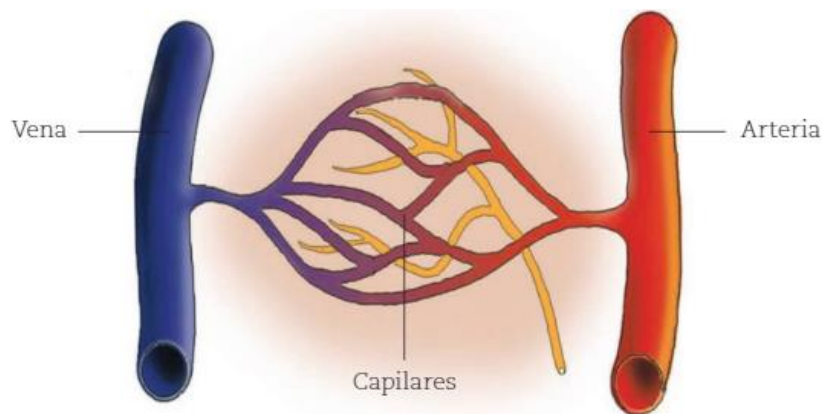


Figura 1.24. Tipos de vasos sanguíneos.⁹²

- **Arterias:** conducen la sangre procedente del corazón al resto del organismo, para que los tejidos dispongan de oxígeno y nutrientes. Para lograr este objetivo, deben alcanzar diferentes regiones corporales, por lo que se van ramificando en vasos cada vez más pequeños y estrechos, llamados arteriolas que, posteriormente, dan lugar a capilares. Debido a la presión que ejerce la sangre, sus paredes son más gruesas que las de las venas.
- **Capilares:** están formados por un epitelio muy fino, por lo que en estas estructuras tiene lugar el intercambio de sustancias, ya que la difusión a través de sus paredes se produce con mucha facilidad. En este proceso, la sangre cede oxígeno y nutrientes a los tejidos, mientras que los productos de desecho de los mismos pasan a la sangre para su posterior eliminación. Cuando finaliza el intercambio, los capilares van creando vasos cada vez más gruesos, llamados vénulas, las cuales darán lugar a las venas.
- **Venas:** conducen la sangre de nuevo al corazón. Para realizar este proceso, que en muchas ocasiones se produce en contra de la gravedad, las venas disponen de unas estructuras llamadas válvulas semilunares, que impiden el retroceso de la sangre.

Las células tumorales requieren de oxígeno y nutrientes para sobrevivir y poder proliferar a otros órganos o tejidos, por lo que necesitan situarse cerca de estos vasos sanguíneos y acceder a través de ellos al sistema circulatorio.⁹⁴

⁹⁴ Lugano, R.; Ramachandran, M.; Dimberg, A. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 1745-1770.

Angiogénesis

El proceso de angiogénesis consiste en la formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de otros ya existentes. La angiogénesis fisiológica tiene un papel fundamental en el desarrollo embrionario y continúa durante el resto de la vida. En este mecanismo existe un equilibrio entre agentes pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, por lo que se trata de un proceso regulado. Sin embargo, muchas patologías, como el cáncer, presentan una angiogénesis anormal, en la que este equilibrio se altera y las moléculas pro-angiogénicas están constantemente estimuladas favoreciendo el desarrollo de la enfermedad.⁹⁵ Existen dos mecanismos principales de angiogénesis:⁹⁶

- *Angiogénesis intususceptiva*: consiste en un proceso de división de vasos sanguíneos preexistentes debido a la inserción de pilares transcapilares o de matriz extracelular. Este mecanismo no depende de la proliferación de las células endoteliales.
- *Angiogénesis tipo “brote”*: recibe este nombre porque es similar al brote de las ramas de los árboles, ya que se ramifican los vasos sanguíneos existentes. Es el mecanismo más habitual de angiogénesis tumoral y tiene lugar en una serie de pasos. En primer lugar se inicia la ramificación o brote tras degradarse la membrana basal del vaso sanguíneo principal. A continuación tiene lugar el crecimiento de los brotes por la proliferación y migración de las células endoteliales. Tras esto, se produce una anastomosis de los brotes y, finalmente, los nuevos vasos maduran y se remodelan, generando una nueva membrana basal.

Además de estos dos procesos destacados, existen otros mecanismos de vascularización que se explican brevemente a continuación.⁹⁷

- *Cooptación de los vasos*: las células cancerosas se desplazan por los vasos sanguíneos ya existentes del órgano huésped para obtener los nutrientes que necesitan. Se produce habitualmente en órganos muy vascularizados.
- *Mimetismo vasculogénico*: es otro mecanismo de vascularización tumoral no angiogénico, que tiene lugar en cánceres altamente agresivos y desregulados genéticamente. Consiste en que las células tumorales son

⁹⁵ Ma, Q.; Reiter, R. J.; Chen, Y. *Angiogenesis* **2020**, 23, 91-104.

⁹⁶ Hu, J.; Frömel, T.; Fleming, I. *Cancer Metastasis Rev.* **2018**, 37, 425-438.

⁹⁷ Li, S.; Xu, H. X.; Wu, C. T.; Wang, W. Q.; Jin, W.; Gao, H. L.; Li, H.; Zhang, S. R.; Xu, J. Z.; Qi, Z. H.; Ni, Q. X.; Yu, X. J.; Liu, L. *Angiogenesis* **2019**, 22, 15-36.

capaces de imitar a las células endoteliales y formar así canales similares a los vasos sanguíneos.

- Vasculogénesis: formación espontánea de nuevos vasos sanguíneos mediada por las células progenitoras endoteliales (EPCs, *endothelial progenitor cells*) derivadas de la médula ósea.

El proceso de angiogénesis es necesario para que puedan crecer tumores de un tamaño superior a 1-2 mm³, aproximadamente.⁹⁸ Así, las células cancerosas secretan sustancias químicas capaces de inducir la angiogénesis, las cuales actúan como agentes pro-angiogénicos (angiopoyetina, factor de crecimiento de fibroblastos o la interleucina 8). Sin embargo, otras moléculas tienen una función anti-angiogénica (angiostatina, interleucina 12 o la endostatina) y son necesarias para mantener un equilibrio en la remodelación de los vasos sanguíneos, como se muestra en la Figura 1.25.⁹⁹

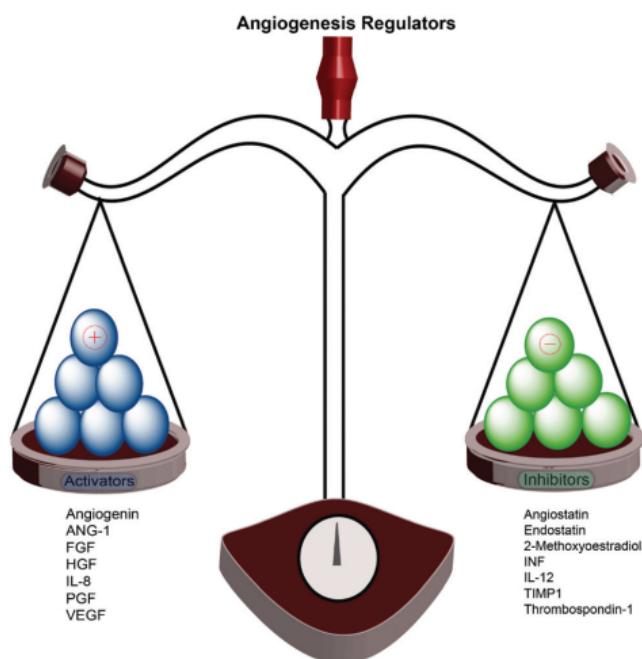


Figura 1.25. Esquema de las moléculas reguladoras del proceso de angiogénesis, responsables de equilibrar el mecanismo de remodelación vascular.⁹⁹

Otro factor que actúa como desencadenante de la angiogénesis, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, es la hipoxia.¹⁰⁰ La falta de oxígeno hace que aumente la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular

⁹⁸ Giuliano, S.; Pagès, G. *Biochimie* **2013**, *95*, 1110-1119.

⁹⁹ Bhattarai, P.; Hameed, S.; Dai, Z. *Nanoscale* **2018**, *10*, 5393-5423.

¹⁰⁰ Jászai, J.; Schmidt, M.H.H. *Cells* **2019**, *8*, 1102.

(VEGF, *vascular endothelial growth factor*), promoviendo de manera indirecta el crecimiento tumoral, al ser este un agente pro-angiogénico.

A través del proceso de angiogénesis los tumores son capaces de conseguir oxígeno y nutrientes, para así crecer rápidamente y llevar a cabo el proceso de metástasis.¹⁰¹ Por ello, la angiogénesis es una de las señas de identidad del cáncer más conocida y estudiada,¹⁰² y se ha revelado como una diana biológica para el desarrollo de fármacos capaces de inhibir este mecanismo y detener el desarrollo de la enfermedad neoplásica.

VEGF y VEGFR

Existe un gran número de factores de crecimiento implicados en la angiogénesis tumoral, y entre ellos la familia de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGFs) tiene un papel destacado. En el año 1971, Folkman planteó la teoría de que los tumores podrían ser tratados a través del bloqueo del proceso de angiogénesis.¹⁰³ A partir de esta hipótesis, en 1983 Senger y su equipo descubrieron el factor de permeabilidad vascular (VPF, *vascular permeability factor*).¹⁰⁴ Seis años más tarde, en 1989, Ferrara y Henzel aislaron la proteína VEGF¹⁰⁵, pero finalmente se demostró que el VPF y VEGF eran la misma molécula.

En humanos el gen *VEGF* se localiza en el cromosoma 6p21.3 y forma parte de la familia de genes *VEGF/factor de crecimiento derivado de plaquetas* (PDGF, *platelet-derived growth factor*). La familia VEGF tiene un papel fundamental en el desarrollo y progresión de determinadas patologías, como el crecimiento y la metástasis tumoral, la retinopatía diabética, los procesos inflamatorios e isquémicos o la preeclampsia.¹⁰⁶

En cuanto a su estructura, las VEGFs son proteínas homodiméricas unidas covalentemente por dos enlaces disulfuro intermoleculares.¹⁰⁷ La familia VEGF incluye diferentes miembros, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, a los que hay que añadir el factor de crecimiento

¹⁰¹ Hisano, Y.; Hla, T. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *193*, 91-98.

¹⁰² Cao, J.; Liu, X.; Yang, Y.; Wei, B.; Li, Q.; Mao, G.; He, Y.; Li, Y.; Zheng, L.; Zhang, Q.; Li, J.; Wang, L.; Qi, C. *Angiogenesis* **2020**, *23*, 325-338.

¹⁰³ Folkman, J. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186.

¹⁰⁴ Senger, D.R.; Galli, S.J.; Dvorak, A.M.; Perruzzi, C.A.; Harvey, V.S.; Dvorak, H.F. *Science* **1983**, *219*, 983-985.

¹⁰⁵ Ferrara, N.; Henzel, W. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*, 851.

¹⁰⁶ Melincovici, C.S.; Boşca, A.B.; Şuşman, S.; Mărginean, M.; Mişu, C.; Istrate, M.; Moldovan, I.M.; Roman, A.L.; Mişu, C.M. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2018**, *59*, 455-467.

¹⁰⁷ Karaman, S.; Leppänen, V.M.; Alitalo, K. *Development* **2018**, *145*(14):dev151019.

placentario (PIGF, *placenta growth factor*).¹⁰⁸ Recientemente, se ha añadido un nuevo miembro a la familia VEGF, al que se le ha denominado como factor de crecimiento endotelial vascular derivado de la glándula endocrina (EG-VEGF, *endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor*).¹⁰⁶ De todos ellos, el VEGF-A, conocido simplemente como VEGF, es el principal regulador de la angiogénesis, tanto de la fisiológica como de la patogénica. En humanos existen diferentes isoformas de VEGF-A, entre las que destaca VEGF-165, ya que presenta la mayor actividad biológica al unirse con afinidad al correceptor neuropilina-1 (Nrp1), responsable de promover la supervivencia celular, la proliferación y la angiogénesis, entre otros procesos.¹⁰⁹

Existen tres receptores con actividad tirosina quinasa que muestran afinidad por la familia VEGF, conocidos como receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFRs, *vascular endothelial growth factor receptors*): VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) y VEGFR-3 (Flt-4). Además, se ha descrito una forma soluble de VEGFR-1, conocida como sVEGFR-1. Mientras que VEGFR-1 y VEGFR-2 se expresan en la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos, VEGFR-3 se encuentra principalmente en los vasos linfáticos, aunque también se puede encontrar en los vasos sanguíneos.¹¹⁰ Todos los VEGFRs presentan en su estructura siete dominios homólogos de inmunoglobulina, en los que se encuentra el sitio de unión del ligando, y una región intracelular con actividad tirosina quinasa, encargada de la transducción de la señal.¹¹¹ Como se muestra en la Figura 1.26, en las células endoteliales vasculares la señalización de VEGF-A está mediada por la activación de VEGFR-2, aunque también se une a VEGFR-1, mientras que PIGF y VEGF-B se unen exclusivamente a VEGFR-1. Posteriormente se descubrió que las vías de señalización PIGF/VEGFR-1 y VEGF-A/VEGFR-1 eran responsables de la formación de nuevos vasos, relacionándose con patologías como el cáncer.

La isoforma soluble sVEGFR-1 actúa como un receptor “trampa” de VEGF-A, VEGF-B y PIGF, ya que tiene capacidad para secuestrar estos ligandos. Además, puede interactuar con VEGFR-2, bloqueando así su actividad. Debido a esto, sVEGFR-1 presenta actividad antiangiogénica, antiinflamatoria

¹⁰⁸ Yang, J.; Yan, J.; Liu, B. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 978.

¹⁰⁹ Shibuya, M. *J Biochem.* **2013**, *153*, 13-19.

¹¹⁰ Gaumann, A. K.; Kiefer, F.; Alfer, J.; Lang, S. A.; Geissler, E. K.; Breier, G. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 540-554.

¹¹¹ Ceci, C.; Atzori, M.G.; Lacal, P.M.; Graziani, G. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1388.

y antiedema, por lo que su desregulación se asocia con distintos procesos patológicos. Sin embargo, hay que destacar que, a través de la activación de la integrina $\beta 1$, esta isoforma puede tener actividad pro-tumoral al activar la adhesión y quimiotaxis de las células endoteliales.¹¹¹ VEGF-C y VEGF-D se unen y activan a VEGFR-3, y tienen un papel importante en la formación de vasos linfáticos, tanto fisiológica como patológica, estando, además, relacionados en la progresión tumoral. Tanto VEGF-C como VEGF-D presentan actividad angiogénica al unirse y activar el receptor VEGFR-2.¹¹² Por su parte, VEGF-E se une únicamente a VEGFR-2, favoreciendo la permeabilidad vascular,¹¹³ mientras que la función de VEGF-F no se conoce con exactitud.

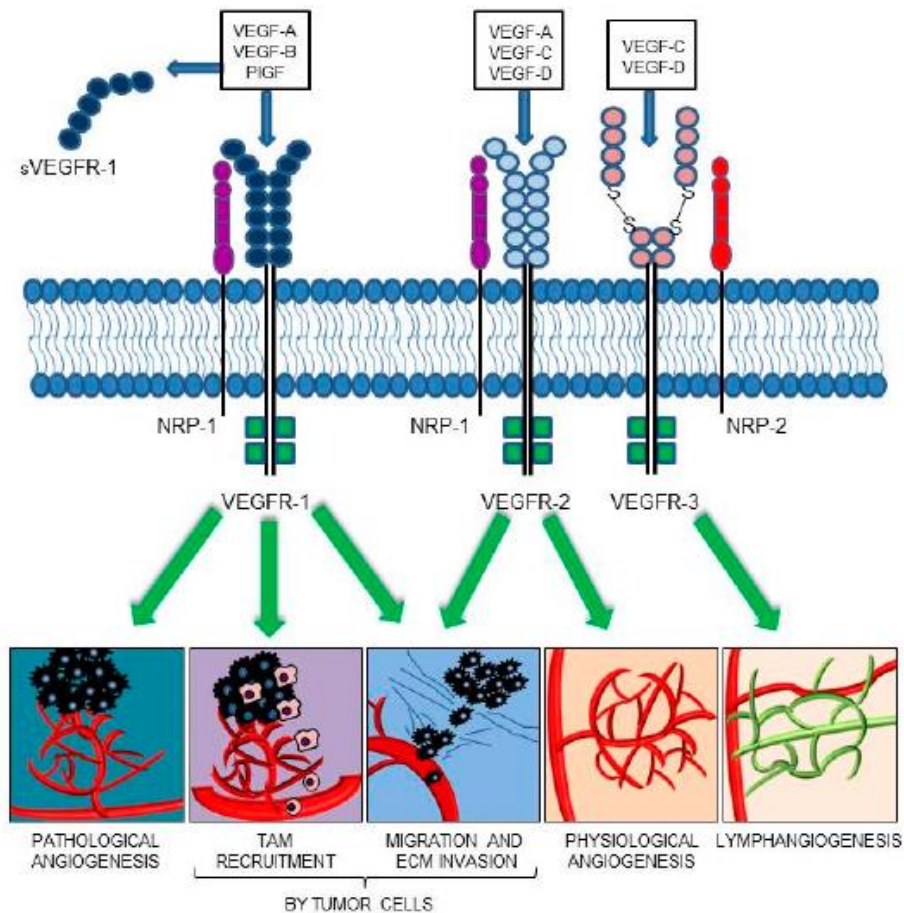


Figura 1.26. Familia VEGF y sus receptores VEGFR.¹¹¹

¹¹² Rahimi, N. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 818-829.

¹¹³ Shibuya, M. *Cell Struct. Funct.* **2001**, *26*, 25-35.

De estos receptores, VEGFR-2 es el más estudiado. Los principales sitios de fosforilación dependientes de VEGF-A en VEGFR-2 son las tirosinas 1175, 951 y 1214, tal y como se muestra en la Figura 1.27.¹¹⁴

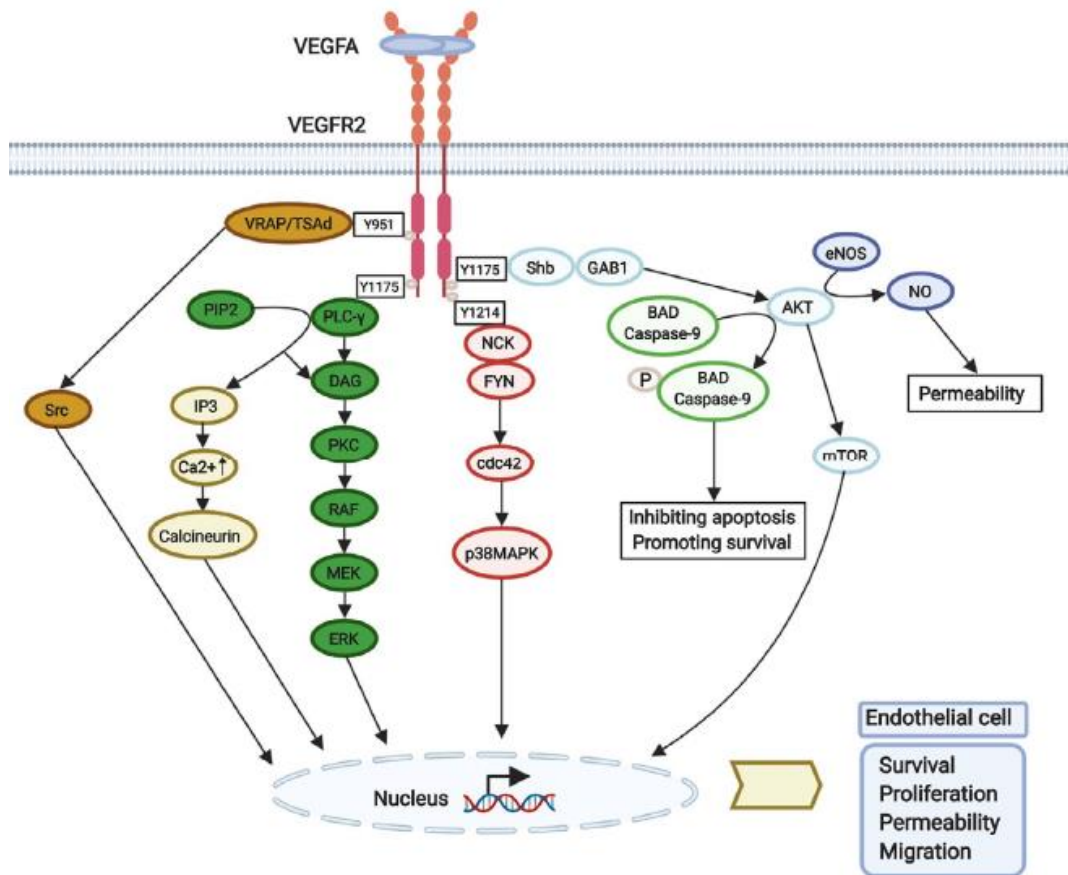


Figura 1.27. VEGF-A se une y promueve la dimerización de VEGFR-2, favoreciendo la supervivencia, proliferación, permeabilidad y migración de las células endoteliales.¹¹⁴

- **Tirosina 1175 fosforilada:** puede unirse a PLC- γ y a proteínas adaptadoras aumentando la cascada de señalización. Cuando PLC- γ está activada, hace que PIP2 produzca IP3 y DAG, por lo que PKC puede iniciar la vía Raf-MEK-ERK, fundamental para la proliferación de las células endoteliales. Además, al unirse a la proteína Shb consigue activar la ruta PI3K-Akt, lo que se traduce en una inhibición de la actividad apoptótica de la caspasa 9 y en un aumento de la permeabilidad vascular.
- **Tirosina 951 fosforilada:** a través de Src favorece la migración celular.
- **Tirosina 1214 fosforilada:** tiene un papel importante en la autofosforilación y activación del receptor VEGFR-2.

¹¹⁴ Liu, G.; Chen, T.; Ding, Z.; Wang, Y.; Wei, Y.; Wei, X. *Cell Prolif.* **2021**, 54(4):e13009.

La fosforilación del receptor VEGFR-2 activa la vía de señalización Raf-1/MAPK/ERK, lo que conduce a la activación de la angiogénesis y al aumento de la permeabilidad vascular, de la proliferación y de la migración celular.¹¹⁵ Por ello, la inhibición de la interacción VEGFR-2/VEGF es una de las opciones terapéuticas más destacadas en el desarrollo de un tratamiento antitumoral. Actualmente, el organismo americano Food and Drug Administration (FDA) ya ha aprobado fármacos antiangiogénicos para el tratamiento del cáncer.^{115,116}

Fármacos antiangiogénicos

Existen dos grandes categorías de fármacos que actúan sobre la vía VEGFR/VEGF: los anticuerpos dirigidos contra VEGF y los inhibidores de del receptor tirosina quinasa VEGFR.¹¹⁷

Bevacizumab (Avastin®), el primer fármaco aprobado para inhibir la angiogénesis, es un anticuerpo monoclonal humanizado capaz de unirse a todas las isoformas solubles de VEGF-A circulantes. Mediante este mecanismo, bevacizumab evita la interacción de VEGF-A con VEGFR-1 y VEGFR-2, inhibiendo así la neovascularización. Inicialmente, su uso estaba aprobado para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico en combinación con quimioterapia, pero las indicaciones de este fármaco se han extendido al tratamiento de cáncer de mama metastásico, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, glioblastoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, *non-small-cell lung cancer*) y el carcinoma de células renales.¹¹⁸ Otro ejemplo de fármaco anti-VEGF es el aflibercept, una proteína recombinante compuesta por fracciones de los dominios extracelulares de VEGFR-1 y VEGFR-2, unidas a una porción de la IgG1 humana. Aflibercept se diseñó para bloquear múltiples miembros de la familia VEGF, como VEGF-A, VEGF-B y PlGF, y se emplea en el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico.^{119,120}

¹¹⁵ Luo, G.; Li, X.; Zhang, G.; Wu, C.; Tang, Z.; Liu, L.; You, Q.; Xiang, H. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *140*, 252-273.

¹¹⁶ Zhang, Q.; Zheng, P.; Zhu, W. *Molecules* **2020**, *25*, 2666.

¹¹⁷ Wang, S.; Yang, Z.; Wang, Z. *Oncotarget* **2015**, *6*, 18206-18223.

¹¹⁸ Garcia, J.; Hurwitz, H.I.; Sandler, A.B.; Miles, D.; Coleman, R.L.; Deurloo, R.; Chinot, O.L. *Cancer Treat. Rev.* **2020**, *86*, 102017.

¹¹⁹ Ottaiano, A.; Capozzi, M.; Tafuto, S.; De Stefano, A.; De Divitiis, C.; Romano, C.; Avallone, A.; Nasti, G. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 766.

¹²⁰ Van Cutsem, E.; Paccard, C.; Chiron, M.; Tabernero, J. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 717-725.

Otras estrategias terapéuticas para detener la angiogénesis se centran en el desarrollo de inhibidores del VEGFR y, por tanto, también de las vías que se activan posteriormente. Se han aprobado varios inhibidores del VEGFR tales como:^{121,122}

- Sorafenib: para el carcinoma de células renales avanzado y carcinoma hepatocelular inoperable.
- Sunitinib: para el carcinoma avanzado de células renales y tumores del estroma gastrointestinal.
- Axitinib y pazopanib: para el carcinoma avanzado de células renales.
- Vandetanib: para el carcinoma de tiroides medular metastásico o localmente avanzado e inoperable.

La estructura química de estos inhibidores se muestra a continuación en la Figura 1.28.

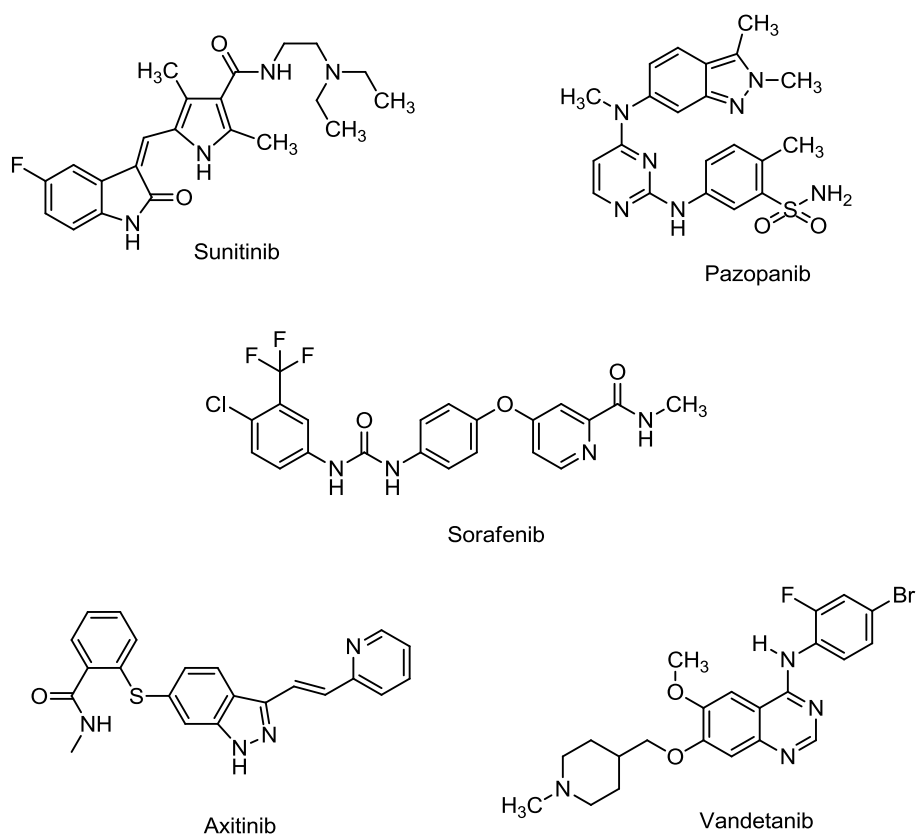


Figura 1.28. Inhibidores de VEGFR.¹²³

¹²¹ Ramjiawan, R.R.; Griffioen, A.W.; Duda, D.G. *Angiogenesis* **2017**, *20*, 185-204.

¹²² Zhao, Y.; Adjei, A.A. *Oncologist* **2015**, *20*, 660-673.

¹²³ Gotink, K. J.; Verheul, H. M. *Angiogenesis* **2010**, *13*, 1-14.

Se han descrito cuatro tipos de fármacos inhibidores de quinasa, representados en la Figura 1.29:^{124,125}

- Inhibidores tipo I: reconocen la conformación activa de la quinasa. Forman enlaces de hidrógeno con la bisagra de la quinasa y ocupan el bolsillo de unión de la adenosina del ATP.
- Inhibidores tipo II: reconocen y se une a la conformación inactiva de la quinasa, ocupando también el bolsillo de adenosina del ATP.
- Inhibidores tipo III: bloquean la actividad de la quinasa al unirse a un bolsillo alostérico adyacente a ATP, sin hacer interacción con el sitio de unión del mismo.
- Inhibidores tipo IV: se unen a la quinasa en un sitio alostérico alejado del sitio de unión del ATP.

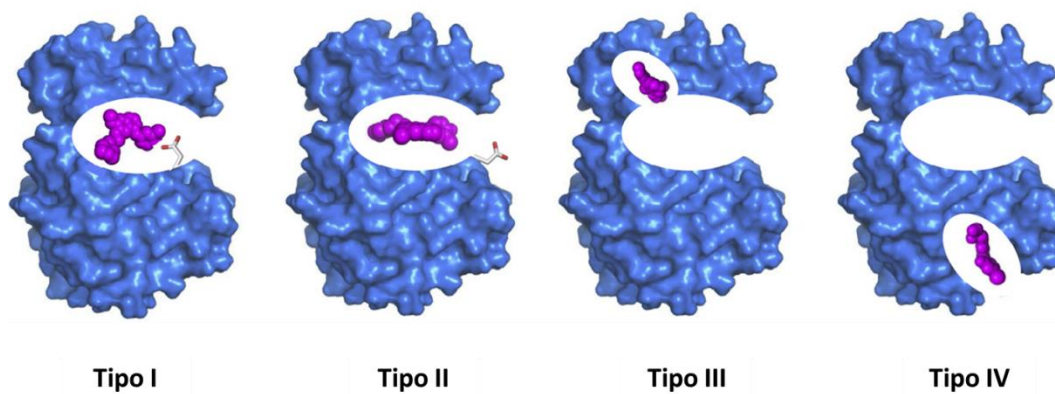


Figura 1.29. Inhibidores tipo I, II, III y IV unidos al receptor quinasa.¹²⁵

Sorafenib y sunitinib

El sorafenib (Nexavar®, Bayer Pharmaceuticals Corp., 2005)¹²⁶ y el sunitinib (Sutent®, Pfizer, 2006)¹²⁷ son dos inhibidores de tirosina quinasa con una estructura de molécula pequeña aprobados por la FDA, que presentan actividad cuando se administran por vía oral.¹²⁸

El sorafenib se emplea en el tratamiento del carcinoma de células renales avanzado, carcinoma hepatocelular que no se puede extirpar con cirugía y en

¹²⁴ Dar, A.C.; Shokat, K.M. *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 769-795.

¹²⁵ Wu, P.; Nielsen, T.E.; Clausen, M.H. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36*, 422-439.

¹²⁶ Kane, R.C.; Farrell, A.T.; Saber, H.; Tang, S.; Williams, G.; Jee, J.M.; Liang, C.; Booth, B.; Chidambaram, N.; Morse, D.; Sridhara, R.; Garvey, P.; Justice, R.; Pazdur, R. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 7271-7278.

¹²⁷ Papaetis, G.S.; Syrigos, K.N. *BioDrugs* **2009**, *23*, 377-389.

¹²⁸ Jiang, Z.; Wang, L.; Liu, X.; Chen, C.; Wang, B.; Wang, W.; Hu, C.; Yu, K.; Qi, Z.; Liu, Q.; Wang, A.; Liu, J.; Hong, G.; Wang, W.; Liu, Q. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10*, 488-497.

el cáncer de tiroides en pacientes que no responden al tratamiento con yodo radiactivo. Por su parte, el sunitinib está aprobado para el tratamiento de tumores del estroma gastrointestinal (cuando el paciente no responde o no puede tomar imatinib), cáncer de páncreas inoperable, localmente avanzado o metastásico y en carcinoma de células renales avanzado.¹²⁹

El sorafenib es capaz de suprimir la proliferación de células tumorales al inhibir Raf-1, B-Raf y la actividad quinasa en la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK. Además, este fármaco se dirige y bloquea el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR- β , *platelet-derived growth factor receptor*), el VEGFR, el receptor del factor de células madre (c-KIT, *stem cell factor receptor*), la tirosina quinasa-3 similar a FMS (Flt-3, *FMS-like tyrosine kinase-3*), RET y otras proteínas, para así inhibir la angiogénesis tumoral.^{130,131} El sunitinib presenta actividad antiangiogénica y anticancerosa, ya que inhibe, entre otros, a VEGFR, c-Kit y PDGFR.¹²⁷

Tal y como se muestra en la Figura 1.30, tanto el sorafenib como el sunitinib actúan como inhibidores tipo II cuando se posicionan en el sitio activo del dominio quinasa de VEGFR, en la conformación inactiva DFG-*out*.

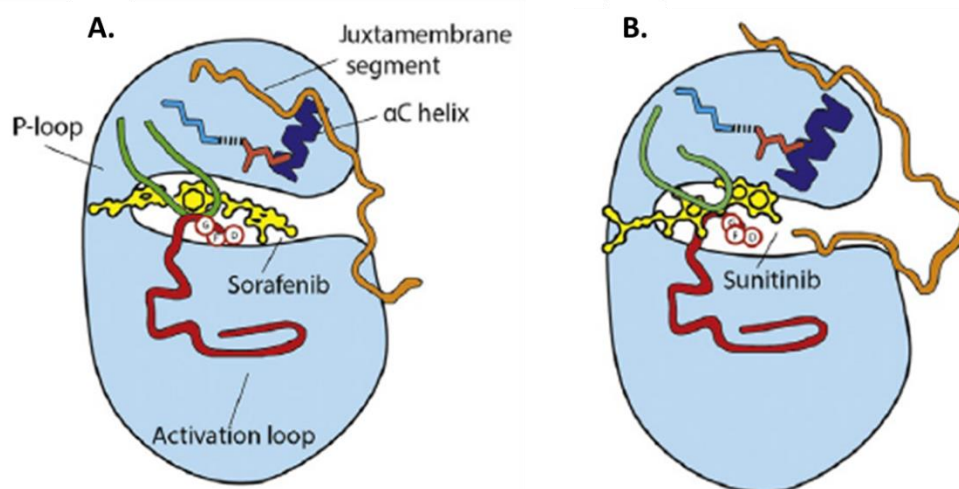


Figura 1.30. A. Representación esquemática de la colocación del sorafenib en el dominio quinasa de VEGFR-2 en la conformación inactiva. B. Representación esquemática de la colocación del sunitinib en el dominio quinasa de VEGFR en la conformación inactiva.¹³¹

En el bolsillo catalítico de VEGFR-2, el sorafenib establece una serie de enlaces de hidrógeno, como se muestra en la Figura 1.31. Estos enlaces son

¹²⁹ www.cancer.gov

¹³⁰ Tang, W.; Chen, Z.; Zhang, W.; Cheng, Y.; Zhang, B.; Wu, F.; Wang, Q.; Wang, S.; Rong, D.; Reiter, F.P.; De Toni, E.N.; Wang, X. *Signal Transduct. Target Ther.* **2020**, *5*, 87.

¹³¹ Wang, Q.; Zorn, J.A.; Kuriyan, J. *Methods Enzymol.* **2014**, *548*, 23-67.

entre el N piridínico y el NH de Cys-919, entre el carbonilo de la parte de urea con NH de Asp-1046 y entre los NH de la parte urea con el Glu-885.¹³²

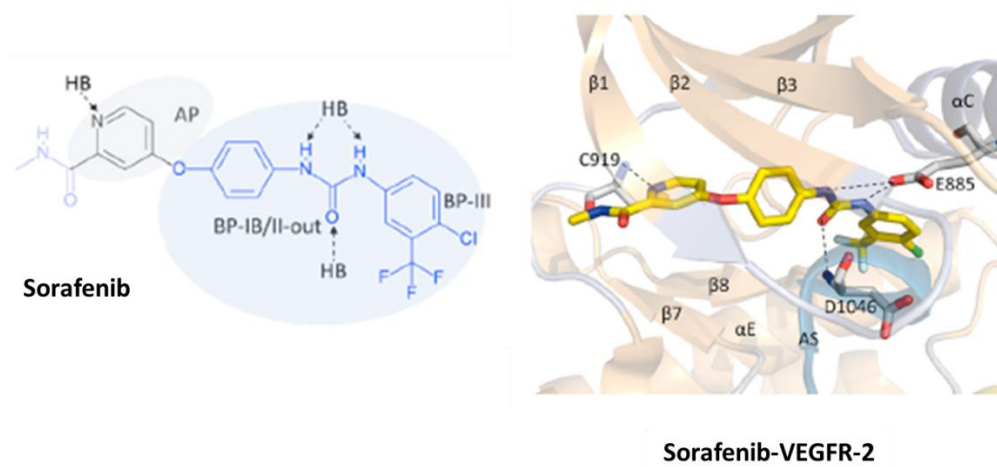


Figura 1.31. Estructura del fármaco sorafenib y su colocación en el bolsillo catalítico de VEGFR-2 con indicación de los enlaces de hidrógeno establecidos.¹³²

El sunitinib también establece enlaces de hidrógeno al unirse al sitio catalítico del dominio quinasa de VEGFR-2 (ver Figura 1.32). Estos enlaces se forman entre el carbonilo del anillo de oxoindolina y el NH de Cys-673 y entre el NH del anillo de oxoindolina y el carbonilo de la cadena principal de Glu-917.

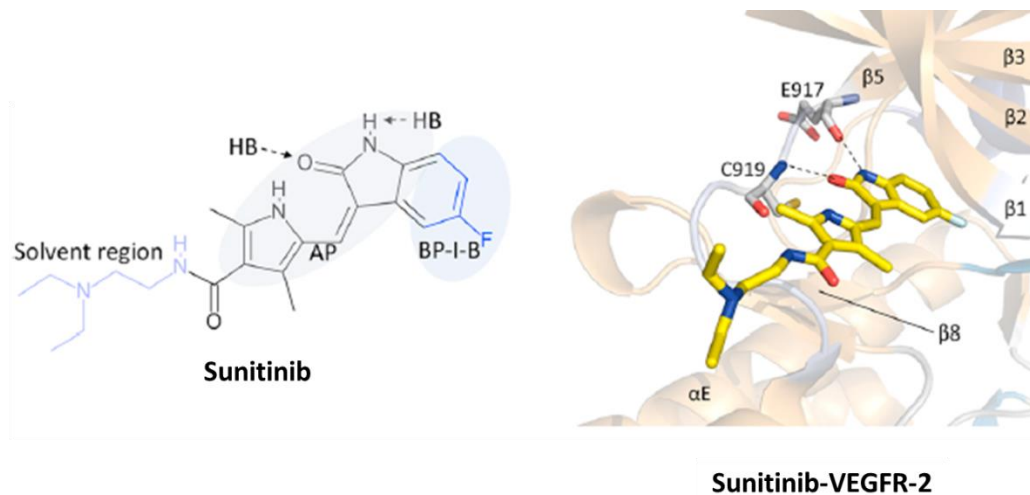


Figura 1.32. Estructura del fármaco sunitinib y su colocación en el bolsillo catalítico de VEGFR-2, con indicación de los enlaces de hidrógeno establecidos.¹³²

Los inhibidores de VEGFR consiguen bloquear el proceso de angiogénesis, lo que supone una diferencia respecto a la quimioterapia

¹³² Roskoski, R. Jr. *Pharmacol. Res.* **2019**, *144*, 19-50.

clásica, ya que estos inhibidores no tienen efecto directo de muerte sobre las células cancerosas. Sin embargo, esto no significa que estén exentos de causar reacciones adversas, ya que tanto el sorafenib como el sunitinib provocan hipertensión, diarrea o el síndrome mano-pie, entre otros efectos adversos.¹³³ No obstante, la combinación de ambos tratamientos supone importantes ventajas en la terapia antitumoral, pues se obtienen mejores resultados que empleando únicamente quimioterapia convencional, consiguiéndose reducir las reacciones adversas frecuentes en el tratamiento convencional.¹³⁴

1.3.2.2. Receptor de insulina y sus sustratos

La insulina es una hormona con efectos anabolizantes, modula la homeostasis de glucosa, además de promover la conversión de precursores sencillos, tales como los hidratos de carbono o los aminoácidos, en macromoléculas, favoreciendo el crecimiento celular y/ el almacenamiento de nutrientes.^{135,136} La insulina se une en la superficie de las células al receptor de insulina (IR, *insulin receptor*), el cual pertenece a la familia de receptores con actividad tirosina quinasa.¹³⁷ La señalización canónica del IR es a través de una casaca de proteínas. Recientemente se ha descubierto un nuevo modo de acción de IR, a través de su traslocación al núcleo e interacción directa con la ARN Pol.¹³⁸

La alteración en la función del IR se ha asociado con diversas patologías, como la diabetes, la enfermedad de Alzheimer o el cáncer.¹³⁹

El receptor de insulina

El IR y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1R, *insulin-like growth factor type 1 receptor*) derivan de un gen ancestral común, altamente conservado en vertebrados e invertebrados. Presentan alta homología en el sitio de unión del ligando (45-65%), en los

¹³³ Bæk Møller, N.; Budolfson, C.; Grimm, D.; Krüger, M.; Infanger, M.; Wehland, M.; Magnusson, N.E. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4712.

¹³⁴ Bergers, G.; Hanahan, D. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 592-603.

¹³⁵ Scapin, G.; Dandey, V.P.; Zhang, Z.; Prosise, W.; Hruza, A.; Kelly, T.; Mayhood, T.; Strickland, C.; Potter, C.S.; Carragher, B. *Nature* **2018**, *556*, 122-125.

¹³⁶ Boucher, J.; Kleinriders, A.; Kahn, C. R. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a009191.

¹³⁷ Posner, B.I. *Can. J. Diabetes* **2017**, *41*, 108-113.

¹³⁸ Hancock, M.L.; Meyer, R.C.; Mistry, M.; Khetani, R.S.; Wagschal, A.; Shin, T.; Ho Sui, S.J.; Näär, A.M.; Flanagan, J.G. *Cell* **2019**, *177*, 722-736.

¹³⁹ Gutmann, T.; Schäfer, I.B.; Poojari, C.; Brankatschk, B.; Vattulainen, I.; Strauss, M.; Coskun, Ü. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*(1):e201907210.

dominios de unión del sustrato y en su actividad tirosina quinasa (60-85%). Ambos receptores pueden unir los tres ligandos (insulina, IGF-1, IGF-2, *insulin-like growth factor 2*), aunque lo hacen con distinta afinidad.¹⁴⁰

En humanos el IR está codificado por el gen *INSR* ubicado en el cromosoma 19. Este gen está compuesto por 22 exones. El ARNm puede madurar de dos formas alternativas, una de ellas mediante exclusión del exón 11, dando lugar a la isoforma IR-A con 1370 residuos, y la otra incluyendo al exón 11, lo que origina la isoforma IR-B que consta de 1382 aminoácidos.¹⁴¹ Ambas isoformas se expresan de manera diferente en distintos tejidos:^{135,142,143}

- IR-A: une insulina e IGF-2 y se expresa predominantemente en tejidos fetales y embrionarios, el sistema nervioso central (SNC) y las células tumorales. Es capaz de unirse también a IGF-1, pero con mucha menor afinidad. Sus efectos son mitogénicos, favoreciendo la proliferación celular.
- IR-B: une insulina de forma predominante y se expresa mayoritariamente en el hígado, el tejido adiposo y los músculos. Se une con baja afinidad a IGF-1 e IGF-2. Sus efectos son principalmente metabólicos.

Estas isoformas del IR pueden presentarse como homodímeros (IR-A / IR-A, IR-B/IR-B) o como heterodímeros (IR-A/IR-B). Además, ambas isoformas pueden combinarse con el IGF-1R, dando lugar a la formación de híbridos que contienen IR-A (IR-A / IGF-1R) o IR-B (IR-B / IGF-1R).

Cada monómero IR está formado por una subunidad α y una subunidad β conectadas por un enlace covalente disulfuro extracelular.¹⁴⁴ La subunidad α es totalmente extracelular. La subunidad β contiene un dominio extracelular, uno transmembrana, un dominio yuxtamembrana intracelular, un dominio tirosina quinasa y una cola C-terminal (Figura 1.33 A). Los monómeros $\alpha\beta$ adyacentes se conectan mediante dos puentes disulfuro, formando el dímero funcional (heterotetrámero $\alpha 2\beta 2$).^{143,145}

¹⁴⁰ Vella, V.; Milluzzo, A.; Scalisi, N.M.; Vigneri, P.; Sciacca, L. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3615.

¹⁴¹ Payankulam, S.; Raicu, A.M.; Arnosti, D.N. *Genes* **2019**, *10*, 984.

¹⁴² Vella, V.; Malaguarnera, R. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3814.

¹⁴³ Haeusler, R.A.; McGraw, T.E.; Accili, D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 31-44.

¹⁴⁴ Diwanji, D.; Thaker, T.; Jura, N. *IUBMB Life* **2019**, *71*, 706-720.

¹⁴⁵ Belfiore, A.; Malaguarnera, R.; Vella, V.; Lawrence, M.C.; Sciacca, L.; Frasca, F.; Morrione, A.; Vigneri, R. *Endocr. Rev.* **2017**, *38*, 379-431.

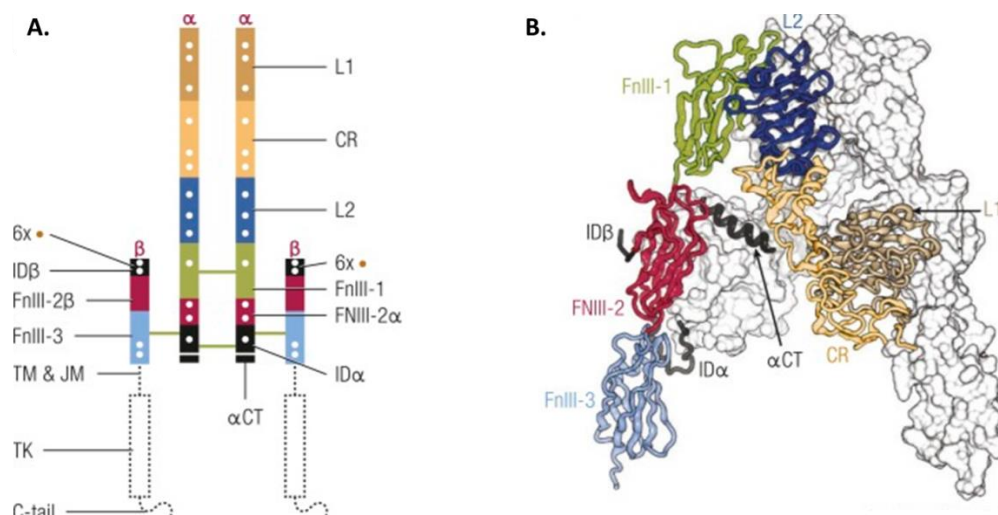


Figura 1.33. A. Estructura del IR: los enlaces disulfuro están representados por líneas verdes continuas. L1 y L2 dominios ricos en leucina. CR región rica en cisteína. FNIII-1 y FNIII-2 α , dominios de fibronectina tipo III. ID α dominio de inserción. JM dominio yuxtamembrana. TM dominio transmembrana. TK dominio tirosina quinasa. B. Ensamblaje en forma de λ del IR. Un monómero se representa como una cinta, con los dominios coloreados y etiquetados como en IA y el segundo se representa como una superficie molecular blanca.¹⁴⁵

Los dominios del monómero $\alpha\beta$ se ensamblan en una doble forma λ asimétrica (Figura 1.33 B). Una de las “patas” de esta V invertida está conformada por el dominio L1, CR y L2 de un monómero, mientras que la otra está formada por los dominios FNIII-1, FNIII-2 y FNIII-3, el dominio ID α y la región C-terminal de la cadena α (α CT).¹⁴⁶

El IR se activa por unión a ligando: la insulina, que es secretada a la sangre por las células β del páncreas en respuesta al aumento de glucosa en sangre.¹⁴⁷ La insulina se une a las subunidades α del IR, provocando que el dominio con actividad tirosina quinasa de una subunidad β fosforile a la subunidad β opuesta (autofosforilación).^{148,149} Esta activación, a su vez, cataliza la fosforilación de las proteínas conocidas como sustratos del receptor de insulina 1 (IRS1, *insulin receptor substrate 1*) e IRS2. Esta fosforilación activa diferentes vías de señalización como la de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) o la vía fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*)/Akt, lo que induce la traslocación del receptor de glucosa a la membrana con el

¹⁴⁶ Cao, J; Yee, D. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 555.

¹⁴⁷ Hopkins, B.D.; Goncalves, M.D.; Cantley, L.C. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2020**, 16, 276-283.

¹⁴⁸ Hiriart-Urdanivia, M.; Sánchez-Soto, C.; Velasco, M.; Sabido-Barrera, J.; Ortiz-Huidobro, R.I. *Gac. Med. Mex.* **2019**, 155, 541-545.

¹⁴⁹ Pomytkin, I.; Costa-Nunes, J.P.; Kasatkin, V.; Veniaminova, E.; Demchenko, A.; Lyundup, A.; Lesch, K.P.; Ponomarev, E.D.; Strekalova, T. *CNS Neurosci. Ther.* **2018**, 24, 763-774.

consiguiente consumo de glucosa, además de activar el crecimiento y la supervivencia celular, entre otros procesos.¹⁴⁶

Sustratos del receptor de insulina (IRS)

Las IRS son proteínas adaptadoras.^{150,151} Se han identificado cuatro genes de proteína IRS en roedores (*IRS1,2,3,4*), pero solo tres en humanos: *IRS1* y el *IRS2*, que se expresan en tejidos de mamíferos de manera extensa, y el *IRS4* que se limita principalmente al hipotálamo (véase la Figura 1.34).¹⁵²

A pesar de que *IRS1* e *IRS2* muestran una homología significativa, regulan distintos procesos en las células tumorales. Por ejemplo, la señalización de IGF-1R a través de *IRS1* promueve la proliferación, mientras que a través de *IRS2* favorece la invasión, la migración y el metabolismo de la glucosa.¹⁵³ Existen dos miembros más de la familia de IRS relacionados de manera lejana con el resto. Estos genes son el *IRS5* y el *IRS6*, conocidos también como *DOK4* y *DOK5*, los cuales muestran homología en la región N-terminal, pero no en la C-terminal.¹⁵⁴

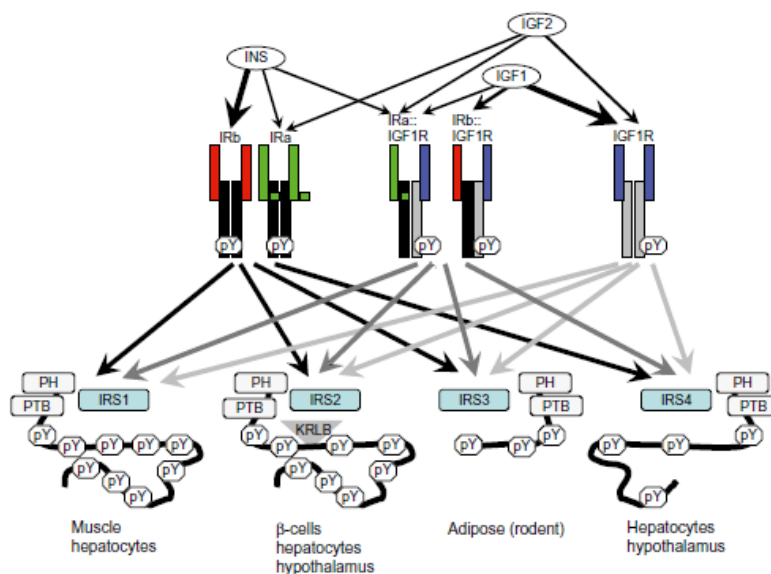


Figura 1.34. Representación esquemática de los receptores IR-A/ IR-B, IGF-1R y los híbridos resultantes unidos a sus ligandos (insulina, IGF-1 e IGF-2); se muestran también los distintos IRS tras la activación de estos receptores y en qué tejidos se pueden encontrar.¹⁵²

¹⁵⁰ Machado-Neto, J.A.; Favaro, P.; Lazarini, M.; Costa, F.F.; Olalla Saad, S.T.; Traina, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 1404-1411.

¹⁵¹ Shaw, L.M. *Cell Cycle* **2011**, *10*, 1750-1756.

¹⁵² White M.F. *Handbook of Cell Signaling*. 2ª ed. Elsevier. **2010**.

¹⁵³ Piper, A.J.; Clark, J.L.; Mercado-Matos, J.; Matthew-Onabanjo, A.N.; Hsieh, C.C.; Akalin, A.; Shaw, L.M. *PLoS One* **2019**, *14*, 1-14.

¹⁵⁴ Mardilovich, K.; Pankratz, S.L.; Shaw, L.M. *Cell Commun. Signal.* **2009**, *7*, 14.

Estructura de IRS1 e IRS2

Las cuatro proteínas IRS principales muestran homología estructural y contienen un dominio de homología a Pleckstrina (PH, *Pleckstrin homology*), un dominio de unión a fosfotirosina (PTB, *phosphotyrosine-binding*) y varios sitios de fosforilación de tirosina.^{155,156}

La estructura molecular de IRS1 se ha caracterizado de manera extensa, mostrando los dominios conservados PH y PTB en la porción N-terminal de la proteína (véase la Figura 1.35).¹⁵⁷

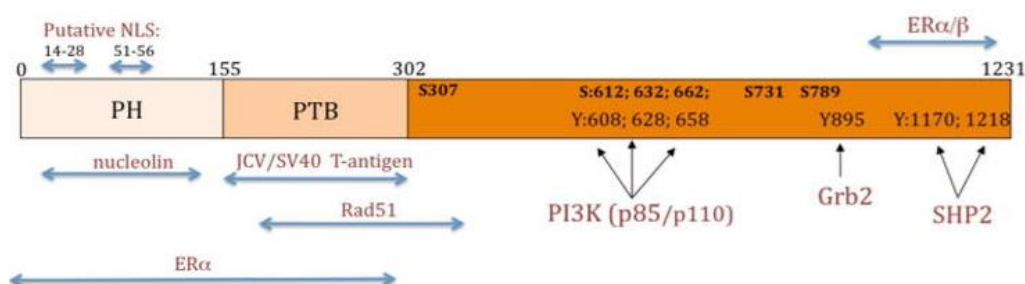


Figura 1.35. Diagrama esquemático de la proteína de ratón IRS1.¹⁵⁷

- Dominio PH: contiene un bolsillo de unión cargado positivamente que media la interacción con fosfolípidos y con proteínas que contienen un residuo ácido.
- Dominio PTB: reconoce residuos de tirosina fosforilados dentro de motivos NPXY, proporcionando así un mecanismo de acoplamiento de IRS1 con Tyr950 o Tyr960 en la región yuxtamembrana de IGF-1R e IR, respectivamente.

En la región C-terminal existen más de 20 sitios de fosforilación de tirosina en la molécula de IRS1, los cuales pueden reclutar proteínas que contengan el dominio de homología Src-2 (SH2, *Src-homology-2*), así como varios enzimas y proteínas adaptadoras que trabajan junto con IRS1 mediante cascadas de señalización: Grb-2, PI3K, SHP2 fosfatasa, Fyn, Nck y Crk.^{156,158,159}

¹⁵⁵ Rabiee, A.; Krüger, M.; Ardenkjær-Larsen, J.; Kahn, C.R.; Emanuelli, B. *Cell. Signal.* **2018**, *47*, 1-15.

¹⁵⁶ Dhe-Paganon, S.; Ottinger, E.A.; Nolte, R.T.; Eck, M.J.; Shoelson, S.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8378-8383.

¹⁵⁷ Reiss, K.; Del Valle, L.; Lassak, A.; Trojanek, J. *J. Cell Physiol.* **2012**, *227*, 2992-3000.

¹⁵⁸ Boura-Halfon, S.; Shuster-Meiseles, T.; Beck, A.; Petrovich, K.; Gurevitch, D.; Ronen, D.; Zick, Y. *Mol. Endocrinol.* **2010**, *24*, 2179-2192.

Vías de señalización a través de IRS

Una vez la insulina se ha unido al IR y se ha producido su activación, se inicia una cascada de señalización en la que destacan dos vías principales de transducción: la vía del PI3K (Figura 1.36) y la vía de MAPK (Figura 1.37).¹⁶⁰

La vía PI3K/Akt se inicia cuando el receptor activado fosforila al IRS y lo activa. Los IRS presentan entre 8 y 18 sitios potenciales de fosforilación que, cuando son fosforilados por el IR, pasan a ser sitios de unión y activación de proteínas que contienen dominios SH2, como son PI3K, Grb2 o SHP-2, entre otras.¹⁶¹

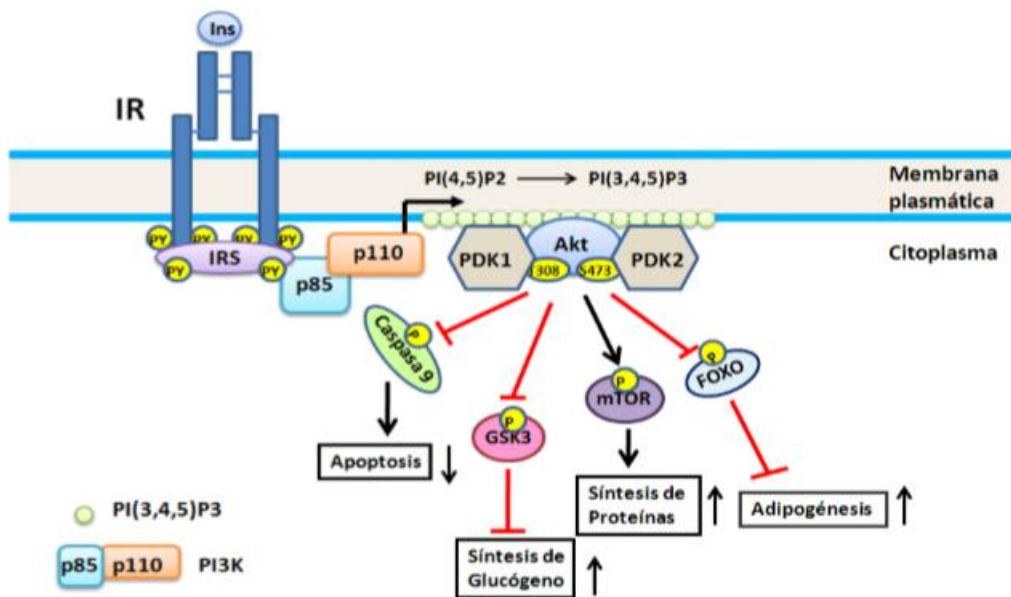


Figura 1.36. Activación de la vía PI3K/Akt tras la unión de la insulina a su receptor.¹⁶⁰

La PI3K consta de una subunidad reguladora (p85) y de una subunidad catalítica (p110). Cuando p85 interacciona con IRS1 se activa p110, que fosforila su sustrato PI(4,5)P₂ en la posición 3 del inositol produciendo PI(3,4,5)P₃, que sirve de sitio de unión para quinasas como Akt. La fosforilación de Akt en Ser473 (por la acción del PDK2) y en Thr308 (por la acción de PDK1) activa diferentes sustratos como la caspasa 9 o mTOR, lo que conlleva a una reducción en la apoptosis celular y a un aumento en la

¹⁵⁹ Eck, M.J.; Dhe-Paganon, S.; Trüb, T.; Nolte, R.T.; Shoelson, S.E. *Cell* **1996**, *85*, 695-705.

¹⁶⁰ Olivares-Reyes, J. A.; Arellano-Plancarte, A. *REB* **2008**, *27*, 9-18.

¹⁶¹ Brüning, J.C.; Winnay, J.; Cheatham, B.; Kahn, C.R. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 1513-1521.

síntesis de proteínas y glucógeno, entre otros.¹⁵⁹ Es necesario añadir que Akt puede activarse por muchas vías, independientemente de Insulina/IRS1.¹⁶²

El IR puede activar la vía de las MAPK por dos mecanismos: uno de ellos mediante la proteína Shc, y el complejo Grb2/SOS que activan (GTP-Ras). La unión GTP-Ras activa a Raf-1, lo que provoca la fosforilación y la activación de MEK1, MEK2 y de las ERK1 y ERK2.

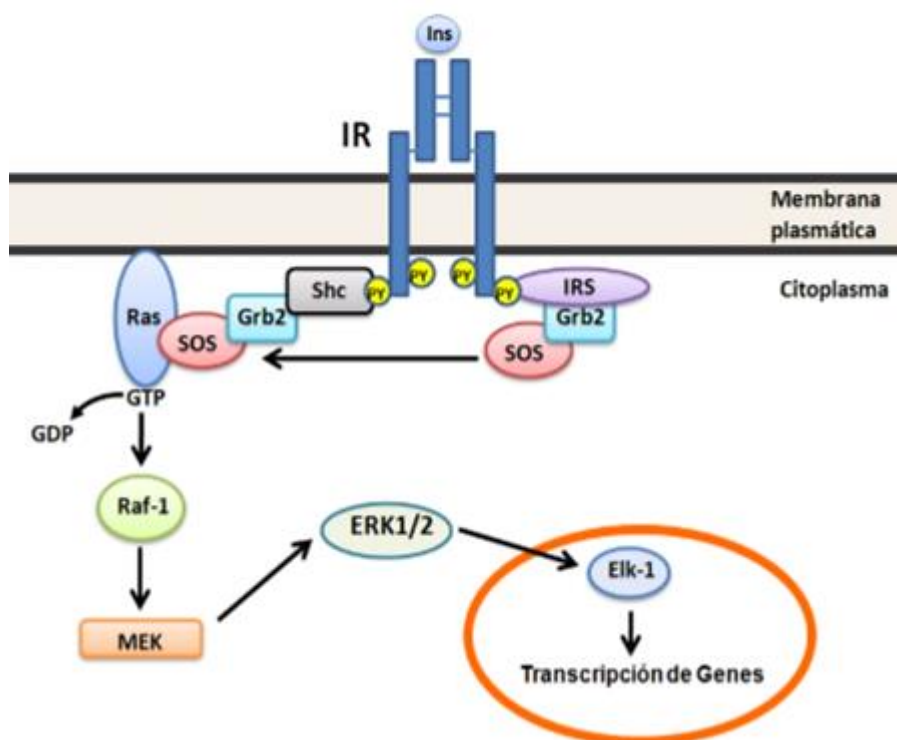


Figura 1.37. Activación de la vía MAPK tras la unión de la insulina a su receptor.¹⁶⁰

El otro mecanismo, dependiente de IRS pero independiente de Shc, se inicia con la activación de IRS que se une al complejo Grb2/SOS e inicia, a partir de este punto, una secuencia de activación idéntica a la anteriormente explicada.¹⁶³

IRS como diana terapéutica en el cáncer

Las proteínas IRS están implicadas en la progresión y metástasis tumoral, así como en la resistencia adquirida a fármacos, lo que las convierte en nuevas y potenciales dianas terapéuticas para los tratamientos anticancerosos.

¹⁶² Meng, Y.; Hu, X.; Li, S.; Zeng, X.; Qiu, L.; Wei, M.; Wang, Z.; Han, J. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 1028.

¹⁶³ Hall, C.; Yu, H.; Choi, E. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 911-920.

El compuesto NT157 es un fármaco prototipo que se une a un sitio alostérico en IGF-1R e induce un cambio conformacional, lo que provoca la disociación de las proteínas IRS1 e IRS2 unidas al receptor y, al cabo de unas horas, su desaparición.¹⁶⁴ NT157 previene el desarrollo del cáncer colorrectal y provoca una regresión duradera de tumores ya establecidos. Además de sus efectos directos en las células tumorales, inhibe componentes del microambiente tumoral, como los fibroblastos asociados al cáncer (CAF, *cancer-associated fibroblasts*) y los macrófagos asociados a tumores (TAM, *tumor-associated macrophages*). Por ello, NT157 es un compuesto que actúa en diferentes vías de señalización fundamentales para las células cancerosas y su microambiente, consiguiendo una eficaz actividad anticancerosa.¹⁶⁵

Existe también otra estrategia terapéutica basada en silenciar el gen *IRS*, empleando para ello ARN de interferencia pequeño (siRNA, *small interfering RNA*), específico para un *IRS* determinado (*IRS1* o *IRS2*). Los resultados de estas terapias en el cáncer de páncreas muestran que al reducir la expresión del gen de *IRS1*, se puede inhibir la proliferación, migración e invasión de las células tumorales mediante la reducción de la señalización de MAPK y PI3K.¹⁶⁶

1.3.3. Biofármacos

Los fármacos biológicos, también conocidos como biofármacos, son productos elaborados a partir de materias de origen biológico, como células, muestras de origen humano o animal (como tejidos u órganos) o microorganismos, empleando también técnicas de biotecnología, a partir de una proteína o ADN recombinante. Normalmente, los biofármacos son homólogos de proteínas humanas, o bien tienen una gran similitud con las mismas.¹⁶⁷

Los fármacos biológicos suelen compararse con los fármacos de moléculas pequeñas que son sustancias sintetizadas químicamente derivadas de productos naturales, como plantas u hongos. Estas moléculas pequeñas presentan estructuras simples y bajo peso molecular, por lo que sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas se pueden predecir con

¹⁶⁴ Reuveni, H.; Flashner-Abramson, E.; Steiner, L.; Makedonski, K.; Song, R.; Shir, A.; Herlyn, M.; Bar-Eli, M.; Levitzki, A. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4383-4394.

¹⁶⁵ Sanchez-Lopez, E.; Flashner-Abramson, E.; Shalpour, S.; Zhong, Z.; Taniguchi, K.; Levitzki, A.; Karin, M. *Oncogene* **2016**, *35*, 2634-2644.

¹⁶⁶ Huang, Y.; Zhou, L.; Meng, X.; Yu, B.; Wang, H.; Yang, Y.; Wu, Y.; Tan, X. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2018**, *11*, 5185-5193.

¹⁶⁷ Sánchez, M. L. *Revista Bioquímica y Patología Clínica* **2020**, *84*, 44-51.

facilidad. El desarrollo de un fármaco como molécula pequeña o como biofármaco dependerá de los requerimientos necesarios respecto a infraestructuras y financiación: un fármaco de molécula pequeña se sintetiza con relativa facilidad, ya que presenta una estructura simple y bien definida, mientras que los biofármacos son difíciles de caracterizar, lo que incrementa su coste de producción. Por otro lado, los fármacos de moléculas pequeñas pueden atravesar fácilmente las membranas biológicas y se pueden formular en distintas formas farmacéuticas, desde cápsulas y comprimidos hasta soluciones, lo que supone una ventaja para las condiciones de administración.^{168,169}

Los procesos de obtención de los biofármacos son altamente específicos, ya que incluyen técnicas de ingeniería genética para clonar una secuencia en un vector de expresión adecuado, como virus o plásmidos. A continuación, se debe conseguir un sistema de expresión celular, procariota o eucariota, y finalmente se debe aislar y purificar la proteína de interés para fabricarla a gran escala, sin alterar su estructura o función.¹⁷⁰ Todo ello dificulta que otras compañías de la industria puedan recrear el proceso de elaboración. Los fármacos biológicos son muy específicos respecto a su diana terapéutica, lo que reduce considerablemente sus efectos secundarios y han sido los tratamientos más vendidos por la industria farmacéutica durante los últimos años. Además, no presentan los problemas de resistencia que se observan al emplear fármacos de moléculas pequeñas, lo que también supone una ventaja frente a estos.¹⁶⁸

Los biofármacos son una familia de moléculas muy diversa, entre las que se encuentran anticuerpos, vacunas o los plásmidos, entre otros. Los plásmidos de ADN son moléculas circulares de ADN de doble cadena que presentan un alto peso molecular y son capaces de codificar una proteína con actividad terapéutica, por lo que se emplean en distintas terapias, como la génica o la celular. El ADN del plásmido atraviesa las membranas citoplasmática y nuclear para acceder al núcleo y, una vez allí, se transcribe

¹⁶⁸ Disponible en: <https://pharmanewsintel.com/news/key-differences-in-small-molecule-biologics-drug-development>

¹⁶⁹ Matar, P. *Medicamentos biológicos, presente y futuro de la terapéutica* 2017, 59-72.

¹⁷⁰ Kadir, F.; Hamers, M.; Ives, P. *Pharmaceutical biotechnology*. 3ª ed. CRC Press. 2008.

en ARNm, el cual codifica la proteína de interés en el paciente. El ADN del plásmido fue fundamental para el desarrollo de los fármacos biológicos.¹⁷¹

El ADN del plásmido fue aislado por primera vez en el año 1967 y, desde ese momento, se ha empleado frecuentemente en ingeniería genética por su estabilidad y facilidad para ser modificados genéticamente, ya que contienen entre 1000 y 30000 pares de bases de ADN. No se degradan cuando se cortan y pueden regresar a su forma original, lo que facilita la inserción de secuencias nuevas de ADN en plásmidos ya existentes. Además, pueden autorreplicarse en células bacterianas, por lo que se pueden obtener grandes cantidades de plásmido si se consiguen buenas cantidades de bacterias. En la década de 1970 se consiguió la primera aplicación terapéutica de los plásmidos al producir insulina humana mediante plásmidos que contenían transgenes en *Escherichia coli*.¹⁷² Actualmente, los plásmidos tienen diversas utilidades en terapéutica en enfermedades tan relevantes como el Alzheimer o el cáncer.

¹⁷¹ Damase, T. R.; Sukhovshin, R.; Boada, C.; Taraballi, F.; Pettigrew, R. I.; Cooke, J. P. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 628137.

¹⁷² Disponible en: <https://www.pharmasalmanac.com/articles/the-pivotal-role-of-plasmid-dna>

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la enfermedad del cáncer presenta diferentes puntos de control en los que participan proteínas o ácidos nucleicos, que pueden emplearse como dianas biológicas para el descubrimiento de nuevos fármacos con aplicación en terapias dirigidas.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es identificar nuevas entidades moleculares con acción selectiva frente a dianas biológicas anticáncer relacionadas con la senescencia (hTERT y c-Myc), la angiogénesis (VEGF y VEGFR-2) y la evasión del sistema inmunológico (PD-L1) y que sirvan como punto de partida para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

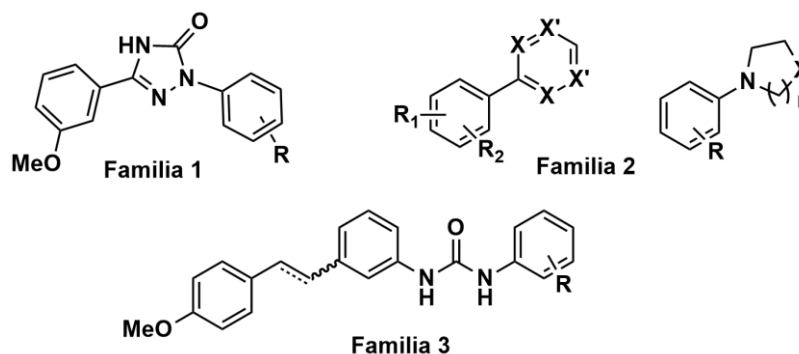
Para conseguir nuestro objetivo general, nos planteamos como objetivos concretos de esta tesis:

1. *Desarrollo y la evaluación biológica de pequeñas moléculas orgánicas dirigidas con efecto anticáncer*, las cuales se han englobado en tres familias (véase el Esquema 2.1):

1.a. Familia 1: *compuestos con estructura de tipo triazolona* como potenciales agentes antitelomerasa e inmunomoduladores y estudio de su efecto sobre la viabilidad celular y sobre hTERT, c-Myc y PD-L1.

1.b. Familia 2: *compuestos con estructura de tipo biarilo* como potenciales agentes antitelomerasa y antiangiogénicos y estudio de su efecto sobre la viabilidad celular y sobre hTERT, c-Myc y VEGF.

1.c. Familia 3: *compuestos con estructura de tipo estililurea* como potenciales agentes antiangiogénicos e inmunomoduladores y estudio de su efecto sobre la viabilidad celular y sobre VEGFR-2, PD-L1 y c-Myc.



Esquema 2.1. Estructura general de las pequeñas moléculas estudiadas.

2. Desarrollo de biomoléculas dirigidas con efecto anticáncer.

2.a. Desarrollo de un plásmido silenciador del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) y estudio de su efecto en la proliferación de células tumorales.

2.b. Desarrollo de un plásmido silenciador del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2) y estudio de su efecto en la proliferación de células tumorales.

3. SÍNTESIS DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS

3. SÍNTESIS DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se emplearon compuestos sintetizados previamente en los siguientes grupos de investigación:

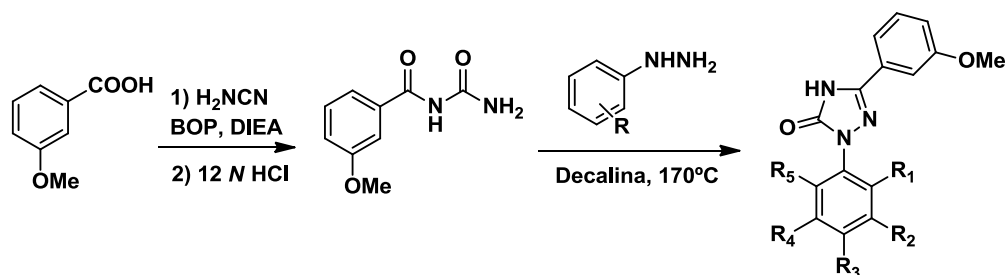
Familia 1: compuestos sintetizados en el grupo denominado *Sistemas Supramoleculares Bioorgánicos*, del departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica de la UNED, coordinado por Rosa M^a Claramunt.

Familias 2 y 3: compuestos sintetizados en el grupo *Joining Medicine and Chemistry* (JMC) del departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad Jaime I (UJI), coordinado por Eva Falomir y Pedro Miguel Carda.

A pesar de que la síntesis de los productos evaluados biológicamente no es el objetivo principal de esta Tesis Doctoral, se ha considerado necesario explicar brevemente el proceso de obtención de los mismos. Por ello, en este apartado se expone, de forma esquemática y resumida, la síntesis química de los compuestos evaluados en esta Tesis.

3.1. Síntesis de los compuestos de la familia 1

La síntesis de los compuestos con estructura 2-*aryl*-5-(3-metoxifenil)-2,4-dihidro-3*H*-1,2,4-triazol-3-ona (estructuras **T.1-T.10** del Esquema 3.1) se llevó a cabo calentando en decalina, a 170°C durante 6 horas, una mezcla formada por la *N*-(aminocarbonil)-3-metoxibenzamida y la correspondiente hidracina. Después del periodo de calentamiento, se dejó enfriar y el precipitado se filtró, se lavó con éter dietílico y se purificó por recristalización o por cromatografía en columna de gel de sílice.¹⁷³



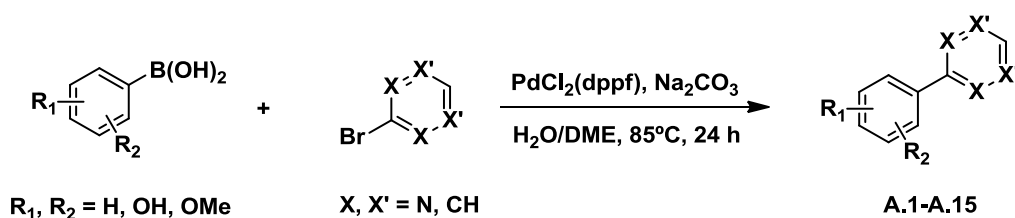
- | | |
|---|---|
| T.1 (R ₁ , R ₃ =CH ₃ ; R ₂ , R ₄ , R ₅ =H) | T.6 (R ₁ =F; R ₃ =Cl; R ₂ , R ₄ , R ₅ =H) |
| T.2 (R ₁ =F; R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ =H) | T.7 (R ₁ =Cl; R ₃ =F; R ₂ , R ₄ , R ₅ =H) |
| T.3 (R ₃ =F; R ₁ , R ₂ , R ₄ , R ₅ =H) | T.8 (R ₁ , R ₃ , R ₅ =F; R ₂ , R ₄ =H) |
| T.4 (R ₁ , R ₃ =F; R ₂ , R ₄ , R ₅ =H) | T.9 (R ₁ , R ₂ , R ₄ , R ₅ =F; R ₃ =H) |
| T.5 (R ₁ , R ₅ =F; R ₂ , R ₃ , R ₄ =H) | T.10 (R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₄ , R ₅ =F) |

Esquema 3.1. Ruta sintética para los compuestos **T.1-T.10**.

¹⁷³ Santa María, D.; Claramunt, R.M.; Elguero, J.; Carda, M.; Falomir, E.; Martín-Beltrán, C. *Med. Chem.* **2019**, *15*, 360-372.

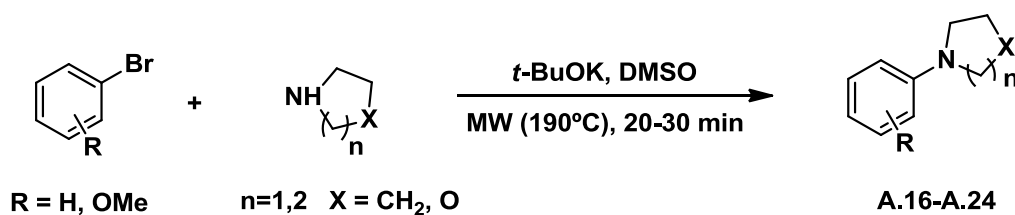
3.2. Síntesis de los compuestos de la familia 2

La preparación de arilpiridinas y arilpirimidinas se llevó a cabo mediante acoplamientos de Suzuki, catalizados por paladio, de ácidos fenilborónicos comerciales con arilpiridinas y arilpirimidinas bromadas comerciales, en las condiciones experimentales mostradas en el Esquema 3.2. De esta forma, se obtuvieron los compuestos **A.1-A.15**.¹⁷⁴



Esquema 3.2. Síntesis de los compuestos **A.1-A.15**.

Los compuestos **A.16-A.24** se sintetizaron mediante reacciones tipo $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ de pirrolidina, piperidina y morfolina sobre bromoarilos, como se muestra en el Esquema 3.3.



Esquema 3.3. Síntesis de los compuestos **A.16-A.24**.

En la Figura 3.1 se muestran las estructuras de los compuestos de la familia 2.

¹⁷⁴ Martín-Beltrán, C.; Sánchez-Peris, M.; Conesa-Milián, L.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J.A. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 880-887.

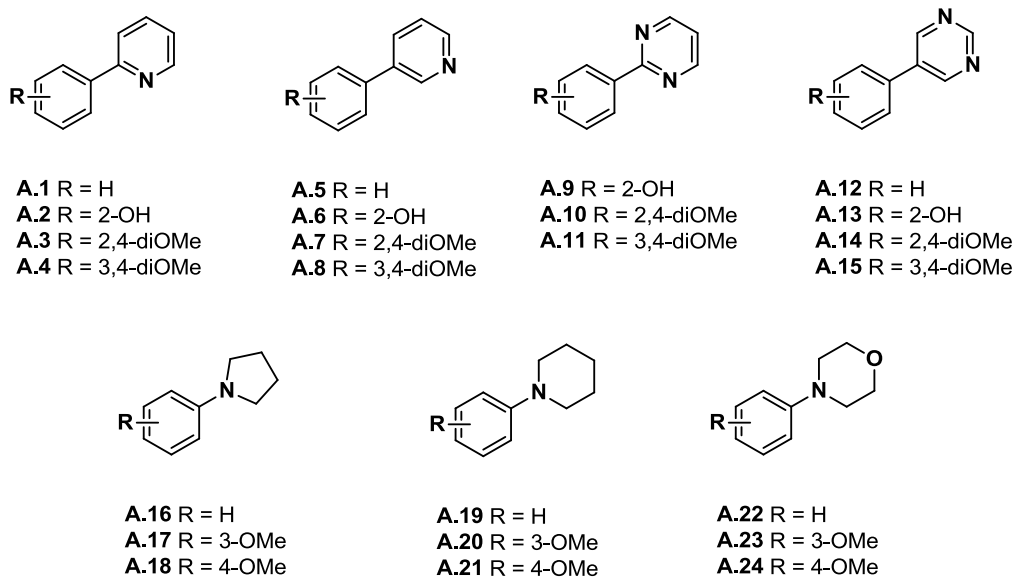
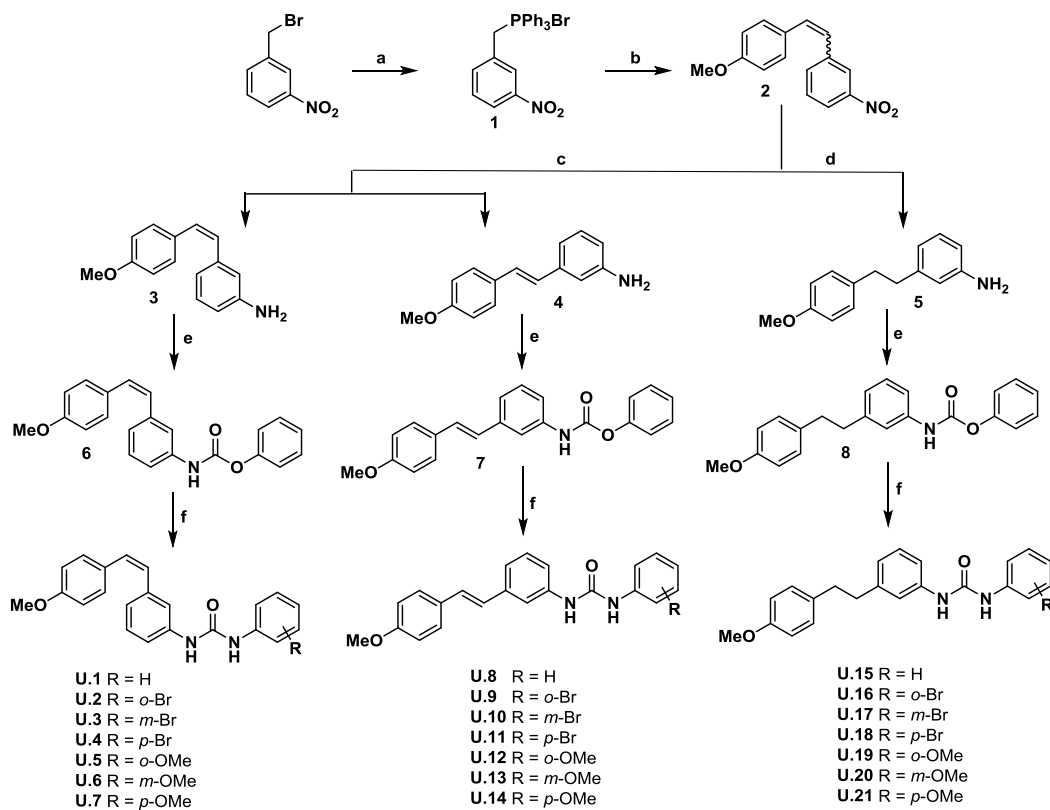


Figura 3.1. Estructura de los compuestos A.1-A.24.

3.3. Síntesis de los compuestos de la familia 3

La ruta sintética para la obtención de los compuestos **U.1-U.21**, se indica en el Esquema 3.4. Esta ruta se inició con la reacción de Wittig entre el iluro generado a partir de la sal de fosfonio **1** con 4-metoxibenzaldehído, lo que proporcionó el 1-(4-metoxiestiril)-3-nitrobenzoceno **2** como una mezcla de isómeros *E/Z*. Posteriormente, la reducción del grupo nitro dio como resultado una mezcla de anilinas *E/Z*, de la que se obtuvieron la (*Z*)-3-(4-metoxiestiril)anilina **3** y la (*E*)-3-(4-metoxiestiril)anilina **4** mediante cromatografía de columna. Por otro lado, la hidrogenación del compuesto **2** llevó a la 3-(4-metoxifenetil)anilina **5**. Los compuestos **3**, **4** y **5** fueron convertidos en los carbamatos **6**, **7** y **8**, los cuales, mediante reacción con las anilinas apropiadas, dieron lugar a las ureas **U.1-U.21**, bajo las condiciones que se especifican en el Esquema 3.4.^{71,175}

¹⁷⁵ Conesa-Milián, L.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *170*, 87-98.



Esquema 3.4. Síntesis de los compuestos **U.1-U.21**. Reactivos y condiciones: (a) PPh₃, CH₂Cl₂, 3 h, temp. amb., 71%; (b) 4-metoxibenzaldehído, K₂CO₃, 18-corona-6, CH₂Cl₂, reflujo, toda la noche, 73%; (c) Zn, AcOH, 1 h, temp. amb., (*Z/E* 6:4); (d) H₂, Pd/C, EtOAc, 2 h, temp. amb., 66%; (e) cloroformiato de fenilo, piridina, THF, 0°C 30 min, después 1 h, temp. amb., (f) la anilina apropiada, Et₃N, THF, 24-72 h, 40-50°C.

**4. DESARROLLO DE
PEQUEÑAS MOLÉCULAS
ORGÁNICAS DIRIGIDAS CON
POTENCIAL EFECTO
ANTICÁNCER**

4. DESARROLLO DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS ORGÁNICAS DIRIGIDAS CON POTENCIAL EFECTO ANTICÁNCER

4.1. Estudios de interacción de las dianas biológicas con los ligandos

4.1.1. *Docking* molecular

El acoplamiento molecular, o *docking*, es un método para diseñar fármacos en el que se simula por ordenador la interacción entre ligandos y receptores, permitiendo la predicción del modo de unión y la afinidad entre ambos. En los últimos años, esta estrategia ha sido empleada con frecuencia en investigación, ya que utiliza una base de datos de compuestos para llegar a potenciales farmacóforos, mejorando la eficiencia y reduciendo los costes y el tiempo de los ensayos.¹⁷⁶

Los estudios de *docking* ayudan a conocer las interacciones que existen entre las moléculas y sus dianas biológicas; esto se consigue en primer lugar al predecir la orientación molecular del ligando dentro del receptor, y en segundo lugar, al estimar la complementariedad y afinidad de estas conformaciones. Para conseguir buenos resultados con esta técnica, es necesario conocer la estructura tridimensional de la diana biológica, y así poder probar distintas orientaciones del ligando en la misma.¹⁷⁷ Solo unos pocos programas empleados en el estudio de acoplamiento molecular han conseguido cierto reconocimiento y son empleados en numerosos grupos de investigación, entre los que se incluyen Dock, GOLD y AutoDock. Este último es el que se utilizó en los estudios de *docking* de esta tesis doctoral.¹⁷⁸

4.1.2. Ensayo de desplazamiento térmico de proteínas

Los ensayos de desplazamiento térmico de proteínas (PTS, *protein thermal shift*) son un conjunto de técnicas empleadas en el estudio de la estabilidad térmica de las proteínas tras la unión de un ligando.¹⁷⁹ Estos ensayos de PTS se han utilizado ampliamente en la industria para descubrir nuevos fármacos, detectar interacciones entre dianas biológicas y sus posibles ligandos y conocer las condiciones óptimas para la cristalización de proteínas.¹⁸⁰ La estabilización conformacional de las proteínas inducida por

¹⁷⁶ Fan, J.; Fu, A.; Zhang, L. *Quant. Biol.* **2019**, *7*, 83-89.

¹⁷⁷ Pinzi, L.; Rastelli, G. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4331.

¹⁷⁸ Śledź, P.; Cafilisch, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2018**, *48*, 93-102.

¹⁷⁹ Jafari, R.; Almqvist, H.; Axelsson, H.; Ignatushchenko, M.; Lundbäck, T.; Nordlund, P.; Martínez-Molina, D. *Nat. Protoc.* **2014**, *9*, 2100-2122.

¹⁸⁰ Ding, Y.; Ball, K. A.; Webb, K. J.; Gao, Y.; D'Alessandro, A.; Old, W. M.; Stowell, M.; Ding, X. *Small* **2020**, *16*, e2003506.

ligandos es un fenómeno muy estudiado, en el cual sustratos, inhibidores o cofactores, entre otras moléculas, proporcionan cambios en la estabilidad de las proteínas al unirse a ellas.¹⁸¹ Este proceso se basa en el acoplamiento energético de las reacciones de unión de ligandos, provocando cambios en el punto medio de las curvas de fusión inducidas térmicamente obtenidas para la unión ligando-receptor, en relación con la del receptor en ausencia de ligando (T_m). La magnitud de ese cambio de temperatura es proporcional a la afinidad del ligando por la proteína en cuestión.¹⁸²

Los ensayos de PTS emplean técnicas basadas en fluorescencia para medir los cambios de temperatura producidos, por lo que también se les conoce como fluorimetría diferencial de barrido (DSF, *differential scanning fluorimetry*) o con el vocablo inglés Thermofluor. Este método utiliza un compuesto fluoróforo de carácter hidrofóbico, como el naranja SYPRO (máximo de excitación a 472 nm y máximo de emisión a 569 nm), que permite distinguir entre los estados plegados y desplegados de una proteína. Cuando la temperatura empleada es baja no se observa fluorescencia, ya que la proteína está correctamente plegada y no hay regiones hidrofóbicas expuestas. Sin embargo, al aumentar la temperatura la proteína empieza a desplegarse y estas áreas hidrofóbicas quedan expuestas, por lo que el fluoróforo puede unirse a ellas y producir la fluorescencia, como se muestra en la Figura 4.1.^{183,184} La intensidad de la fluorescencia puede representarse en función de la temperatura y, a través de la curva obtenida, se puede calcular el valor de T_m , que se corresponde con la temperatura a la que quedan expuestas las regiones hidrofóbicas de la proteína.

¹⁸¹ Pantoliano, M. W.; Petrella, E. C.; Kwasnoski, J. D.; Lobanov, V. S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B. A.; Lane, P.; Salemme, F. R. *J. Biomol. Screen.* **2001**, *6*, 429-440.

¹⁸² Vedadi, M.; Niesen, F. H.; Allali-Hassani, A.; Fedorov, O. Y.; Finerty, P.J. Jr; Wasney, G. A.; Yeung, R.; Arrowsmith, C.; Ball, L. J.; Berglund, H.; Hui, R.; Marsden, B. D.; Nordlund, P.; Sundstrom, M.; Weigelt, J.; Edwards, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2006**, *103*, 15835-15840.

¹⁸³ Grøftehaug, M. K.; Hajizadeh, N.R.; Swann, M.J.; Pohl, E. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 36-44.

¹⁸⁴ Reinhard, L.; Mayerhofer, H.; Geerlof, A.; Mueller-Dieckmann, J.; Weiss, M. S. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 209-214.

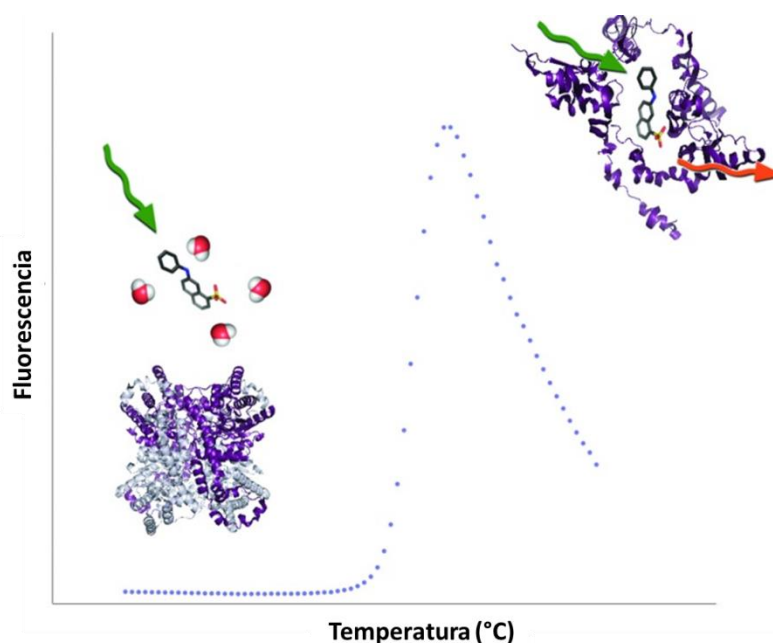


Figura 4.1. Representación de un ensayo de PTS que muestra la curva de fusión (puntos azules) de la glucosa isomerasa (tetrámero de color morado) y una molécula de 1-anilino-8-naftaleno-sulfonato.¹⁸³

El ensayo se puede realizar con un equipo de PCR en tiempo real, lo que permite monitorizar la desnaturalización de la proteína. Esta técnica requiere cantidades muy pequeñas de proteína para llevarse a cabo, por lo que supone un ensayo rápido y económico para identificar ligandos, aditivos y soluciones tampón óptimos.^{185,186}

En esta Tesis, el ensayo de PTS se llevó a cabo empleando una solución acuosa de la proteína PD-L1 a la que se incorporaban los compuestos a evaluar. Las curvas de fusión fueron registradas por el equipo StepOne™ Real-Time PCR System.

4.2. Cultivos celulares empleados en los estudios biológicos

Durante el desarrollo de los estudios biológicos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, se han empleado diferentes líneas celulares, tanto tumorales como no tumorales, con el fin de evaluar la actividad de los diferentes compuestos.

¹⁸⁵ Huynh, K.; Partch, C. L. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2015**, 79, 28.9.1-28.9.14.

¹⁸⁶ Ericsson, U. B.; Hallberg, B. M.; Detitta, G. T.; Dekker, N.; Nordlund, P. *Anal. Biochem.* **2006**, 357, 289-298.

4.2.1. Líneas celulares tumorales

La línea HT-29 (ver Figura 4.2) consiste en células adherentes de adenocarcinoma de colon, aisladas de un tumor primario presente en una mujer caucásica de 44 años de edad.¹⁸⁷ En particular, esta línea celular es una de las más empleadas en el grupo de investigación donde se desarrolló la Tesis Doctoral, por lo que se han llevado a cabo numerosos ensayos con la misma.

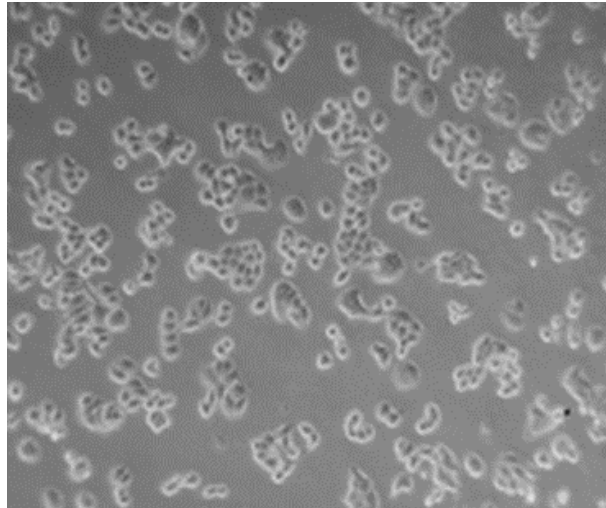


Figura 4.2. Línea celular tumoral HT-29.

La línea celular MCF-7 (ver Figura 4.3) es un tipo de cáncer de mama cuyo nombre procede de las siglas de la Michigan Cancer Foundation, lugar donde se aisló por primera vez en el año 1973, a partir de un derrame pleural de una paciente de 69 años que presentaba metástasis. Esta línea celular es ampliamente utilizada para estudiar el cáncer de mama, el tipo tumoral con mayor prevalencia y mortalidad en mujeres, por lo que resulta de gran interés desde el punto de vista terapéutico y de investigación.¹⁸⁸

¹⁸⁷ Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com>

¹⁸⁸ Comşa, Ş.; Cîmpean, A. M.; Raica, M. *Anticancer Res.* **2015**, 35, 3147-3154.

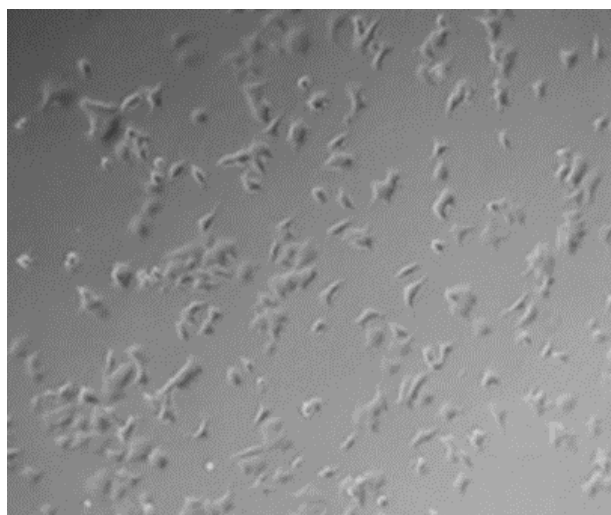


Figura 4.3. Línea celular tumoral MCF-7.

La línea tumoral A549 (ver Figura 4.4) es un tipo de carcinoma de pulmón, aislado por primera vez en el año 1972 de un paciente caucásico de 58 años.¹⁸⁹ Debido a su gran porcentaje de mortalidad (es el cáncer que ocasiona mayor muertes en hombres, y el segundo en mujeres), los ensayos con esta línea celular fueron de gran interés para la Tesis Doctoral.

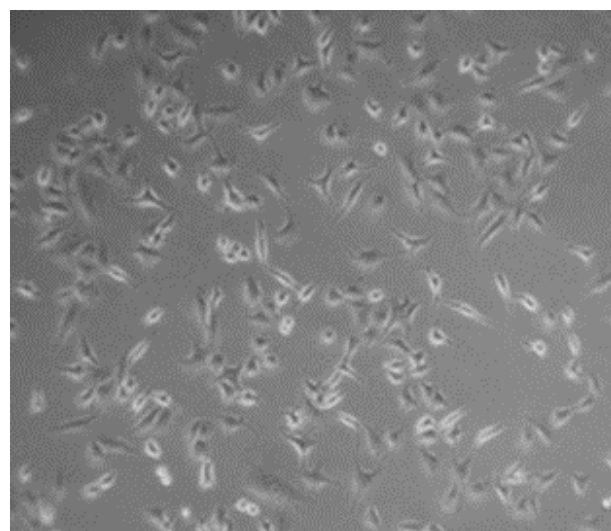


Figura 4.4. Línea celular tumoral A549.

Las células HeLa (ver Figura 4.5) recibieron este nombre por Henrietta Lacks, quien falleció en el año 1952 debido al adenocarcinoma de cuello de útero que padecía y, del cual, su doctora Margaret Gey aisló las primeras

¹⁸⁹ Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crm-ccl-185>

células para su estudio posterior.¹⁹⁰ Estas células han sido ampliamente utilizadas en distintos estudios biológicos, aportando valiosa información sobre el crecimiento celular tumoral.

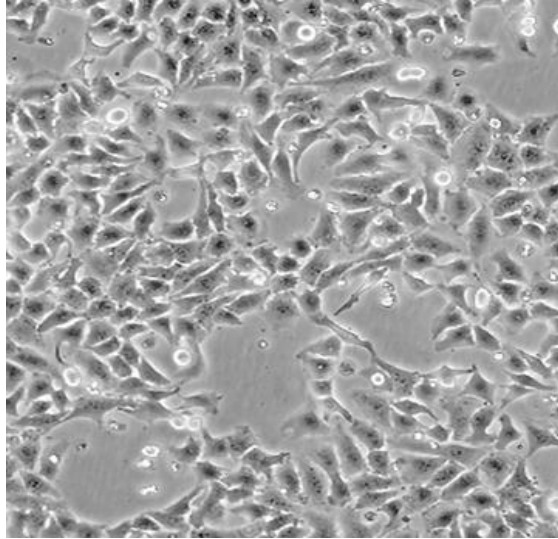


Figura 4.5. Línea celular tumoral HeLa.

La línea celular Jurkat (ver Figura 4.6) es una línea celular de linfocitos T inmortalizados, la cual se obtuvo de la sangre de un niño de 14 años con leucemia linfoblástica aguda, en el año 1977. Fue uno de los primeros sistemas *in vitro* para estudiar las células T y su activación, de gran importancia en la respuesta inmune adaptativa.¹⁹¹

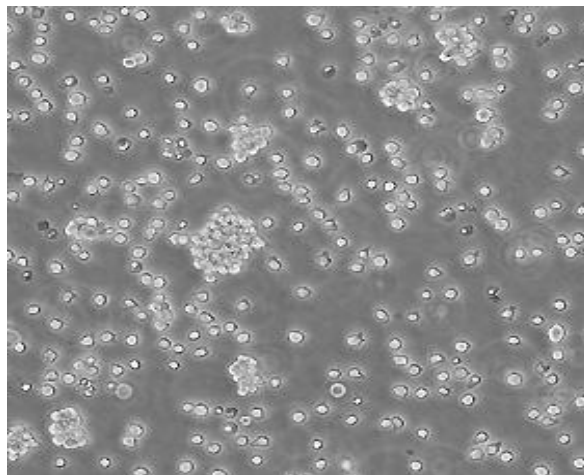


Figura 4.6. Línea celular tumoral Jurkat.¹⁹²

¹⁹⁰ Verma, R. P.; Hansch, C. *Curr. Med Chem.* **2006**, *13*, 423-448.

¹⁹¹ Gioia, L.; Siddique, A.; Head, S. R.; Salomon, D. R.; Su, A. I. *BMC Genomics* **2018**, *19*, 334.

¹⁹² Disponible en: <https://www.atcc.org/products/tib-152>

4.2.2. Líneas celulares no tumorales

Las células HEK-293 (ver Figura 4.7) derivan de células embrionarias de riñón humano; esta línea celular se obtuvo mediante la transformación de las células HEK normales (de un feto sano abortado) con ADN de adenovirus 5 cortado, lo que resultó en la incorporación del genoma viral en el cromosoma 19 humano de las células HEK. Fue cultivada a principios de la década de 1970 por el científico Alex Van der Eb, en el laboratorio de la Universidad de Leiden, en Holanda. Sin embargo, la transformación la llevó a cabo otro científico de su mismo laboratorio, Frank Graham, quien inventó el método del fosfato de calcio para realizar la transfección celular; de hecho, el nombre de HEK-293 se debe a que fue el experimento número 293 de Frank Graham.¹⁹³

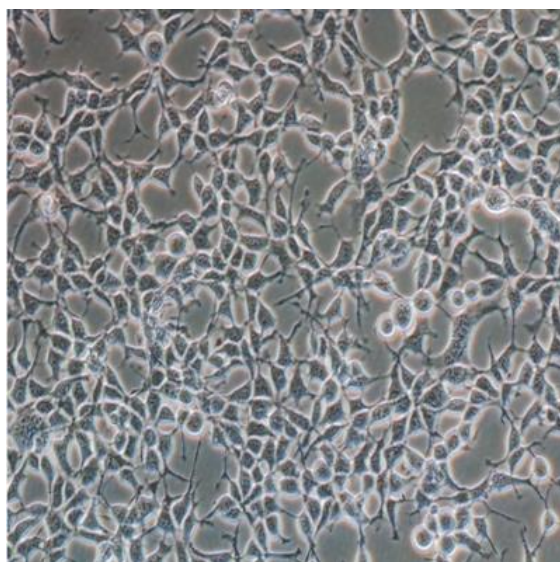


Figura 4.7. Línea celular no tumoral HEK-293.

La línea celular HMEC-1 (ver Figura 4.8), del inglés *human microvasculature endothelial cell*, es una línea de células endoteliales de la microvasculatura, desarrollada a partir de muestras de origen humano, transformada con un vector conocido como pSVT,¹⁹⁴ un plásmido basado en pBR322, uno de los primeros vectores de clonación ampliamente utilizados.¹⁹⁵ Las células HMEC-1 muestran muchas características comunes a las células endoteliales primarias, tanto a nivel morfológico como funcional, y se

¹⁹³ Disponible en: <https://www.hek293.com/>

¹⁹⁴ Muñoz-Vega, M.; Massó, F.; Páez, A.; Carreón-Torres, E.; Cabrera-Fuentes, H. A.; Fragoso, J. M.; Pérez-Hernández, N.; Martínez, L. O.; Najib, S.; Vargas-Alarcón, G.; Pérez-Méndez, Ó. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 44.

¹⁹⁵ Balbás, P.; Bolívar, F. *Methods Mol. Biol.* **2004**, *267*, 77-90.

considera una de las líneas celulares microvasculares humanas inmortalizadas mejor caracterizadas.¹⁹⁶ HMEC-1 se une específicamente a los linfocitos en los ensayos de adhesión celular, por lo que resulta de gran utilidad en los ensayos biológicos planteados en esta Tesis Doctoral.¹⁹⁷

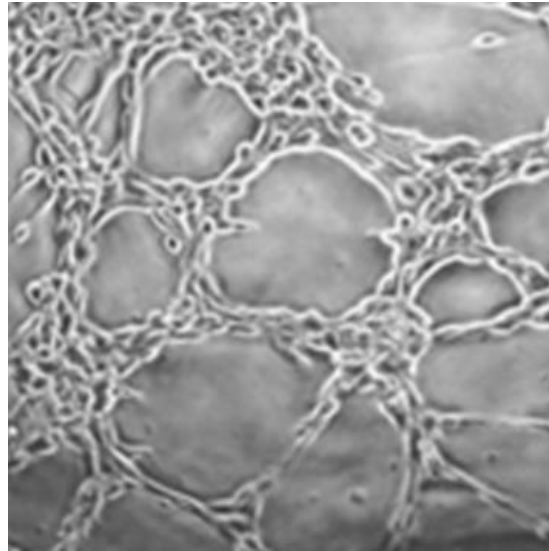


Figura 4.8. Línea celular no tumoral HMEC-1.

Las líneas celulares empleadas en los ensayos biológicos se conservaron a una temperatura de -196°C en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización, en el que se atemperaron a 37°C para su uso.

4.3. Estudios de viabilidad celular

La viabilidad celular se define como el número de células metabólicamente activas en una muestra y su medición aporta una gran información del cultivo celular estudiado. La proliferación de células es un indicador para conocer los mecanismos de acción de genes, proteínas y diferentes vías implicadas en la supervivencia o muerte de la célula, tras su exposición al compuesto a evaluar. A menudo, los métodos empleados para determinar la viabilidad también se utilizan para evaluar la proliferación celular;¹⁹⁸ existe una amplia gama de métodos para determinar la viabilidad celular, que va desde los más sencillos, como el ensayo de exclusión del colorante azul de tripano, hasta otros mucho más complejos, como la

¹⁹⁶ Abécassis, I.; Olofsson, B.; Schmid, M.; Zalczman, G.; Karniguian, A. *Exp. Cell Res.* **2003**, *291*, 363-376.

¹⁹⁷ Ades, E. W.; Candal, F. J.; Swerlick, R. A.; George, V. G.; Summers, S.; Bosse, D. C.; Lawley, T. J. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *99*, 683-690.

¹⁹⁸ Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 1213-1221

microscopía Raman.¹⁹⁹ En el caso de esta Tesis Doctoral, los ensayos que se llevaron a cabo fueron el ensayo de exclusión del azul de tripano y el ensayo MTT, los cuales se explican a continuación.

4.3.1. Ensayo de exclusión del azul de tripano

La determinación de la proliferación celular se puede llevar a cabo mediante el ensayo de exclusión del azul de tripano. Esta técnica es ampliamente utilizada para el recuento de células y permite obtener valores representativos.²⁰⁰

Para el ensayo, se obtiene una alícuota de las células suspendidas en medio de cultivo, a la que se le añade el colorante azul de tripano. La mezcla resultante se deposita en la cámara Neubauer, que consiste en un instrumento similar a un portaobjetos con una cavidad de 0,1 mm y cuatro cuadrículas de 1 mm x 1 mm; el volumen contenido en cada cuadrante es de 0,1 μ L. El fundamento del ensayo es que el colorante azul de tripano es capaz de atravesar la membrana de las células muertas, por lo que estas se teñirán de azul, mientras que es incapaz de entrar dentro de las células vivas, de modo que al microscopio invertido estas se verán blancas, tal y como se muestra en la Figura 4.9.

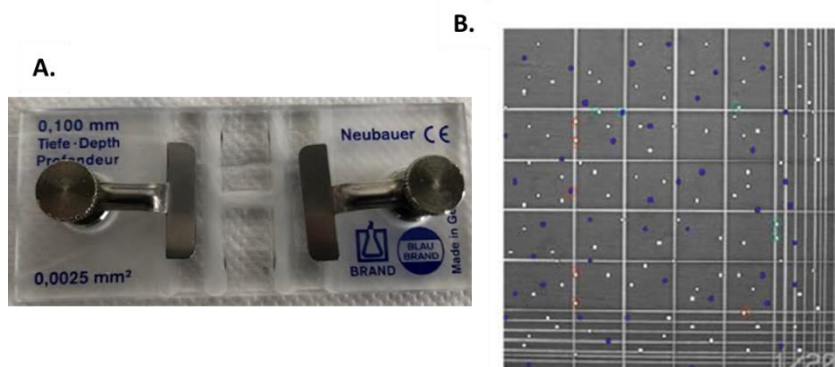


Figura 4.9. A. Cámara Neubauer. B. Cuadrícula de la cámara Neubauer vista con el microscopio invertido; en azul se observan las células muertas, mientras que en blanco se pueden ver las células vivas.

Para cada muestra se obtiene la media de las cuatro secciones de la cuadrícula y se comparan los resultados con la muestra control. De esta

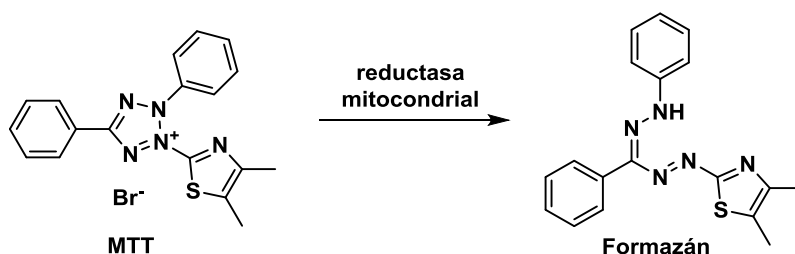
¹⁹⁹ Stoddart, M. J. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 740, 1-6

²⁰⁰ Zhang, M.; Gu, L.; Zheng, P.; Chen, Z.; Dou, X.; Qin, Q.; Cai, X. *J. Clin. Lab. Anal.* **2020**, 34, e23024.

manera, es posible conocer cómo afecta el compuesto evaluado a la proliferación celular.

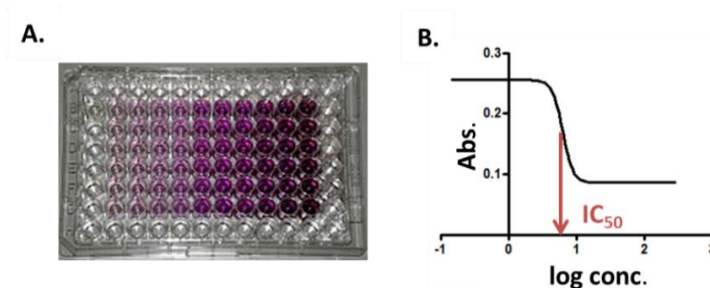
4.3.2. Ensayo MTT

La viabilidad celular se determina a través del valor de IC_{50} , que se define como la concentración de compuesto a la cual la proliferación celular se reduce un 50%. La obtención del IC_{50} se llevó a cabo a través del ensayo colorimétrico del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este método se basa en la reducción por la reductasa mitocondrial del MTT, de color amarillo, que es convertido en formazán, un sólido morado insoluble en disolución acuosa (véase el Esquema 4.1).²⁰¹ Únicamente las células vivas son capaces de llevar a cabo esta reacción, por lo que este método permite medir la proliferación celular en presencia de los compuestos evaluados.²⁰²



Esquema 4.1. Reducción del MTT a formazán.

Una vez obtenido el formazán, este se solubiliza con DMSO y se realiza una cuantificación de la absorbancia entre 450-600 nm mediante un espectrofotómetro. A continuación, se emplea el programa *GraphPad Prism 4* para ajustar los resultados obtenidos a una representación sinusoidal, cuyo punto de inflexión se corresponde con el valor de IC_{50} para cada concentración (ver Figura 4.10.).



²⁰¹ Houdkova, M.; Chaure, A.; Duskocil, I.; Havlik, J.; Kokoska, L. *Molecules* **2021**, *26*, 4179.

²⁰² Gallegos-Hernández, G. F. *Vid supra* **2018**, *10*, 1-4.

Figura 4.10. A. Placa de células para el ensayo de MTT; los pocillos que presentan un color morado más intenso contienen un mayor número de células vivas. B. Cálculo del IC₅₀ a través del programa *GraphPad Prism 4*.

4.4. Estudios de expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica de alta sensibilidad y eficiencia, que proporciona resultados en un corto periodo de tiempo y fáciles de analizar.²⁰³ El ensayo de la PCR es una técnica *in vitro* capaz de amplificar millones de veces secuencias específicas de ADN. Este método se basa en la replicación del ADN llevada a cabo por ADN polimerasas, usualmente de bacterias termófilas, las cuales realizan la síntesis de una cadena complementaria de ADN en sentido 5'→3', empleando para ello un molde de cadena sencilla.²⁰⁴

Existen dos tipos de PCR: la PCR convencional, que evalúa la expresión de genes de manera cualitativa, y la qPCR, que estudia la expresión de genes de forma cuantitativa. La PCR tiene diversas aplicaciones, entre las que se encuentra la cuantificación de la expresión génica cuando se acopla con una reacción de transcripción inversa anterior. En este caso, se conoce como RT-qPCR.²⁰⁵

Los componentes necesarios para realizar la amplificación son:²⁰⁶

- Las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde, y que contienen la secuencia de ADN que se quiere amplificar.
- La enzima ADN polimerasa, encargada de catalizar la reacción, que sintetiza las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia de interés. La enzima que más se emplea es la Taq ADN polimerasa, la cual proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* y al ser termoestable es capaz de realizar su función a temperaturas relativamente altas.
- Los cebadores o *primers*, que son secuencias de oligonucleótidos que contienen la secuencia complementaria a las regiones iniciales y finales a amplificar. En la PCR se emplean dos cebadores, uno denominado *forward*, complementario al inicio de la secuencia, y otro llamado *reverse*,

²⁰³ Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. *Investigación en discapacidad* **2013**, 2, 70-78.

²⁰⁴ Mas, E.; Poza, J.; Ciriza, J.; Zaragoza, P.; Osta, R.; Rodellar, C. *Revista AquaTIC* **2016**, 15.

²⁰⁵ Smith, C. J.; Osborn, A. M. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, 67, 6-20.

²⁰⁶ Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. *Investigación en discapacidad* **2013**, 2, 70-78.

que es complementario a la secuencia final. Ambos deben ser diseñados de forma que permitan la extensión de las cadenas de ADN en dirección 5'→3' por la enzima polimerasa.

- Oligonucleótidos dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*), que son las bases nitrogenadas con los que la ADN polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN, por lo que contribuyen a la especificidad de la reacción.

Además de estos componentes, también se requiere de una solución amortiguadora o *buffer* que contiene el cofactor enzimático magnesio, y agua libre de nucleasas, para evitar la degradación de los ácidos nucleicos. Para realizar el ensayo de la PCR se emplea un termociclador, el cual realiza repeticiones de ciclos de calentamiento y enfriamiento. Las etapas de un ciclo de replicación son:²⁰⁷

- 1) Desnaturalización: el ADN molde se desnaturaliza completamente para así iniciar la síntesis de la nueva cadena complementaria. Este proceso se lleva a cabo aplicando un calentamiento alrededor de los 94°C durante al menos un minuto.
- 2) Alineamiento: el alineamiento de los dos cebadores tiene lugar a una temperatura entre los 40 y 70°C, según la composición de bases.
- 3) Extensión de la cadena: esta etapa se produce a una temperatura elevada, en torno a los 72°C, para conseguir la actividad máxima de la ADN polimerasa y evitar alineamientos inespecíficos. La enzima sintetiza la cadena complementaria de ADN, a partir del cebador, añadiendo los dNTPs secuencialmente en sentido 5'→3'.

Estas etapas se repiten por varios ciclos entre 20 y 30 veces aproximadamente; las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la enzima, dando lugar a una producción exponencial de millones de copias del segmento de ADN específico, como muestra la Figura 4.11.²⁰⁸

²⁰⁷ Bolívar, A. M.; Rojas, A.; García-Lugo, P. *Avan. Biomed.* **2014**, *3*, 25-33.

²⁰⁸ Ramírez-Pacheco, A.; Moreno-Guerrero, S. S.; Medina-Sanson, A. *Gaceta Mexicana de Oncología* **2013**, *12*, 162-173.

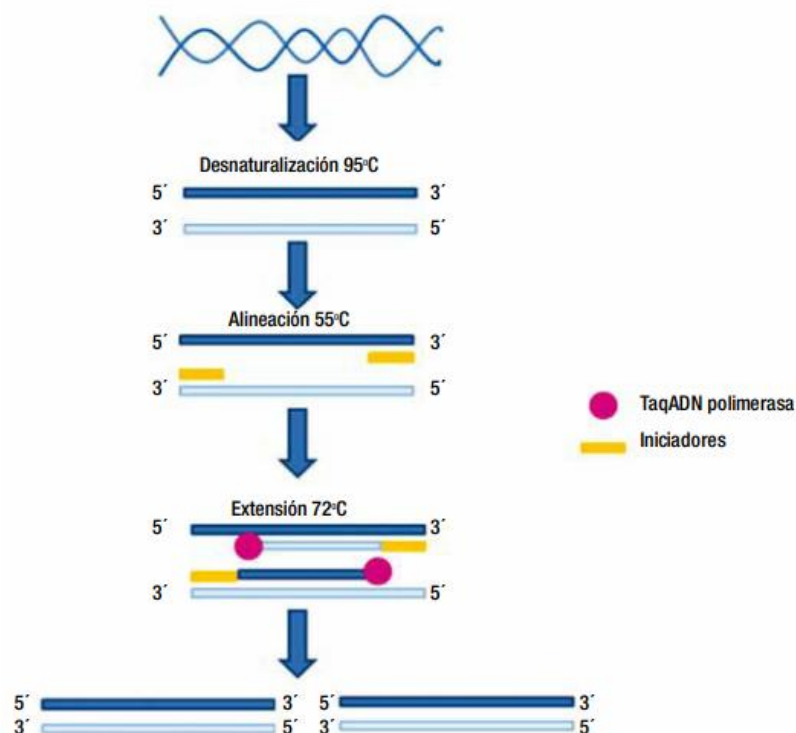


Figura 4.11. Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.²⁰⁸

La PCR cuantitativa o en tiempo real requiere, además de los componentes anteriormente descritos, la adición de especies fluorescentes capaces de unirse al ADN específico, que en esta Tesis fue la sonda TaqMan. Esta sonda está marcada por un fluoróforo donador o *reporter* (FAM o VIC) en el extremo 5' y un aceptor o *quencher* (TAMRA) en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada del donador. Cuando se lleva a cabo la amplificación del ADN, el fluoróforo se libera por la degradación de la sonda gracias a la enzima polimerasa y el equipo mide esa fluorescencia, que se corresponde con la amplificación del gen (ver Figura 4.12.).^{209,210}

²⁰⁹ Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. *Genome Res.* **1996**, 6, 986-994.

²¹⁰ Bass, C.; Nikou, D.; Vontas, J.; Donnelly, M. J.; Williamson, M. S.; Field, L. M. *Malar. Res. Treat.* **2010**.

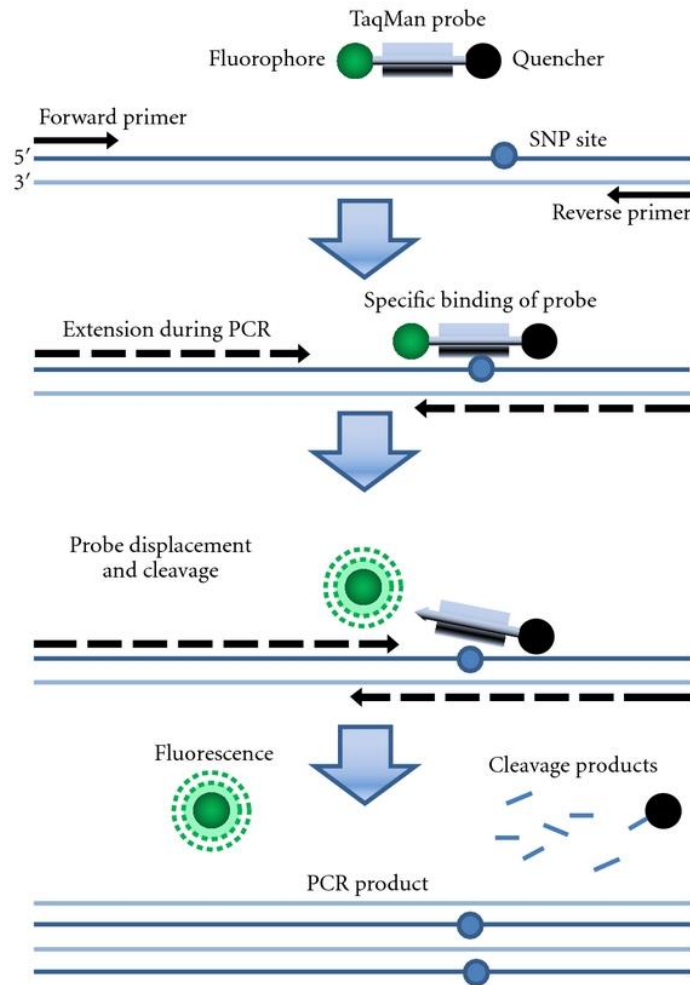


Figura 4.12. Funcionamiento de la sonda TaqMan.²¹⁰

Existen distintas fases en la técnica qPCR, como muestra la Figura 4.13: la primera es una fase lineal, representada como línea base, ya que el equipo no es capaz de detectar la fluorescencia emitida. La segunda fase es de carácter exponencial, debido a que el equipo ya es capaz de detectar la fluorescencia. Por último, está la fase meseta, en el que la fluorescencia se mantiene constante debido a que la polimerasa alcanza su punto de saturación.²¹¹

Para analizar estas curvas, se fija un umbral con un nivel de fluorescencia concreto. La interpolación entre la línea umbral y la curva de fluorescencia obtenida se conoce como C_T (*threshold cycle*) y permite cuantificar la expresión

²¹¹ Wong, M. L.; Medrano, J. F. *Biotechniques* **2005**, 39, 75-85.

génica. Este valor de C_T es inversamente proporcional a la cantidad de ADN en la muestra.^{212,213}

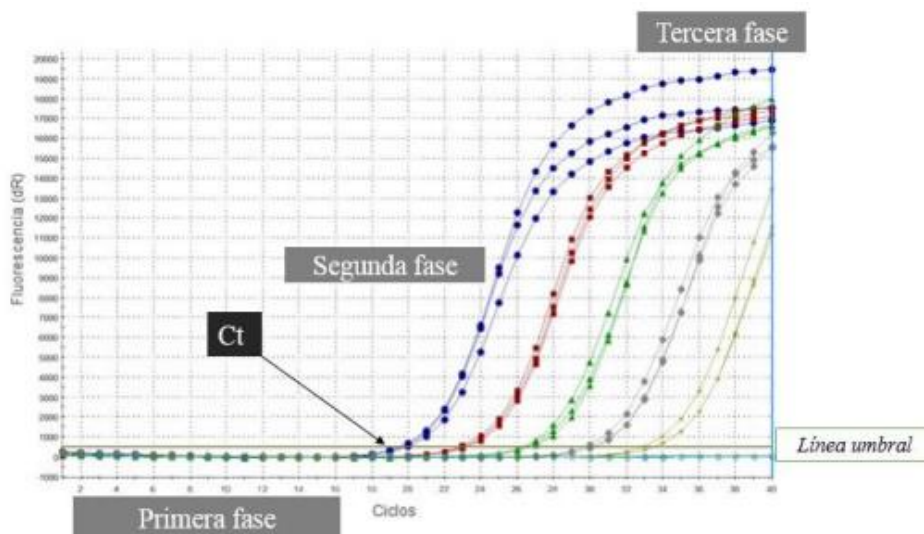


Figura 4.13. Fases de la qPCR.²¹⁴

Para poder calcular la cantidad de cada gen, es necesario calcular la eficiencia (E) de los cebadores de cada uno a través de una curva de calibración, realizada con el logaritmo de distintas concentraciones de ADN frente a sus valores de C_T . La eficiencia se obtiene a partir de la pendiente de la curva de calibrado según la siguiente ecuación:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$$

El cálculo de los valores de la expresión génica se lleva a cabo por cuantificación relativa. Esta técnica compara una muestra tratada con el producto a evaluar con respecto a una muestra sin tratar para un mismo gen. Además, relaciona la cantidad de ADN del gen diana con respecto a la del gen de referencia (control endógeno) para la misma muestra.

Existen dos modelos de cálculo matemático diferentes, en función de si la eficiencia es la misma para el gen diana y el de referencia:

²¹² Díaz-Ferguson, E.; Herod, J.; Galvez, J.; Moyer, G. *Management of Biological Invasions* **2014**, 5, 121-131.

²¹³ Kubista, M.; Andrade, J. M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonák, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjöback, R.; Sjögreen, B.; Strömbom, L.; Ståhlberg, A.; Zoric, N. *Mol. Aspects Med.* **2006**, 27, 95-125.

²¹⁴ Disponible en: <http://academica-e.unavarra.es/xmlui/handle/2454/25596?show=full>

A) Si la eficiencia es la misma se normaliza el C_T del gen específico al C_T del gen endógeno:

$$\Delta C_T = C_T (\text{gen diana}) - C_T (\text{gen endógeno})$$

Posteriormente se compara la muestra tratada con el producto con respecto al control:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{muestra tratada}) - \Delta C_T (\text{control})$$

Por último, se calcula las veces que se expresa el gen específico en una muestra tratada respecto al control (RQ):²¹⁵

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

B) Si la eficiencia no es la misma, el valor de RQ se calcula según la siguiente ecuación:

$$RQ = \frac{\text{muestra normalizada}}{\text{control normalizado}} = \frac{\frac{\text{ADN}(\text{gen diana})\text{muestra}}{\text{ADN}(\text{gen endógeno})\text{muestra}}}{\frac{\text{ADN}(\text{gen diana})\text{control}}{\text{ADN}(\text{gen endógeno})\text{control}}}$$

La cantidad de ADN se obtiene de extrapolar el valor de C_T en la recta de calibrado realizada para el cálculo de la eficiencia del gen diana:

$$C_T = a \times \text{Log} (\text{ADN}) + b$$

$$\text{ADN} = 10^{\frac{C_T - b}{a}}$$

4.5. Estudios de expresión de las proteínas diana

Los estudios de expresión de proteínas resultan de gran utilidad para conocer si los compuestos evaluados presentan algún efecto sobre la expresión de las proteínas de interés relacionadas con la enfermedad del cáncer. Existen diversas técnicas para poder estudiar las alteraciones causadas en esta patología;²¹⁶ en esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo la cuantificación de proteína mediante dos métodos: ELISA y citometría de flujo.

4.5.1. Cuantificación de proteína mediante ELISA

El ensayo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) es una técnica inmunológica basada en la unión de un antígeno a su anticuerpo específico, estando uno de los dos inmovilizado en una fase sólida. Este ensayo permite

²¹⁵ Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 1101-1108.

²¹⁶ López-Durán, M.; Campo-Trapero, J.; Cano-Sánchez, J.; Díez-Pérez, R.; Bascones-Martínez, A. *Avances en Odontostomatología* **2010**, 26, 189-196.

la detección de cantidades muy pequeñas de antígenos como proteínas, hormonas, péptidos o anticuerpos en una muestra líquida.²¹⁷ El sustrato de la muestra interacciona con el complejo antígeno-anticuerpo; esta interacción se puede visualizar mediante enzimas enlazadas a los anticuerpos, transformando al sustrato y provocando un cambio de color. Este cambio de color se mide en un espectrofotómetro, y da idea de la cantidad de antígeno presente en la muestra original.

Hay varios tipos de ensayos ELISA (véase la Figura 4.14). El antígeno de interés se inmoviliza generalmente en placas de 96 pocillos, a través de adsorción directa a la misma o mediante un anticuerpo que se ha adherido previamente a la placa y lo captura. El antígeno entonces es detectado directamente (anticuerpo primario marcado) o indirectamente (anticuerpo secundario marcado). Otro tipo de ensayo ELISA es el que se conoce como tipo sándwich, en el que el antígeno de interés se encuentra entre dos anticuerpos primarios.

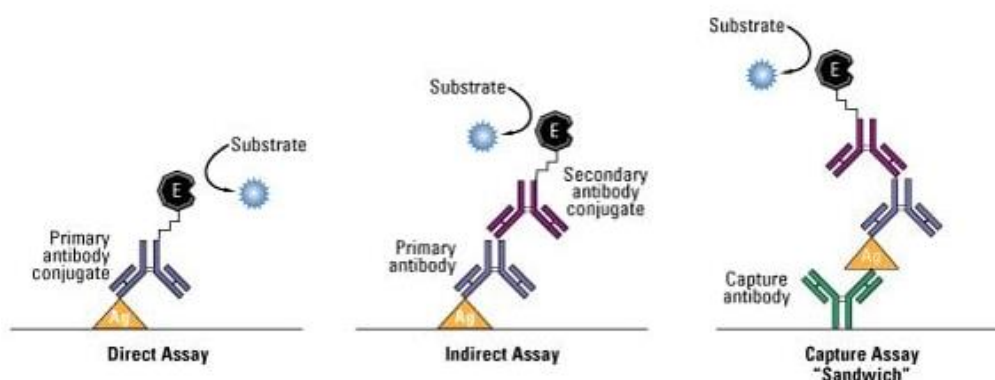
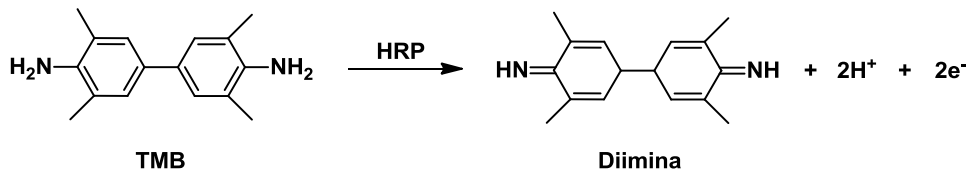


Figura 4.14. Tipos de ensayos ELISA.²¹⁸

La enzima que se emplea normalmente es la peroxidasa conocida como HRP por sus siglas en inglés (Horseradish peroxidase), ya que convierte el sustrato tetrametilbencidina (TMB, solución incolora) en diimina (coloreada en azul) por la reacción de oxidación, como se muestra en el Esquema 4.2. Cuando se añade el agente que detiene la reacción, concretamente ácido sulfúrico, la disolución adquiere una coloración amarilla, cuya absorbancia se mide en un espectrofotómetro a 450 nm.

²¹⁷ Gan, S. D.; Patel, K. R. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, e12.

²¹⁸ Disponible en: <https://gentaur.es/conocimiento/vision-general-elisa>



Esquema 4.2. Reacción de oxidación de TMB a diimina.

4.5.2. Cuantificación relativa de proteína mediante citometría de flujo

La citometría de flujo permite distinguir distintas poblaciones de células en una misma muestra y medir, simultáneamente, varias proteínas intracelulares cuando se emplean anticuerpos adecuados. Para ello, el anticuerpo de elección suele unirse covalentemente a moléculas fluorescentes, conocidas como fluoróforos, los cuales emiten fotones con mayor longitud de onda tras exponerse a la radiación de una fuente de excitación. De esta forma, se puede hacer una correlación entre la intensidad de la fluorescencia obtenida con la cantidad de proteína presente en la superficie celular.²¹⁹ Por otro lado, cuando se quiere realizar un ensayo de citometría de flujo a nivel intracelular es necesario fijar y permeabilizar las células antes de marcar los antígenos. Para ello suele emplearse formaldehído o etanol como fijador, mientras que el Tritón X-100 o detergentes similares se usan para permeabilizar la célula.

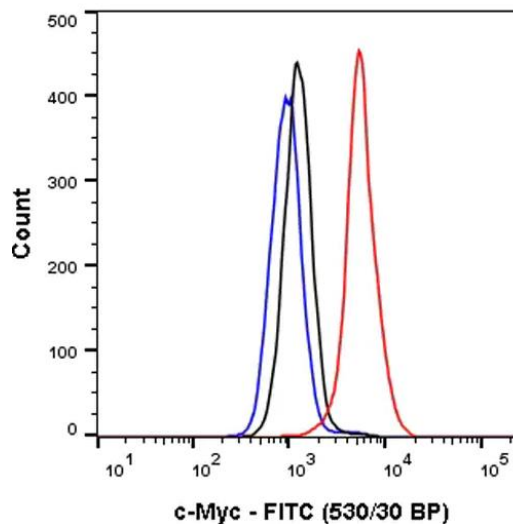


Figura 4.15. Histograma de células HeLa marcadas con FITC Rabbit anti-c-Myc monoclonal (ab223913) en rojo. La línea negra representa el control del anticuerpo, a la misma

²¹⁹ Rodríguez-Martín, S. L. *Revista Med.* **2004**, 12, 86-100.

concentración y controles que el anticuerpo primario, y la azul el control de la muestra sin marcar.²²⁰

Existe una amplia gama de fluoróforos que se pueden adquirir comercialmente, como FITC, del inglés *fluorescein isothiocyanate*, o el conocido como Alexa Fluor®.^{221,222} En esta Tesis Doctoral, se llevó a cabo la cuantificación de las proteínas VEGFR-2, PD-L1, c-Myc, Akt/p-Akt y ERK/p-ERK mediante la técnica de citometría de flujo.

4.6. Estudios del efecto sobre el ciclo celular por citometría de flujo

El ensayo del ciclo celular permite conocer la distribución de las células tratadas con los diferentes compuestos. Para llevarlo a cabo se emplea el equipo de citometría de flujo, que es capaz de proporcionar información cuantitativa sobre cada célula. Este equipo también permite identificar subpoblaciones de células distintas en una misma muestra, incluso cuando son escasas.²²³

La técnica de citometría de flujo consiste en hacer pasar las células suspendidas en un fluido a través de un fino tubo transparente sobre el que incide la luz láser. Las células dispersan la luz en función de su tamaño y complejidad y esta información es recogida por un detector. Como se muestra en la Figura 4.16, cuando la luz se dispersa frontalmente se obtiene un parámetro llamado FSC, *forward scatter* en inglés, el cual indica el tamaño de la célula. Por el contrario, si la dispersión es lateral, el parámetro obtenido se denomina SSC, *side scatter*, e informa sobre la complejidad celular. El citómetro consta de un sistema electrónico que transforma los fotones en corriente eléctrica, la cual es recibida por el ordenador y traducida en gráficos e histogramas.²²⁴

²²⁰ Disponible en: <https://www.abcam.com/fits-c-myc-antibody-y69-ab223913.html>

²²¹ Mahmoudian, J.; Hadavi, R.; Jeddi-Tehrani, M.; Mahmoudi, A. R.; Bayat, A. A.; Shaban, E.; Vafakhah, M.; Darzi, M.; Tarahomi, M.; Ghods, R. *Cell J.* **2011**, *13*, 169-172.

²²² Rai, S.; Bhardwaj, U.; Misra, A.; Singh, S.; Gupta, R. *Int. J. Lab. Hematol.* **2018**, *40*, e52-e54.

²²³ Barrera-Ramírez, L. M.; Drago-Serrano, M. E.; Pérez-Ramos, J.; Sainz-Espuñes, T. R.; Zamora, A. C.; Gómez-Arroyo, F.; Mendoza-Pérez, F. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* **2004**, *17*, 42-55.

²²⁴ Pérez-Lara, J. C.; Santiago-Cruz, W.; Romero-Ramírez, H.; Rodríguez-Alba, J. C. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* **2019**, *18*, 41-52.

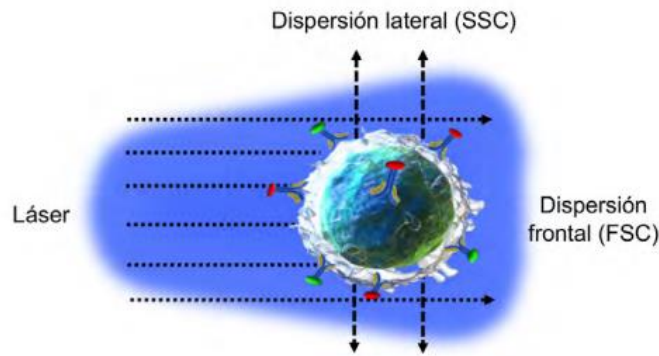


Figura 4.16. Dispersión de la luz emitida tras incidir con el láser. La desviación frontal de la luz indica el tamaño de la célula (FSC), mientras que la dispersión lateral determina la complejidad de la misma (SSC).²²⁴

En la citometría de flujo es habitual el empleo de marcadores de fluorescencia que se unan a diferentes elementos de la célula. En el caso del ensayo del ciclo celular, la cantidad de ADN de la célula madre se incrementa a medida que se sintetiza ADN nuevo (fase S). Cuando existen dos copias completas de ADN, la célula se divide físicamente para dar lugar a dos células hijas (fase G₂/M). Además, las células que han sufrido apoptosis tienen menor cantidad de ADN que las vivas. Por tanto, el contenido de ADN va variando en función de la fase del ciclo celular. En este ensayo se emplea yoduro de propidio, que se intercala en el ADN e indica la fase del ciclo en la que se encuentra la célula.²²⁵

4.7. Estudios de la actividad antiangiogénica

Uno de los estudios *in vitro* más empleado para evaluar la angiogénesis consiste en medir la capacidad de las células endoteliales de formar estructuras tridimensionales con forma de tubos (tubulogénesis). Este proceso, que sucede de manera espontánea pero requiere cierto tiempo, se puede mejorar mediante el uso de coágulos de fibrina o colágeno, los cuales cubren las placas de cultivo y consiguen una formación de túbulos bastante similar a la que se produce *in vivo*.²²⁶

Las células endoteliales pueden formar la estructura tubular sobre un soporte de matriz extracelular, conocido como Matrigel®. Este gel está compuesto de membrana basal extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), un tumor rico en proteínas, entre las que destaca la

²²⁵ Crowley, L. C.; Chojnowski, G.; Waterhouse, N. J. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**

²²⁶ Auerbach, R.; Lewis, R.; Shinnars, B.; Kubai, L.; Akhtar, N. *Clin. Chem.* **2003**, *49*, 32-40.

laminina.^{227,228} En la Figura 4.17 se puede observar el proceso de formación de túbulos empleando esta técnica.

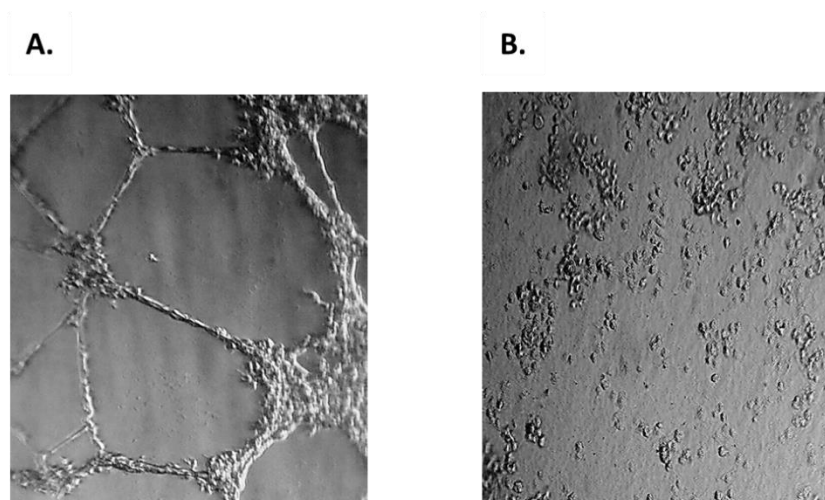


Figura 4.17. Ensayo de tubulogénesis en Matrigel®. *A.* Células HMEC-1 sin tratar. *B.* La adición del compuesto Sorafenib impide la formación de estructuras tubulares.

Los compuestos que afectan a la vascularización del tumor pueden actuar por dos mecanismos distintos: antiangiogénicos, evitando la formación de la red vascular, o como antivascuales, rompiendo los vasos sanguíneos ya formados anteriormente. Los ensayos de tubulogénesis llevados a cabo en esta Tesis se efectuaron en células HMEC-1 sobre Matrigel® incubadas con los compuestos durante 20 horas a 37°C.

4.8. Evaluación biológica de la Familia 1

El grupo de Rosa Claramunt de la UNED había desarrollado nuevas moléculas pequeñas con potencial actividad anticáncer, combinando la estructura de la curcumina, producto natural con moderada actividad anticáncer, entre otras, y anillos de triazolonas (véase Esquema 3.1). Nuestro grupo de investigación se hizo responsable de la evaluación biológica de todos los derivados sintetizados por el grupo de Claramunt y, en concreto, pasó a formar parte de mi proyecto de Tesis Doctoral. A continuación se pasa a describir todos los estudios que se efectuaron para determinar la potencial actividad anticáncer de los mismos.

²²⁷ Ikeda, T.; Yoshitake, Y.; Yoshitomi, Y.; Saito-Takatsuji, H.; Ishigaki, Y.; Yonekura, H. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19453.

²²⁸ Disponible en: <https://es.vwr.com/store/product/826102/matriz-de-membrana-basal-corning-matrigel>

En primer lugar, se evaluó el efecto de las triazolonas **T.1-T.10** sobre la viabilidad celular mediante el ensayo MTT frente a dos líneas celulares de carcinoma humano: HT-29, adenocarcinoma de colon y A549, adenocarcinoma de pulmón. Además, también se realizó el ensayo frente a la línea celular no tumoral HEK-293, la cual proviene de células embrionarias de riñón. Posteriormente, se evaluó la capacidad de los compuestos para reducir la expresión de los genes *hTERT*, *c-Myc* y *PD-L1* mediante la técnica qPCR, así como su capacidad de reducir la expresión de las proteínas c-Myc y PD-L1. Finalmente, se estudió la interacción directa de los compuestos con la proteína c-Myc, mediante el método ELISA y la interacción directa de las triazolonas con la proteína PD-L1 se evaluó mediante el ensayo de PTS.

4.8.1. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

La capacidad de los compuestos **T.1-T.10** para inhibir la proliferación celular, se determinó mediante la medida de los valores de IC₅₀ frente a las líneas celulares tumorales HT-29 y A549, así como la línea celular no tumoral HEK-293. Los valores medidos, junto con los obtenidos para los compuestos de referencia curcumina y colchicina, conocidos compuestos antitumorales, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de IC₅₀ (μM) para las triazolonas **T.1-T.10***

COMPUESTO	HT-29	A549	HEK-293
Curcumina	13.6 ± 0.5	62 ± 7	10.8 ± 0.7
Colchicina	50 ± 5 nM	11 ± 2 nM	5 ± 1 nM
T.1	29 ± 2	50 ± 2	> 100
T.2	32 ± 4	41 ± 3	> 100
T.3	20 ± 2	39 ± 6	> 100
T.4	23 ± 2	10.2 ± 0.3	> 100
T.5	48 ± 3	73 ± 9	> 100
T.6	11.7 ± 0.4	93 ± 6	> 100
T.7	10.8 ± 0.7	45 ± 5	> 100
T.8	28 ± 2	27 ± 4	> 100
T.9	10.5 ± 0.8	91 ± 8	> 100
T.10	10.9 ± 0.3	98 ± 7	> 100

*Los datos son el promedio (±SD) de tres experimentos.

Los valores de IC₅₀ obtenidos para los compuestos **T.1-T.10** están todos en el rango micromolar. En general, se aprecia una mayor actividad de los compuestos en la línea celular HT-29 que en la línea celular A549. En la línea celular HT-29 los compuestos más activos son **T.6, T.7, T.9 y T.10**, mientras que en la línea celular A549 destaca el compuesto **T.4** sobre los demás. Cabe destacar que las triazolonas apenas mostraron actividad antiproliferativa frente a la línea celular no tumoral HEK-293, mientras que la curcumina y colchicina son mucho más citotóxicas frente a esta línea, lo que sugiere una mayor selectividad de los compuestos **T.1-T.10** en comparación con los compuestos de referencia.

4.8.2. Inhibición de la expresión de los genes *hTERT*, *c-Myc* y *PD-L1* mediante la técnica RT-qPCR

La capacidad de los compuestos de inhibir la expresión de los genes *hTERT*, *c-Myc* y *PD-L1* se llevó a cabo mediante el método de RT-qPCR, empleando las células tumorales HT-29. Las células se incubaron 48 horas en presencia de DMSO, en el caso de la muestra control, y de los compuestos seleccionados a concentraciones próximas a sus respectivos valores de IC₅₀ en la línea celular HT-29. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de expresión de los genes *hTERT*, *c-Myc* y *PD-L1**

COMPUESTO	Dosis	% <i>hTERT</i>	% <i>c-Myc</i>	% <i>PD-L1</i>
Curcumina	10 µM	95 ± 3	71 ± 4	100
Colchicina	40 nM	50 ± 7	32 ± 8	88 ± 4
T.1	30 µM	83 ± 8	80 ± 20	72 ± 6
T.2	30 µM	100 ± 20	41 ± 11	28 ± 2
T.3	30 µM	76 ± 19	70 ± 22	71 ± 6
T.4	30 µM	80 ± 10	66 ± 18	81 ± 15
T.5	30 µM	77 ± 5	75 ± 20	63 ± 10
T.6	10 µM	60 ± 5	60 ± 15	35 ± 3
T.7	10 µM	59 ± 12	53 ± 22	42 ± 3
T.8	30 µM	100	58 ± 16	100
T.9	10 µM	62 ± 19	74 ± 20	44 ± 4
T.10	10 µM	22 ± 5	63 ± 20	40 ± 5

*Los datos son el promedio (±SD) de tres experimentos.

La colchicina y los compuestos **T.6**, **T.7** y **T.10** mostraron una gran capacidad para reducir la expresión del gen *hTERT* (menos del 60% respecto al valor del control), siendo el más activo la triazolona **T.10**, el cual inhibió la expresión génica a un 30% cuando se empleó en una concentración de 10 μ M. Respecto al gen *c-Myc*, de nuevo la colchicina y los compuestos **T.2**, **T.6** y **T.8** lograron reducir la expresión de este gen a valores inferiores al 60%, siendo **T.2** la triazolona más activa, ya que disminuye la expresión del gen *c-Myc* a menos de la mitad. En cuanto a la inhibición del gen *PD-L1*, los compuestos **T.2**, **T.6**, **T.7**, **T.9** y **T.10** mostraron una inhibición significativa del mismo, en concreto, la triazolona **T.2** disminuye la expresión del gen *PD-L1* al 28%. Por el contrario, la curcumina muestra muy poca capacidad de inhibición de estos genes, especialmente en el caso del gen *PD-L1*.

4.8.3. Efecto en la expresión de las proteínas c-Myc y PD-L1 mediante el método ELISA

La capacidad de los compuestos de regular la expresión de las proteínas c-Myc y PD-L1, para la línea celular HT-29, se determinó mediante el método ELISA. Para ello, las células se incubaron durante 48 horas en presencia de DMSO, en el caso de la muestra control, y de los compuestos seleccionados a las concentraciones que se muestran en la Tabla 3. A continuación, las células se lisaron y se midió la cantidad de ambas proteínas en el lisado.

Tabla 3. Porcentaje de expresión de las proteínas c-Myc y PD-L1 tras 48 h de incubación*

COMPUESTO	Conc.	% c-Myc	% PD-L1
Curcumina	10 μ M	78 \pm 4	88 \pm 2
Colchicina	40 nM	99 \pm 6	98 \pm 7
T.1	30 μ M	84 \pm 3	70 \pm 3
T.2	30 μ M	100 \pm 10	57 \pm 19
T.3	30 μ M	63 \pm 8	74 \pm 4
T.4	30 μ M	88 \pm 12	90 \pm 18
T.5	30 μ M	73 \pm 9	95 \pm 5
T.6	10 μ M	80 \pm 5	58 \pm 6
T.7	10 μ M	100 \pm 10	100 \pm 11
T.8	30 μ M	60 \pm 15	92 \pm 12
T.9	10 μ M	77 \pm 3	64 \pm 8
T.10	10 μ M	98 \pm 3	70 \pm 14

*Los datos son el promedio (\pm SD) de tres experimentos.

Los compuestos **T.3** y **T.8** son capaces de reducir la expresión de la proteína c-Myc en torno al 60%, mientras que los compuestos **T.6** y **T.9** reducen la expresión de la proteína PD-L1 también al 60%. En comparación con estas triazolonas, la curcumina y la colchicina muestran menor capacidad para disminuir la expresión de estas dos proteínas.

4.8.4. Interacción directa con la proteína c-Myc con el método ELISA

Para estudiar si los compuestos eran capaces de unirse directamente a la proteína c-Myc, se midió la cantidad de proteína libre restante después de una solución acuosa, la cual contiene 1000 pg/mL de c-Myc y 100 μ M del correspondiente ligando, dejando que interaccionen durante 30 minutos. La cantidad de proteína libre se determinó por el método ELISA y los resultados se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Interacción ligando/proteína c-Myc por ELISA*

COMPUESTO	% c-Myc libre	% c-Myc en célula
Curcumina	64 \pm 11	78 \pm 4
Colchicina	99 \pm 3	99 \pm 6
T.1	86 \pm 9	84 \pm 3
T.2	93 \pm 4	100 \pm 10
T.3	65 \pm 4	63 \pm 8
T.4	85 \pm 3	88 \pm 12
T.5	75 \pm 6	73 \pm 9
T.6	84 \pm 6	80 \pm 5
T.7	89 \pm 4	100 \pm 10
T.8	85 \pm 5	60 \pm 15
T.9	80 \pm 10	77 \pm 3
T.10	90 \pm 3	98 \pm 3

*Los datos son el promedio (\pm SD) de tres experimentos.

Los resultados coinciden con los obtenidos en el anterior estudio de inhibición de proteínas en las células tumorales HT-29 (véase la Tabla 3 y la tercera columna de la Tabla 4). Por ejemplo, en presencia de la triazolona **T.1**, el 86% de la proteína c-Myc se detectó en la solución acuosa, mientras que cuando las células HT-29 fueron tratadas con la triazolona **T.1** durante 48 horas se midió el 84% de la proteína c-Myc. Estos resultados parecen indicar

que los compuestos estudiados son capaces de llegar al núcleo de la célula, lugar donde se encuentra c-Myc, y unirse a esta proteína.

4.8.5. Interacción directa con la proteína PD-L1 con la técnica PTS

Para conocer la afinidad de los compuestos por la proteína PD-L1, se llevó a cabo un ensayo de desplazamiento térmico de proteínas, cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Interacción ligando/PD-L1 por desplazamiento térmico de proteína (ΔT_m)*

COMPUESTO	ΔT_m	% PD-L1 en célula
Curcumina	+ 1.5°C	88 ± 2
Colchicina	+ 0.5°C	98 ± 7
T.2	+ 4°C	57 ± 19
T.3	+ 3°C	74 ± 4
T.6	+ 3°C	58 ± 6
T.9	+ 3°C	64 ± 8

*Los datos son el promedio (\pm SD) de tres experimentos.

En este caso, los compuestos no eran tan activos, ya que solo cinco de ellos fueron capaces de modificar la temperatura de fusión de la proteína. El compuesto más activo fue la triazolona **T.2**, con un aumento de la temperatura de fusión de 4°C, seguido de los compuestos **T.3**, **T.6** y **T.9**, con un incremento de temperatura de 3°C, y, finalmente, la curcumina, con un aumento de 1.5°C. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en el estudio previo de inhibición de proteínas en las células HT-29 (véase la Tabla 3 y la tercera columna de la Tabla 5), en el que los compuestos **T.2**, **T.3**, **T.6** y **T.9** fueron los más activos en la inhibición de la expresión de esta proteína.

4.8.6. Conclusiones

Se ha evaluado la actividad antiproliferativa y la capacidad para reducir la expresión de los genes *hTERT*, *c-Myc* y *PD-L1* de diez diaril-1,2,4-triazolonas. Todos los compuestos muestran actividad antiproliferativa en el rango micromolar en las líneas celulares tumorales HT-29 y A549, siendo además muy poco tóxicos en la línea celular no tumoral HEK-293. Los compuestos con mayor actividad en la línea celular HT-29 son **T.6**, **T.7**, **T.9** y **T.10**, mientras que el compuesto **T.4** es el más destacado en la línea celular A549. En cuanto a la expresión génica, el compuesto **T.10** es el más activo

reduciendo la expresión del gen *hTERT* y el compuesto **T.2** en la reducción de la expresión génica de *c-Myc*. Sin embargo, son los compuestos **T.6** y **T.10** los que combinan una mayor capacidad antiproliferativa con la reducción simultánea de la expresión génica de *hTERT*, *c-Myc* y *PD-L1*. Estos resultados son muy interesantes, ya que algunos estudios han revelado que las terapias farmacológicas dirigidas hacia la transcripción de oncogenes como *hTERT* o *c-Myc* pueden ser una estrategia eficaz en el tratamiento del cáncer.^{229,230}

En la inhibición de la expresión de la proteína *c-Myc*, los compuestos más activos son **T.3** y **T.8**, los cuales la disminuyen alrededor de un 60%, mientras que para la inhibición de la expresión de la proteína *PD-L1* los compuestos que presentan mayor actividad son **T.2** y **T.6**. A partir de estos resultados, se puede deducir que la presencia de halógenos en el anillo de fenilo favorece la actividad biológica de los compuestos, ya que **T.1**, que presenta grupos metilo en esta posición, muestra relativamente poca actividad.

La Figura 4.18 muestra un gráfico del gen *hTERT* y porcentajes de la proteína *c-Myc* detectados, así como los valores de IC_{50} en la línea celular HT-29, frente a las triazolonas. Se observa una similitud en la forma de las curvas de *hTERT* y de IC_{50} , especialmente para las triazolonas **T.1-T.4** y **T.6-T.9**.

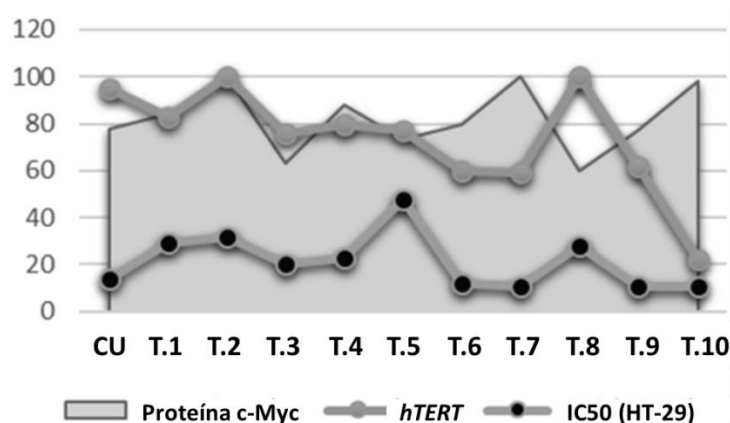


Figura 4.18. Porcentaje de gen *h-TERT* y proteína *c-Myc* detectados, así como los valores IC_{50} en la línea celular HT-29.

²²⁹ Bouvard, C.; Min Lim, S.; Ludka, J.; Yazdani, N.; Woods, A.K.; Chatterjee, A.; Schultz, P.G.; Zhu, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2017**, *114*, 3497-3502.

²³⁰ Debb, D.; Gao, X.; Liu, Y.; Pindolia, Y.; Gautam, S.C. *Oncol. Rep.* **2015**, *34*, 518-524.

En cuanto a la inhibición de la proteína c-Myc, existe una correlación con la expresión del gen *hTERT* para los compuestos **T.1-T.5**; esto podría indicar que una reducción en la expresión génica de *hTERT* se debe a la inhibición de la proteína c-Myc causada por la acción de estos compuestos. Por lo que respecta a la curcumina y al resto de los compuestos estudiados **T.6-T.10**, no hay una correlación directa entre estas dos dianas, por lo que estos compuestos pueden estar actuando mediante un mecanismo distinto.

La Figura 4.19 representa el gráfico de los valores de inhibición mostrados para cada uno de los compuestos estudiados. Se puede apreciar que el compuesto **T.6** es el que combina las actividades más altas frente a las distintas dianas biológicas.

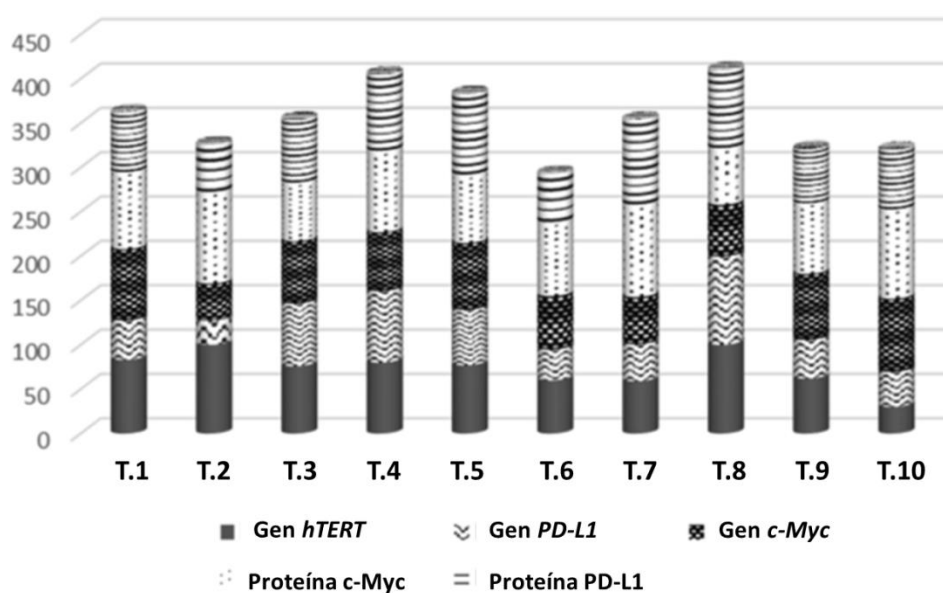


Figura 4.19. Porcentaje de expresión de todos los oncogenes diana y las proteínas asociadas.

En resumen, algunas de las triazolonas estudiadas han demostrado poseer actividad relevante en la inhibición de la expresión génica de *hTERT*, *c-Myc* y *PD-L1*, así como en la inhibición de las proteínas c-Myc y PD-L1, siendo particularmente el compuesto **T.6** el más prometedor.

4.9. Evaluación biológica de la Familia 2

Los compuestos honokiol y magnolol son productos naturales que tienen gran interés para la industria farmacéutica, debido a que presentan diversas

propiedades farmacológicas tales como actividad antioxidante, antiinflamatoria, antineurodegenerativa y antitumoral, entre otras.²³¹ Ambos productos presentan un sistema bifenílico en sus estructuras, como se puede apreciar en la Figura 4.20. Este sistema puede considerarse un elemento estructural muy útil en el desarrollo de compuestos.²³²

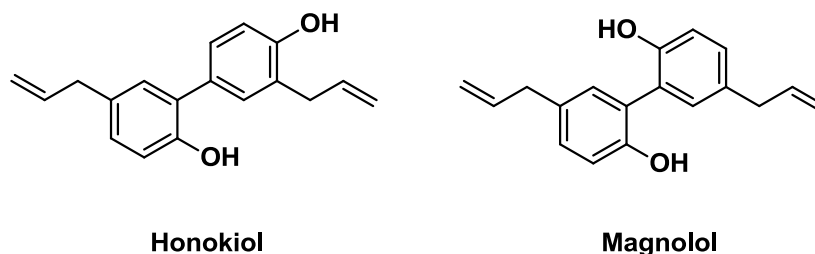


Figura 4.20. Estructura del honokiol y magnolol.

En este capítulo de la Tesis Doctoral se muestra la investigación de las propiedades anticancerosas de derivados biarílicos sintéticos relacionados estructuralmente con el honokiol.²³³ Las arilpiridinas y arilpirimidinas, que pueden considerarse aza-análogos de los derivados bifenílicos, constituyen la base estructural de un gran número de compuestos con gran utilidad en terapéutica; por ejemplo, la estructura de pirimidina se encuentra en moléculas de muchos compuestos con diversas propiedades farmacológicas, como antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y antitumoral, entre otras muchas.²³⁴ A diferencia de los derivados bifenílicos, estos compuestos presentan uno o dos átomos de nitrógeno, los cuales les confieren más polaridad y la habilidad de establecer interacciones adicionales con dianas biológicas mediante enlaces no covalentes, como puentes de hidrógeno. Además, cuando a estos motivos estructurales se les añaden sustituyentes polares como grupos hidroxilo o metoxilo, se incrementan en gran medida las posibilidades de establecer interacciones con dianas biológicas.

²³¹ (a) Shen, J. L.; Man, K. M.; Huang, P. H.; et al. *Molecules* **2010**, *15*, 6452-6465. (b) Lee, Y.J.; Lee, Y. M.; Lee, C. K.; Jung, J. K.; Han, S. B.; Hong, J. T. *Pharmacol Ther.* **2011**, *130*, 157-176.

²³² (a) Han, C.; Zhang, J.; Zheng, M.; Xiao, Y.; Li, Y.; Liu, G. *Mol. Divers.* **2011**, *15*, 857-876. (b) Brown, D. G.; Boström, J. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4443-4458.

²³³ (a) Sánchez-Peris, M.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3108-3115. (b) Sánchez-Peris, M.; Murga, J.; Falomir, E.; Carda, M.; Marco, J. A. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *89*, 577-584.

²³⁴ (a) Jain, K. S.; Chitre, T. S.; Miniyar, P. B.; et al. *Curr. Sci.* **2006**, *90*, 793-803. (b) Yoon, T.; De Lombaert, S.; Brodbeck, R.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4486-4490. (c) Gleave, R. J.; Beswick, P. J.; Brown, A. J.; et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6578-6581. (d) Dudhe, R.; Sharmab, P. K.; Vermae, P.; Chaudhary, A. *J. Adv. Sci. Res.* **2011**, *2*, 10-17. (e) Kaur, R.; Kaur, P.; Sharma, S.; et al. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2015**, *10*, 23-71.

En esta Tesis se evaluaron biológicamente los derivados **A.1-A.24**, relacionados estructuralmente con el honokiol. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron frente a las líneas celulares tumorales HT-29 y MCF-7, línea celular de cáncer de mama, y frente a la línea no tumoral HEK-293. De estos compuestos, doce derivados seleccionados se evaluaron por su capacidad para inhibir la expresión génica de *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc*, así como la producción de la proteína c-Myc total y la secreción de proteína VEGF.

4.9.1. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El ensayo MTT se empleó para medir la capacidad de los compuestos **A.1-A.24** para inhibir la proliferación celular, mediante la medida de los valores de IC₅₀ frente a las líneas celulares tumorales HT-29 y MCF-7, así como a la línea celular no tumoral HEK-293. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6, en la que también se muestran los datos obtenidos en esas mismas líneas celulares para el honokiol.

Tabla 6. Valores de IC₅₀ (μM) de los compuestos **A.1-A.24***

COMPUESTO	HEK-293	HT-29	MCF-7
Honokiol	40 ± 14	25 ± 3	35 ± 7
A.1	>400	>400	1.7 ± 0,8
A.2	390 ± 80	197 ± 7	7 ± 4
A.3	234 ± 21	>400	>400
A.4	170 ± 70	56 ± 7	210 ± 40
A.5	321 ± 2	>400	>400
A.6	294 ± 18	115 ± 7	41 ± 21
A.7	100 ± 40	59 ± 4	210 ± 40
A.8	>400	>400	223 ± 9
A.9	>400	>400	41 ± 23
A.10	20 ± 9	30 ± 7	130 ± 50
A.11	>400	>400	48 ± 6
A.12	>400	>400	7 ± 3
A.13	90 ± 40	380 ± 90	61 ± 4
A.14	>400	>400	>400
A.15	>400	>400	200 ± 30
A.16	>400	>400	>400
A.17	210 ± 30	310 ± 30	51 ± 22

A.18	350 ± 90	210 ± 30	>400
A.19	>400	120 ± 70	157 ± 24
A.20	>400	26 ± 18	160 ± 50
A.21	100 ± 40	120 ± 30	71 ± 18
A.22	>400	240 ± 80	120 ± 40
A.23	>400	160 ± 60	100 ± 40
A.24	>400	180 ± 80	73 ± 7

*Los datos son el promedio (\pm SD) de tres experimentos.

La mayoría de los compuestos mostraron una baja actividad frente a la línea no tumoral HEK-29, mientras que en la línea celular MCF-7 fueron más activos, en general, que frente a la línea HT-29. Por ejemplo, los piridinilfenoles **A.2** y **A.6** y los pirimidinilfenoles **A.9** y **A.13** son relativamente activos frente a la línea MCF-7; sin embargo, esta relación entre la estructura y la actividad antiproliferativa no se observa en otros compuestos relacionados estructuralmente, como sucede con **A.3**, el cual no muestra actividad antiproliferativa, mientras que su análogo **A.7** es bastante activo en la línea HT-29. Una conclusión similar se puede extraer de los compuestos que presentan el anillo 3,4-dimetoxifenilo: el compuesto **A.4** muestra bastante actividad en la línea celular HT-29, pero sus análogos **A.8**, **A.11** y **A.15** no muestran ninguna actividad antiproliferativa en esta línea celular.

Doce compuestos (**A.2**, **A.4**, **A.5**, **A.6**, **A.7**, **A.10**, **A.18**, **A.19**, **A.20**, **A.22**, **A.23** y **A.24**) fueron seleccionados para posteriores evaluaciones biológicas; esta selección se hizo en base a que presentaban valores de IC_{50} bajos para alguna de las líneas celulares tumorales y/o altos para la línea no tumoral HEK-293.

4.9.2. Inhibición de la expresión de los genes *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc* por la técnica RT-qPCR

Con el objetivo de estudiar si los compuestos seleccionados eran capaces de reducir la expresión de los genes *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc*, se llevó a cabo el ensayo de RT-qPCR en la línea tumoral HT-29. Las células se incubaron durante 48 horas con DMSO, en el caso del control, y en presencia de los compuestos seleccionados, a concentraciones próximas a sus respectivos valores de IC_{50} para la línea HT-29 (ver Tabla 7).

Tabla 7. Concentraciones para los compuestos evaluados.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
A.20	10 μ M
A.10, Honokiol	20 μ M
A.4, A.7	40 μ M
A.19	80 μ M
A.2, A.18	100 μ M
A.6	145 μ M
A.22, A.23, A.24	160 μ M
A.5	240 μ M

La Figura 4.21 muestra los resultados obtenidos para la expresión del gen *hTERT*. Siete de los doce derivados sintéticos estudiados mostraron una capacidad de reducir la expresión génica de *hTERT* a niveles un 45% más bajos que el valor del honokiol. Los compuestos **A.4**, **A.7** y **A.20** fueron los más activos, ya que fueron capaces de reducir la expresión génica de *hTERT* hasta un 20%, 28% y 30%, respectivamente, respecto al control. Además, el compuesto **A.20** realiza su acción a una concentración menor que el producto natural, honokiol.

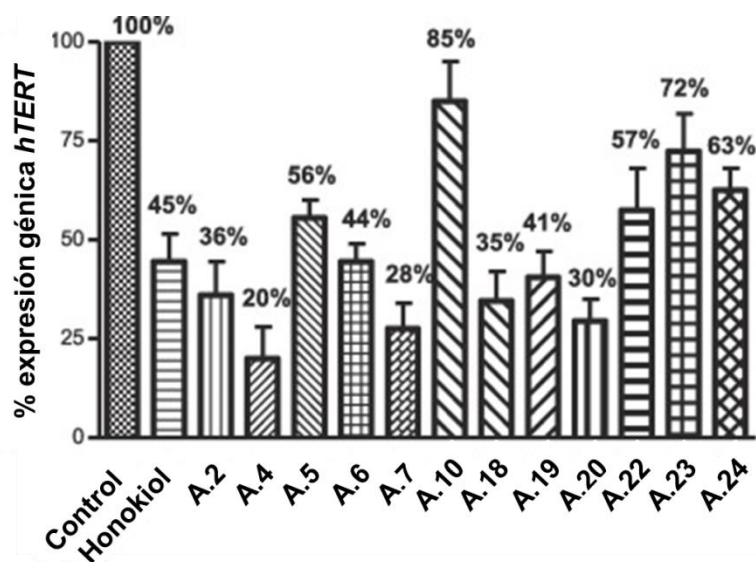


Figura 4.21. Expresión del gen *hTERT*, en porcentaje, tras 48 horas de incubación. Se llevaron a cabo, al menos, tres medidas en cada caso y las barras de error indican errores estándar de la media. El análisis estadístico se evaluó usando *oneway* ANOVA con Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett ($P < 0,001$).

La Figura 4.22 muestra los resultados obtenidos para la expresión del gen *c-Myc*. Seis de los doce derivados presentaron una capacidad para disminuir la expresión génica de *c-Myc* de manera considerable (<40% del valor del control, presentando el honokiol un valor del 45%). Los compuestos más activos fueron **A.2** y **A.10**, que reducían la expresión un 17% y 18%, respectivamente.

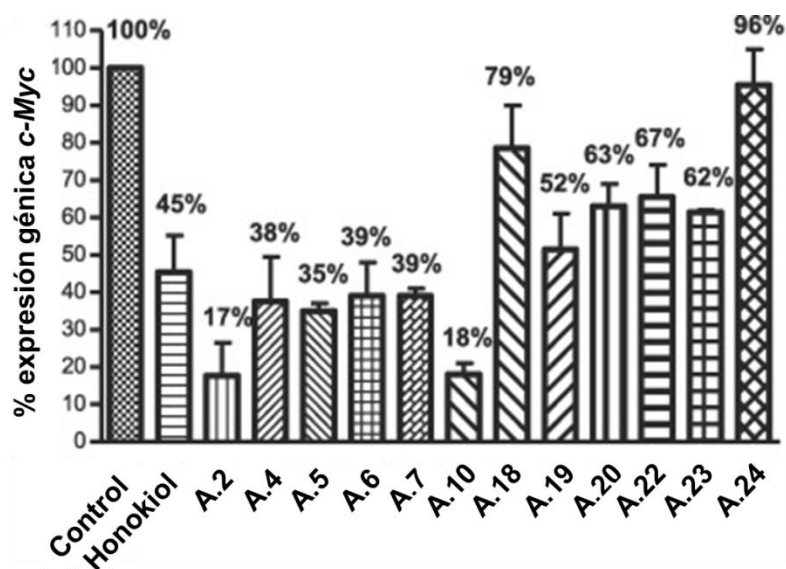


Figura 4.22. Expresión del gen *c-Myc*, en porcentaje, tras 48 horas de incubación. Se llevaron a cabo, al menos, tres medidas en cada caso y las barras de error indican errores estándar de la media. El análisis estadístico se evaluó usando *oneway* ANOVA con Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett ($P < 0,001$).

La Figura 4.23 muestra los resultados obtenidos para la expresión del gen *VEGF*. Seis de los doce derivados estudiados mostraron capacidad para disminuir la expresión del gen *VEGFA* a niveles un 36% más bajos que el valor del honokiol. El compuesto más activo fue el **A.4**, que inhibía la expresión génica al 8%, a una concentración similar al honokiol. Por su parte, el compuesto **A.20** también fue capaz de reducir la expresión del gen *VEGF* al 44% respecto al control, a una concentración inferior a la del honokiol, de 10 μM .

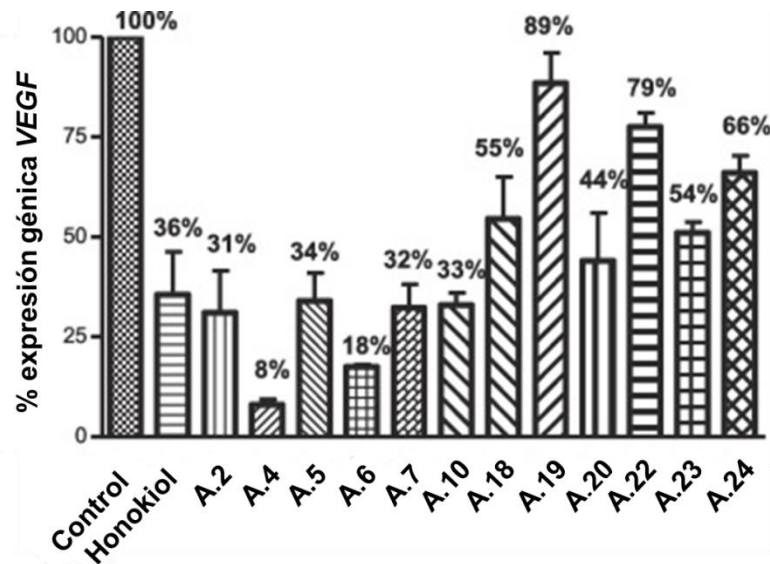


Figura 4.23. Expresión del gen *VEGFA*, en porcentaje, tras 48 horas de incubación. Se llevaron a cabo, al menos, tres medidas en cada caso y las barras de error indican errores estándar de la media. El análisis estadístico se evaluó usando *oneway* ANOVA con Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett ($P < 0,001$).

4.9.3. Efecto de los compuestos seleccionados en la inhibición de la producción de proteína c-Myc por la técnica ELISA

Debido a que fueron varios los compuestos capaces de reducir considerablemente la expresión del gen *c-Myc*, se quiso determinar, mediante el ensayo ELISA, si la expresión de la proteína c-Myc también se veía reducida por acción de estos derivados.²³⁵ La Figura 4.24 muestra el porcentaje de proteína c-Myc total presente en las células tumorales tras 48 horas de incubación, en presencia de los compuestos seleccionados, a las concentraciones que se muestran en la Tabla 7, mientras que los valores observados cuando las células fueron tratadas con DMSO se usaron como control.

²³⁵ Albiñ, A.; Johnsen, J. I.; Henriksson, M. A. *Adv Cancer Res.* **2010**, *107*, 163-224.

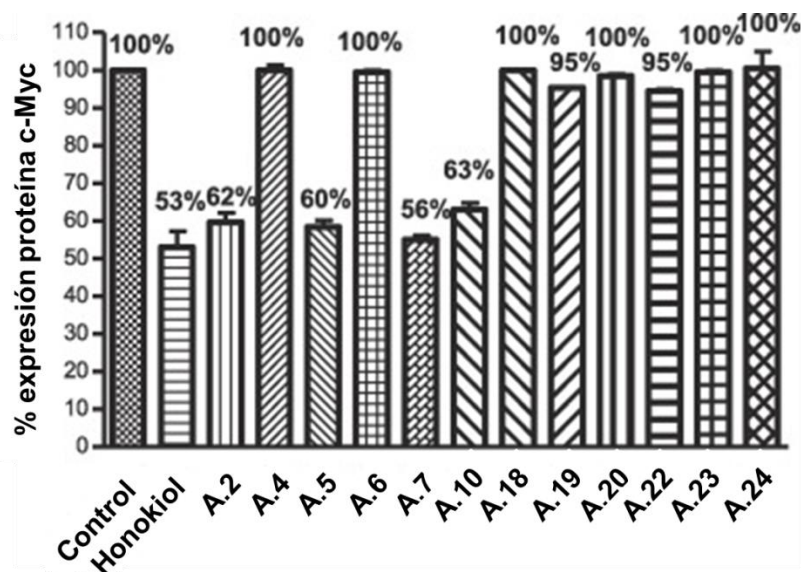


Figura 4.24. Expresión de la proteína c-Myc, en porcentaje, tras 48 horas de incubación. Se llevaron a cabo, al menos, tres medidas en cada caso y las barras de error indican errores estándar de la media. El análisis estadístico se evaluó usando *oneway* ANOVA con Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett ($P < 0,001$).

La mayoría de los derivados estudiados mostraron una cierta capacidad para disminuir la producción de proteína c-Myc.²³⁶ Así, el honokiol y los compuestos **A.2**, **A.5**, **A.7** y **A.10** fueron capaces de inhibir la expresión de la proteína c-Myc en un grado similar (alrededor del 60%). La mayor actividad se observó para el compuesto **A.7**, que fue capaz de disminuir la producción de c-Myc al 56% del valor del control, consiguiendo un efecto similar al obtenido para el honokiol (53%).

4.9.4. Efecto de los compuestos seleccionados en la inhibición de la producción de proteína VEGFA mediante la técnica ELISA

La actividad de los derivados estudiados sobre la secreción de la proteína VEGFA se realizó en la línea celular tumoral HT-29. Los doce compuestos seleccionados se emplearon en concentraciones cercanas a sus respectivos valores de IC_{50} para la línea HT-29 (véase la Tabla 7) y la cantidad de proteína VEGFA se determinó mediante el método ELISA. La Figura 4.25 muestra el porcentaje de VEGFA secretado al medio de cultivo tras 72 horas de incubación en presencia de los compuestos seleccionados, a las

²³⁶ (a) Para estudios previos en el grupo de investigación, ver: Martí-Centelles, R.; Cejudo-Marín, R.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3010-3015. (b) Martí-Centelles, R.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 488-496. (c) Martí-Centelles, R.; Murga, J.; Falomir, E.; Carda, M.; Marco, J. A. *Med. Chem. Comm.* **2015**, *6*, 1809-1815.

concentraciones correspondientes. Los valores observados cuando las células fueron tratadas con DMSO se emplearon como control.

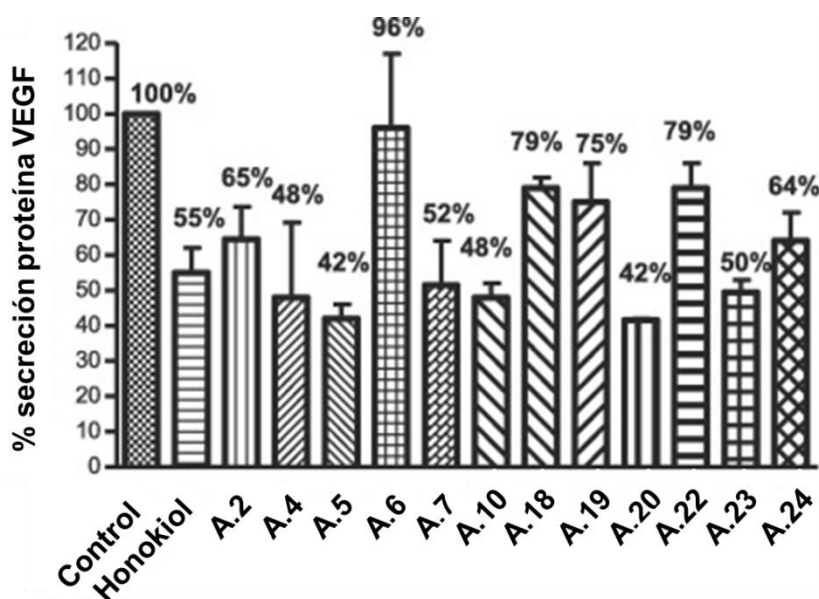


Figura 4.25. Expresión de la proteína VEGFA, en porcentaje, tras 72 horas de incubación. Se llevaron a cabo, al menos, tres medidas en cada caso y las barras de error indican errores estándar de la media. El análisis estadístico se evaluó usando *oneway* ANOVA con Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett ($P < 0,001$).

La mayoría de los derivados estudiados mostraron una capacidad para reducir la secreción de la proteína VEGFA;²³⁶ Los compuestos **A.4**, **A.5**, **A.7**, **A.10**, **A.20** y **A.23** demostraron ser más activos que el honokiol, destacando especialmente el compuesto **A.20**, que fue capaz de reducir la secreción de proteína VEGFA al 42% del valor del control. Esta actividad es mucho más potente que la observada para el honokiol (55%), sobre todo si se tiene en cuenta que la concentración del compuesto **A.20** (10 μM) es menor que la del honokiol (20 μM).

4.9.5. Conclusiones

Veinticuatro derivados relacionados estructuralmente con el honokiol fueron evaluados biológicamente. En primer lugar, se determinaron sus valores de IC_{50} para las líneas celulares HT-29, MCF-7 y HEK-293. Algunos de estos derivados mostraron resultados comparables de IC_{50} respecto al producto natural de referencia, el honokiol. Doce derivados (los compuestos **A.2**, **A.4**, **A.5**, **A.6**, **A.7**, **A.10**, **A.18**, **A.19**, **A.20**, **A.22**, **A.23** y **A.24**) fueron posteriormente seleccionados para una evaluación biológica adicional,

basándose esta elección en que los compuestos mostraron valores de IC_{50} bajos frente a las líneas tumorales, o bien una buena selectividad, afectando en menor grado a la línea no tumoral HEK-293. Estos derivados sintéticos fueron evaluados por su capacidad para inhibir la expresión génica de *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc*, así como reducir la producción de proteína c-Myc total y la proteína VEGFA.

La Figura 4.26 A muestra la correlación entre el porcentaje de producción de proteína c-Myc total frente al porcentaje de expresión del gen *c-Myc*. Honokiol es el único compuesto que muestra una buena correlación entre ambos valores, sin encontrarse una correlación tan buena para el resto de compuestos. Este resultado podría sugerir que estos derivados sintéticos disminuyen la producción de proteína c-Myc a través de un proceso distinto al de la transcripción de genes.²³⁷

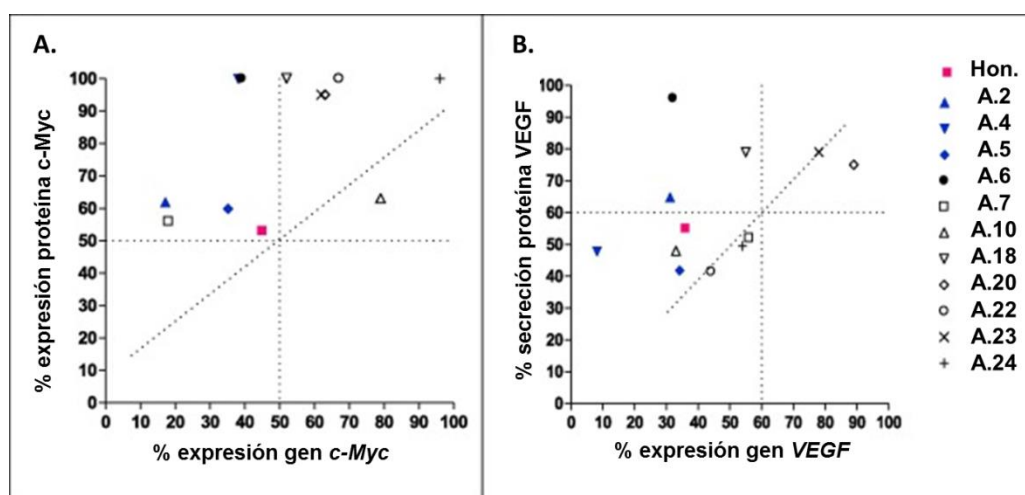


Figura 4.26. A. Producción de proteína c-Myc total frente expresión del gen *c-Myc*; B. Secreción de proteína VEGFA frente a la expresión génica de *VEGFA*.

La Figura 4.26 B muestra la correlación entre el porcentaje de secreción de la proteína VEGF con el porcentaje de expresión del gen *VEGF*. En este caso sí que hay una correlación bastante buena entre el porcentaje de proteína VEGF secretada al medio con el grado de expresión génica para las células tratadas con honokiol y con los compuestos **A.5**, **A.7**, **A.10**, **A.20**, **A.22**, **A.23** y **A.24**. Sin embargo, los compuestos **A.2**, **A.4**, **A.6** y **A.18** no

²³⁷ (a) Nakamura, M.; Abe, Y.; Tokunaga, T. *Pathol. Int.* **2002**, *52*, 331-339. (b) Ellrichmann, M.; Ritter, P. R.; Schrader, H.; Schmidt, W. E.; Meier, J. J.; Schmitz, F. *Regul. Pept.* **2010**, *165*, 146-150.

presentan un grado de correlación aceptable, por lo que se podría concluir que honokiol y los siete derivados mencionados anteriormente son capaces de disminuir la secreción de la proteína VEGFA a nivel transcripcional.

En la Figura 4.27 A se puede observar la correlación entre el porcentaje de secreción de la proteína VEGF y la expresión del gen *hTERT*. Se puede apreciar que no hay una buena correlación entre la expresión génica de *hTERT* y la secreción de VEGF, excepto para las células tratadas con honokiol y los compuestos **A.20** y **A.24**.

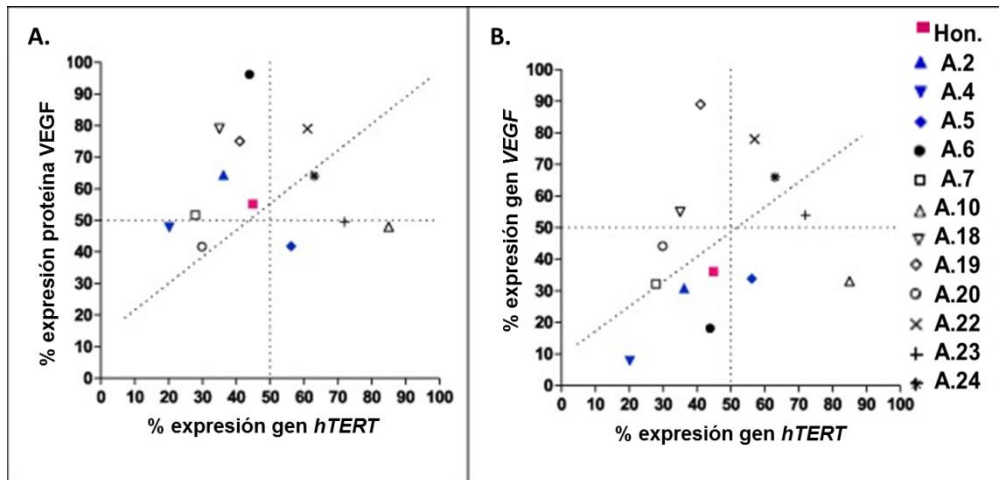


Figura 4.27. A. Secreción de la proteína VEGF frente a la expresión del gen *hTERT*; B. Expresión génica de VEGF frente a la expresión del gen *hTERT*.

Por su parte, la Figura 4.27 B muestra la correlación entre el porcentaje de expresión génica de *VEGF* y la expresión del gen *hTERT*. En este caso, el grado de expresión de estos dos genes se correlaciona bien para las células tratadas con honokiol y con los compuestos **A.2**, **A.7**, **A.23** y **A.24**.

La Figura 4.28 A correlaciona el porcentaje de secreción de la proteína c-Myc con el porcentaje de expresión del gen *hTERT*; en general, no existe una buena correlación, a excepción de las células tratadas con honokiol, con el compuesto **A.5** y, en menor medida, con los compuestos **A.2** y **A.7**.

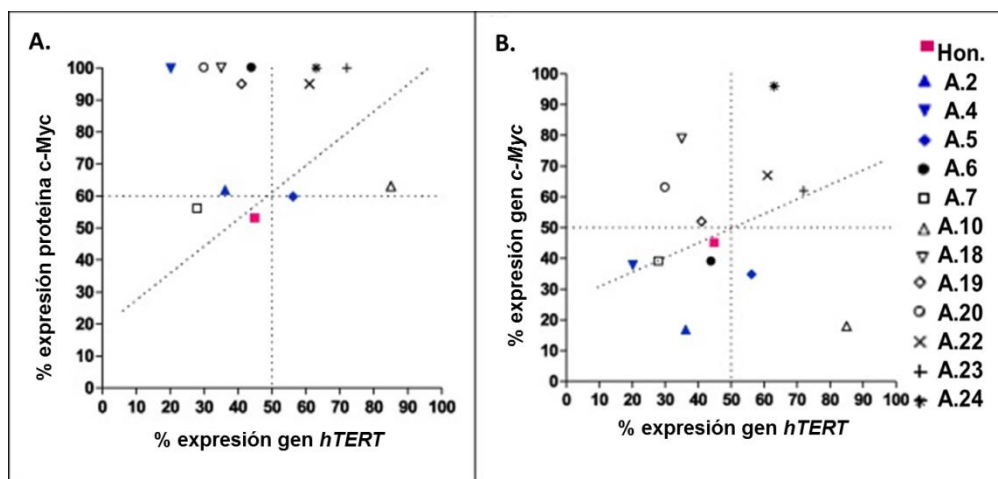


Figura 4.28. A. Secreción de la proteína c-Myc frente a la expresión del gen *hTERT*; B. Expresión del gen *c-Myc* frente a la expresión génica de *hTERT*.

La Figura 4.28 B muestra la correlación entre el porcentaje de expresión del gen *c-Myc* y la expresión del gen *hTERT*. En este caso, existe una buena correlación únicamente para el honokiol y los derivados **A.4**, **A.6**, **A.7**, **A.19** y **A.23**.

La Tabla 8 y la Figura 4.29 muestran un resumen de los resultados obtenidos para los compuestos que mostraron la mayor actividad en la inhibición simultánea de, al menos, dos de las cinco actividades biológicas estudiadas. Los resultados de la Tabla 8 sugieren que el compuesto **A.7** puede ser un buen candidato para realizar más estudios como compuesto anticanceroso, ya que es capaz de mejorar el efecto del honokiol, causando una marcada reducción de todas las expresiones génicas y la producción de proteínas, a una concentración segura para las células no tumorales.

Tabla 8. Compuestos que presentan mayor actividad en reducir simultáneamente la expresión de los genes *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc* y la producción de proteína VEGF y c-Myc.

Comp.	Honokiol	A.2	A.4	A.7	A.10	A.20
IC ₅₀ HT-29	25 µM	197 µM	56 µM	59 µM	30 µM	26 µM
Expresión gen <i>VEGF</i>	36%	31%	8%	32%	33%	44%
Expresión gen <i>hTERT</i>	45%	36%	20%	28%	85%	30%
Expresión gen <i>c-Myc</i>	45%	17%	38%	39%	18%	63%
c-Myc producido	53%	62%	100%	56%	63%	100%
VEGFA secretado	55%	65%	48%	52%	48%	42%

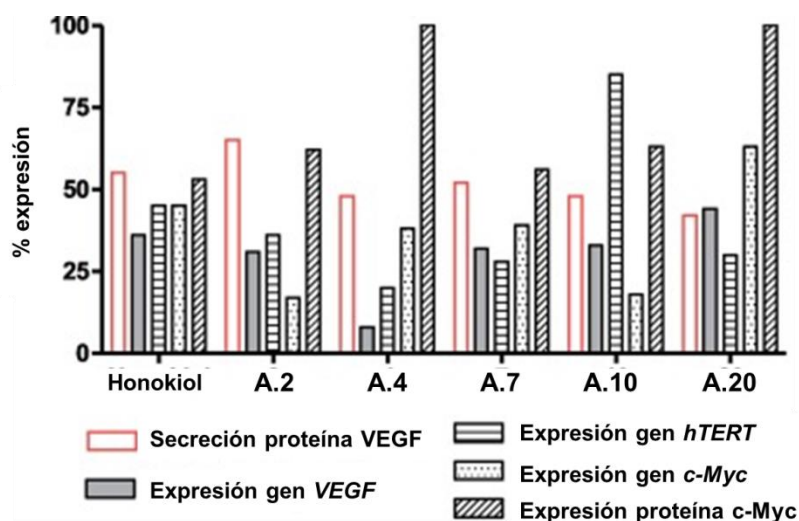


Figura 4.29. Actividades del compuesto honokiol y los derivados **A.2**, **A.4**, **A.7**, **A.10** y **A.20** en la expresión génica de *VEGF*, *hTERT* y *c-Myc* y sobre la producción de proteína VEGF y c-Myc.

4.10. Evaluación biológica de la Familia 3

Veintiuna ureas se evaluaron biológicamente como inhibidores multidiana de las proteínas VEGFR-2 y PD-L1, con el fin de superar los fenómenos de resistencia presentes en el cáncer. Se determinó la actividad antiproliferativa de estas moléculas en diferentes líneas tumorales: HT-29 (adenocarcinoma de colon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), HeLa (carcinoma de cuello de útero) y A549 (adenocarcinoma de pulmón), así como en las líneas HMEC-1 (células endoteliales microvasculares humanas) y HEK-293 (células embrionarias de riñón humanas). Algunos de los derivados se estudiaron por

sus propiedades antiangiogénicas, como su capacidad de inhibir la formación de microvasos empleando HMEC-1, o su efecto sobre VEGFR-2, tanto en las líneas celulares tumorales, como en las endoteliales. Finalmente, la acción inmunomoduladora de los compuestos seleccionados se estudió sobre las proteínas PD-L1 y c-Myc.

4.10.1. Estudios de acoplamiento molecular (*docking*)

Mediante estudios de acoplamiento molecular, o *docking*, en las proteínas VEGFR-2 y PD-L1, se diseñaron algunos compuestos como potenciales inhibidores multidiana,²³⁸ basándose en las estructuras de sorafenib, inhibidor de VEGFR-2, y de BMS-202, inhibidor de PD-L1.

En la unión del sorafenib al dominio quinasa de VEGFR-2, la urea tiene un papel fundamental, al establecer enlaces de hidrógeno con los residuos de glutamato y aspartato en el bolsillo de unión de la quinasa.²³⁹ Por su parte, moléculas como el compuesto BMS-202, desarrollado por Bristol-Myers, inhiben la interacción entre PD-1 y PD-L1 al unirse al surco hidrofóbico de PD-L1, formado por los aminoácidos Tyr56, Met115, Ile116, Ala121 y Tyr123, alterando así la dimerización de la proteína PD-L1. Este modo de interacción logra la inhibición a través de una doble vía: por un lado, al estar el inhibidor ocupando la región de interacción PD-1/PD-L1, se bloquea esta conexión; por otro lado, se produce la modificación del dímero de PD-L1, en el que una de las proteínas tiene la configuración opuesta a la requerida para unirse a PD-1, por lo que la interacción entre PD-1 y PD-L1 queda deshabilitada.²⁴⁰

Tanto el sitio de unión en VEGFR-2 como en PD-L1 poseen un surco hidrofóbico en el cual pueden encajar anillos aromáticos. Para el diseño de compuestos capaces de interaccionar con ambos sitios de unión, se llevaron a cabo estudios de *docking*, empleando Autodock 4.2,²⁴¹ en el dominio quinasa de VEGFR-2 y en el sitio de unión de PD-L1, para encontrar así estructuras relativamente sencillas capaces de interaccionar con ambos. Se encontraron varias estructuras generales capaces de imitar los enlaces de hidrógeno observados para sorafenib; estas estructuras se caracterizaban por

²³⁸ Conesa-Milián, L.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J.A. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *148*, 87-98.

²³⁹ Roskoski, R., Jr. *Pharmacol. Res.* **2019**, *144*, 19-50.

²⁴⁰ Zak, K.M.; Grudnik, P.; Guzik, K.; Zieba, B.J.; Musielak, B.; Domling, A.; Dubin, G.; Holak, T.A. *Oncotarget* **2016**, *7*, 30323-30335.

²⁴¹ Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785-2791.

presentar motivos tipo urea, carbamato o de guanidinio, que son esenciales para permitir la interacción con el dominio quinasa, a los que se unen anillos aromáticos para interactuar con los surcos hidrofóbicos de ambas proteínas.

En la Figura 4.30 A se puede apreciar que los compuestos I y II ocupan el sitio de unión en el dominio quinasa de VEGFR-2 en un modo muy similar a como lo hace sorafenib. Estos compuestos establecen enlaces de hidrógeno entre el grupo OMe y Cys919, entre los dos NH del sistema urea y Glu885 y entre el C=O de la urea y el NH del Asp1046. Todos los anillos aromáticos interactúan con dos zonas hidrofóbicas presentes en el sitio de unión.

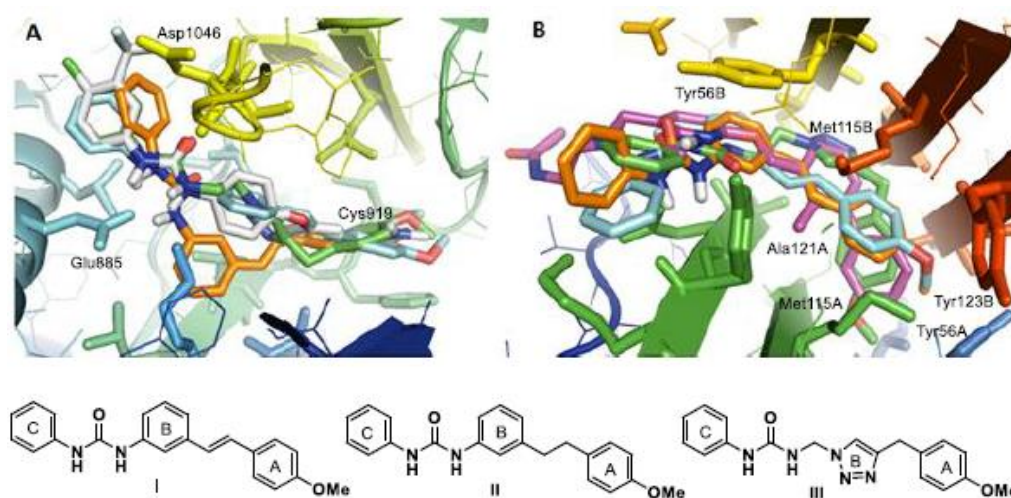


Figura 4.30. A. Superposición de los compuestos I (naranja), II (azul claro), III (verde) y sorafenib (gris) en el dominio quinasa de VEGFR-2. B. Superposición de los compuestos I (naranja), II (azul claro), III (verde) y BMS-202 (violeta) en el sitio de unión de PD-L1.

En la Figura 4.30 B se puede observar que las estructuras I y II también ocupan el sitio de unión del compuesto BMS-202 en la proteína PD-L1. Los anillos aromáticos A encajan en un surco hidrofóbico estableciendo interacciones con Tyr56, Met115 de la cadena A y Tyr123 de la cadena B del dímero PD-L1. Los anillos aromáticos B establecen interacciones hidrofóbicas con Met115 de la cadena B y Ala121 de la cadena A, mientras que los anillos aromáticos C establecen interacciones de apilamiento tipo π con Tyr56 de la cadena B. El sistema de urea más polar apunta hacia la zona exterior del surco.

4.10.2. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

La capacidad de las ureas **U.1-U.21** de inhibir la proliferación celular se estableció a través de las medias de sus valores de IC_{50} frente a las líneas celulares tumorales HT-29, MCF-7, HeLa y A549, así como frente a la línea celular endotelial HMEC-1 y la línea celular no tumoral HEK-293. Los valores de IC_{50} para las ureas **U.1-U.21** se muestran en la Tabla 9, junto con los valores de IC_{50} de los compuestos de referencia sorafenib y BMS-8.

Tabla 9. Valores de IC_{50} (μ M) para sorafenib, BMS-8 y los derivados **U.1-U.21**.

Comp.	HT-29	MCF-7	HeLa	A549	HMEC-1	HEK-293
Sorafenib	17 \pm 4	14 \pm 4	6.1 \pm 0.4	27 \pm 2	34 \pm 3	5.0 \pm 0.7
BMS-8	19 \pm 2	20 \pm 3	>100	6 \pm 1	-	60 \pm 10
U.1	24 \pm 5	30 \pm 7	32 \pm 8	34 \pm 2	40 \pm 5	16 \pm 3
U.2	17 \pm 2	25 \pm 10	26 \pm 3	32 \pm 14	14 \pm 2	25 \pm 3
U.3	25 \pm 2	28 \pm 5	30 \pm 7	38 \pm 6	24 \pm 4	23 \pm 2
U.4	17 \pm 1	24 \pm 7	12 \pm 4	12 \pm 2	27 \pm 8	10 \pm 2
U.5	15 \pm 1	15 \pm 1	15 \pm 2	18 \pm 1	10 \pm 1	27 \pm 5
U.6	17 \pm 4	19 \pm 2	24 \pm 5	23 \pm 8	4.3 \pm 0.3	16 \pm 3
U.7	14 \pm 3	8 \pm 3	5 \pm 2	12 \pm 2	11 \pm 1	10 \pm 1
U.8	2.5 \pm 0.8	2.3 \pm 0.9	42 \pm 8	1.6 \pm 0.3	4 \pm 1	15 \pm 2
U.9	1.6 \pm 0.2	1.6 \pm 0.3	1.7 \pm 0.4	3 \pm 1	1.9 \pm 0.4	2.0 \pm 0.2
U.10	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	4 \pm 3	1.1 \pm 0.2	0.7 \pm 0.3
U.11	0.4 \pm 0.3	0.3 \pm 0.2	3.1 \pm 0.1	3 \pm 0.4	1.8 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3
U.12	11 \pm 4	3.6 \pm 0.6	9 \pm 4	11 \pm 5	7.2 \pm 0.6	3.5 \pm 0.8
U.13	1.3 \pm 0.5	1.1 \pm 0.2	7.0 \pm 0.5	2.2 \pm 0.7	4.3 \pm 0.4	4 \pm 2
U.14	0.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.3	4 \pm 1	13 \pm 3	1.9 \pm 0.6	1.4 \pm 0.6
U.15	9.6 \pm 0.6	12.8 \pm 0.9	10 \pm 2	12 \pm 5	9 \pm 4	12.5 \pm 0.2
U.16	7.9 \pm 0.5	5 \pm 4	4 \pm 3	7 \pm 4	5 \pm 3	1.7 \pm 0.2
U.17	11 \pm 2	10 \pm 4	10.7 \pm 0.5	13 \pm 3	3.8 \pm 0.3	7.2 \pm 0.4
U.18	4.9 \pm 0.8	4 \pm 2	3.7 \pm 0.3	11 \pm 5	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.5
U.19	57 \pm 6	10 \pm 5	24 \pm 2	24 \pm 5	>100	13.8 \pm 0.8
U.20	22 \pm 2	25 \pm 4	27 \pm 1	18 \pm 3	7.1 \pm 0.8	9.7 \pm 0.8
U.21	4.4 \pm 0.8	1.5 \pm 0.6	1.4 \pm 0.5	8 \pm 3	0.9 \pm 0.03	0.9 \pm 0.07

*Los datos son el promedio (\pm SD) de tres experimentos.

Las ureas sintéticas mostraron actividad antiproliferativa en el rango micromolar en todas las líneas celulares empleadas, comparable a la que muestran los compuestos de referencia sorafenib y BMS-8. Las (*E*)-estiril aril

ureas son más activas que los derivados *Z* o que los saturados, con valores de IC_{50} a nivel submicromolar. Los derivados más activos son el **U.10** (*m*-bromofenil urea), **U.11** (*p*-bromofenil urea) y **U.14** (*p*-metoxifenil urea).

Este estudio demuestra que existe una correlación entre la estructura y conformación de los derivados con los valores de IC_{50} obtenidos; así, las (*E*)-estiril aril ureas muestran los valores de IC_{50} más bajos, seguidas por las fenetil aril ureas y, finalmente, las (*Z*)-estiril aril ureas. Parece que en este proceso en particular (la inhibición de la proliferación celular), la estructura plegada de los derivados *Z* podría ser perjudicial para la actividad, en comparación con la conformación lineal adoptada por los derivados *E* y la mayor libertad conformacional de los derivados fenéticos. Por otro lado, también es posible observar cierta correlación entre los valores de IC_{50} y la posición del sustituyente en la unidad de aril urea; por ejemplo, las (*E*)-estiril bromofenil ureas **U.9-U.11**, en las que la sustitución en posición para aumenta la inhibición de la proliferación celular con respecto a la sustitución en las posiciones orto o meta.

4.10.3. Efecto sobre VEGFR-2 celular en HT-29 y HMEC-1 mediante citometría de flujo

Con el fin de evaluar las propiedades antiangiogénicas de estos compuestos, se estudió su efecto sobre VEGFR-2, una de las dianas seleccionadas para el diseño de estos derivados.

El estudio se realizó tanto en la línea celular tumoral HT-29, como en la línea celular endotelial HMEC-1. Se llevó a cabo una selección de ocho derivados, basada en sus valores de IC_{50} en HT-29 y en su estructura, para poder establecer relaciones estructura-actividad. Los compuestos seleccionados fueron las (*Z*)-estiril ureas **U.4**, **U.5** y **U.7**, las (*E*)-estiril ureas **U.11**, **U.13** y **U.14** y las fenetil ureas **U.20** y **U.21**. El efecto de los derivados seleccionados sobre VEGFR-2, en las líneas HT-29 y HMEC-1, se determinó mediante la técnica de citometría de flujo. Para el estudio del VEGFR-2, tanto de membrana como total, se emplearon células tratadas con DMSO como control negativo y células tratadas con sorafenib como control positivo. Para estos ensayos, las células se incubaron durante 24 horas con los compuestos correspondientes, a una concentración de 10 μ M; la Tabla 10 muestra los efectos conseguidos por los compuestos seleccionados sobre el VEGFR-2 de membrana y total, en ambas líneas celulares y con DMSO como control.

Tabla 10. Efecto en la expresión de VEGFR-2 en las líneas celulares HT-29 y HMEC.

COMPUESTO	HT-29		HMEC	
	VEGFR-2 membrana (%)	VEGFR-2 total (%)	VEGFR-2 membrana (%)	VEGFR-2 total (%)
Sorafenib	92 ± 3	85 ± 5	46 ± 8	64 ± 4
U.4	39 ± 9	55 ± 10	45 ± 8	59 ± 5
U.5	47 ± 16	98 ± 12	99 ± 7	97 ± 9
U.7	88 ± 14	97 ± 7	98 ± 8	99 ± 16
U.11	36 ± 9	39 ± 8	39 ± 5	74 ± 8
U.13	99 ± 11	94 ± 7	59 ± 8	96 ± 9
U.14	68 ± 9	95 ± 9	65 ± 9	83 ± 7
U.20	76 ± 5	93 ± 10	69 ± 8	98 ± 13
U.21	68 ± 13	100 ± 10	66 ± 5	93 ± 8

*Los datos son el promedio (\pm SD) de tres experimentos.

Todos los derivados fueron más efectivos en la inhibición del VEGFR-2 de membrana que el total, tanto en HT-29 como en HMEC-1. Los compuestos más activos fueron **U.4** y **U.11**, mostrando una inhibición superior al 50% tanto del VEGFR-2 de membrana como el total, y mejorando incluso el efecto del compuesto de referencia sorafenib.

4.10.4. Efecto en la formación de microtubos en células endoteliales

Se evaluó la capacidad para inhibir la formación de nuevas redes vasculares formadas por HMEC-1 de los compuestos **U.4**, **U.11** y **U.21**, seleccionados por mostrar la mayor actividad inhibitoria de VEGFR-2. La Tabla 11 muestra la mínima concentración a la que estos compuestos son activos y comienzan a inhibir la formación de microtubos.

Tabla 11. Efecto inhibitorio de la formación de tubos.

COMPUESTO	Conc. Mínima activa (μ M)
Sunitinib	3
Sorafenib	10
U.4	10
U.11	1
U.21	6

*Los datos son el promedio (\pm SD) de tres experimentos.

En la Figura 4.31 se observa la inhibición de la neovascularización llevada a cabo por el compuesto **U.11**, a diferentes concentraciones.

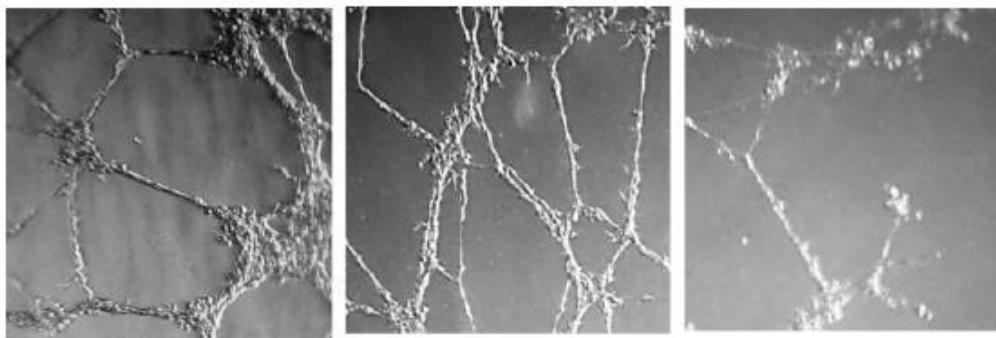


Figura 4.31. Efecto del compuesto **U.11** a las concentraciones de 0.25, 0.5 y 1 μM (de izquierda a derecha).

Si se comparan los valores de concentración mínima de actividad, con los valores de IC_{50} para la línea HMEC-1 (ver Tabla 9), se puede observar que existe una correlación entre la actividad antiproliferativa y la capacidad para inhibir la formación de tubos, ya que los compuestos con valores de IC_{50} más bajos son capaces de inhibir la formación de microtubos a concentraciones más bajas. Además, se observa que dos de los compuestos seleccionados, **U.11** y **U.21**, son más activos que los compuestos de referencia sorafenib y sunitinib en este ensayo en particular.

4.10.5. Efecto sobre las proteínas PD-L1 y c-Myc mediante citometría de flujo

Con el fin de evaluar las propiedades inmunomoduladoras de los compuestos, se estudió su efecto sobre PD-L1 y c-Myc, un factor de transcripción que regula la producción de PD-L1.

El estudio se llevó a cabo en dos líneas celulares tumorales, HT-29 y A549, y en él se incluyeron los mismos compuestos seleccionados para estudiar su efecto sobre VEGFR-2: **U.4**, **U.5** y **U.7**, las (*E*)-estiril ureas **U.11**, **U.13** y **U.14** y las fenetil ureas **U.20** y **U.21**. Se evaluó el efecto de los compuestos seleccionados sobre las proteínas PD-L1 y c-Myc mediante la técnica de citometría de flujo, tras 24 horas de incubación con los compuestos seleccionados, a una concentración de 10 μM . Como control negativo se emplearon células tratadas únicamente con DMSO, mientras que las células tratadas con BMS-8 se emplearon como control positivo. La Tabla 12 muestra

el porcentaje de proteínas totales detectadas para cada compuesto, respecto al control (DMSO) sobre ambas líneas celulares.

Tabla 12. Expresión de las proteínas PD-L1 y c-Myc en las líneas celulares HT-29 y A549.

COMPUESTO	HT-29		A549	
	PD-L1 (%)	c-Myc (%)	PD-L1 (%)	c-Myc (%)
BMS-8	62 ± 3	99 ± 4	68 ± 5	60 ± 7
U.4	17 ± 5	41 ± 10	23 ± 8	29 ± 5
U.5	60 ± 12	58 ± 13	79 ± 9	45 ± 9
U.7	36 ± 9	47 ± 8	98 ± 10	79 ± 10
U.11	18 ± 5	49 ± 8	16 ± 6	34 ± 4
U.13	69 ± 11	74 ± 11	59 ± 8	68 ± 9
U.14	33 ± 10	57 ± 9	50 ± 3	63 ± 7
U.20	55 ± 11	69 ± 7	59 ± 9	77 ± 15
U.21	38 ± 13	70 ± 10	42 ± 11	83 ± 12

En base a los resultados reflejados en la Tabla 12, se puede deducir que los compuestos **U.4**, **U.11** y **U.21** son los más activos inhibiendo PD-L1 en ambas líneas cancerosas, mostrando un efecto más potente que el compuesto de referencia BMS-8. Por otro lado, de nuevo los compuestos **U.4** y **U.11** son los más activos inhibiendo tanto la proteína PD-L1 como la proteína c-Myc.

4.10.6. Evaluación de la proliferación celular en co-cultivos

Se estudió el efecto de los compuestos **U.4**, **U.11**, **U.14** y **U.21** sobre la proliferación de células tumorales, en presencia de células T Jurkat que expresan PD-1. Para este ensayo, las células HT-29 estimuladas con interferón y se trataron durante 24 horas con los compuestos seleccionados a una concentración de 10 μ M, en presencia de células T Jurkat. Posteriormente, las células vivas se contaron empleando azul de tripano y la cámara Neubauer, así como la técnica de citometría de flujo. La Figura 4.32 muestra la inhibición de la proliferación celular tumoral producida por los compuestos seleccionados, debido a la presencia de las células T Jurkat.

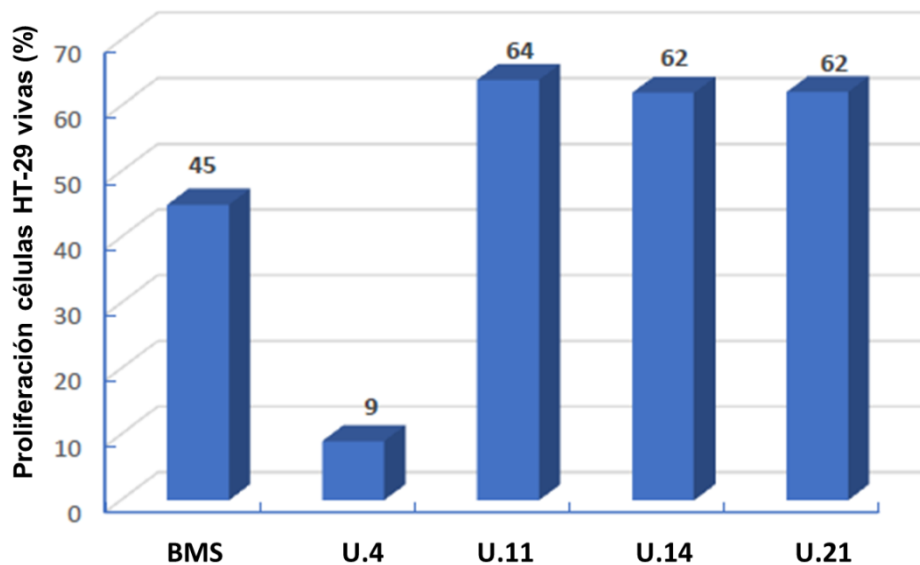


Figura 4.32. Porcentaje de la proliferación de las células HT-29 en presencia de las células T Jurkat. Los datos se obtuvieron de cinco experimentos.

Los datos recogidos en la Figura 4.32 muestran que el compuesto **U.4** es el que presenta mayor actividad, exhibiendo una inhibición de la proliferación de HT-29 del 90% aproximadamente cuando se cultiva junto con las células T Jurkat, mejorando incluso el efecto ejercido por BMS-8. Este fue un resultado no esperado, ya que tanto el compuesto **U.4** como el **U.11** mostraron actividades similares frente a las dianas estudiadas anteriormente (PD-L1, c-Myc y VEGFR-2); de hecho, la actividad antiproliferativa del derivado **U.4** en monocultivo de HT-29 fue diez veces menor que la del compuesto **U.11**, por lo que dicha actividad del compuesto **U.4** aumentó considerablemente en cocultivo con células T Jurkat.

Se determinó también la proliferación de células T Jurkat en estos cocultivos a partir de los medios correspondientes, mediante citometría de flujo. La Figura 4.33 muestra la distribución poblacional de células T por tamaño (FSC-H, eje X) y granularidad (SCC-H, eje Y). Todas las muestras presentaron una distribución poblacional similar, excepto aquellas tratadas con el compuesto **U.4**, en las que se observa un aumento del tamaño y la complejidad.

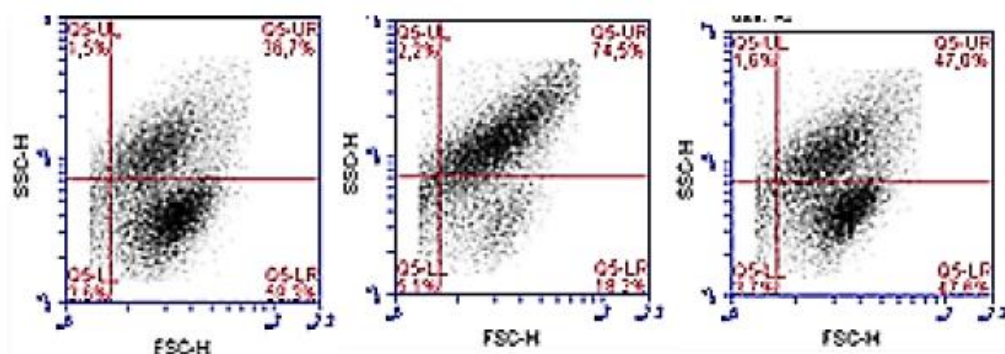


Figura 4.33. Distribución de la población de células T Jurkat (%) co-cultivadas con células HT-29 en presencia de DMSO, compuesto **U.4** y BMS-8 (de izquierda a derecha). Datos obtenidos de cinco experimentos.

La Figura 4.34 muestra los resultados de densidad celular de células T Jurkat vivas, tratadas en co-cultivos con HT-29. Los gráficos incluyen la distribución poblacional de células por tamaño y complejidad en cada caso.

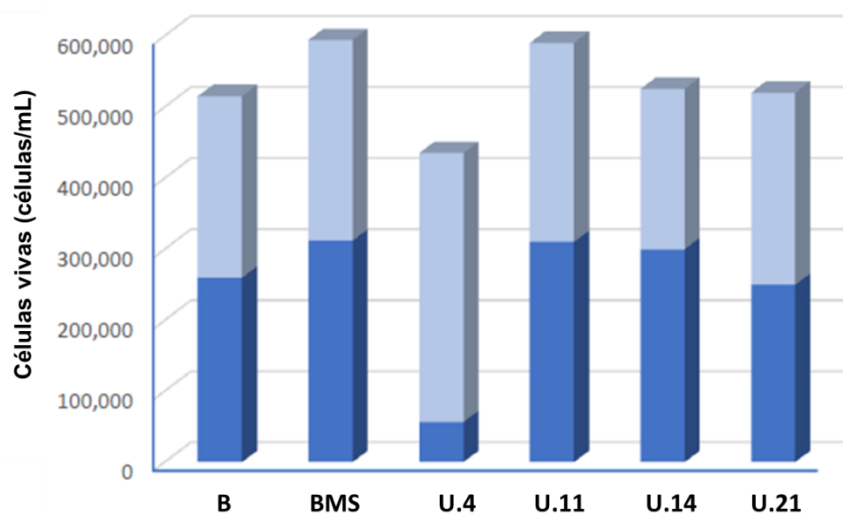


Figura 4.34. Porcentaje de proliferación de las células T Jurkat y la distribución poblacional (%), en co-cultivo con HT-29. Datos obtenidos de cinco experimentos.

Los datos proporcionados por las Figuras 4.33 y 4.34 muestran que ninguno de los derivados ejerció un efecto importante ni sobre la proliferación de células T Jurkat ni sobre la distribución poblacional de células T. El derivado **U.4** es, de nuevo, el único que se comporta de forma diferente al resto de compuestos evaluados; en este caso, este compuesto afecta en gran medida a la proliferación de células T y, además, potencia los cambios morfológicos de las mismas, provocando así un aumento de su tamaño y complejidad. Estos resultados inesperados y singulares del compuesto **U.4**

permiten concluir que su mecanismo de acción es distinto al del resto de compuestos evaluados, y parece apuntar a un aumento de la activación de las células T contra las células tumorales.

4.10.7. Conclusiones

Se llevó a cabo la evaluación biológica de veintiuna ureas como potenciales agentes antitumorales multidiana. La actividad antiproliferativa de los derivados **U.1-U.21**, así como de los compuestos de referencia sorafenib y BMS-8, se determinó en las líneas celulares cancerosas HT-29, MCF-7, HeLa y A549 y en la línea celular endotelial HMEC-1 y la no tumoral HEK-293. Los derivados que presentaron mayor actividad fueron los de la conformación *E*, destacando los compuestos **U.10**, **U.11** y **U.14**, seguidos por los derivados saturados y, finalmente, aquellos con conformación *Z*. Estos resultados se pueden deber a la conformación lineal de los compuestos *E* y fenéticos, así como a la posición de los sustituyentes, ya que la sustitución en posición para aumenta la inhibición.

Las propiedades antiangiogénicas de los derivados seleccionados se estudiaron en las líneas celulares HT-29 y HMEC-1 a través de su efecto sobre el receptor VEGFR-2, tanto de membrana como total, mediante la técnica de citometría de flujo. Los compuestos que presentaron mayor actividad fueron **U.4** y **U.11**, presentando una inhibición superior al 50% del receptor. Por otro lado, la capacidad para inhibir la formación de nuevas redes vasculares formadas por HMEC-1 se evaluó en los compuestos seleccionados, entre los que destacaron los derivados **U.11** y **U.21**; este resultado parece indicar que existe una correlación entre la actividad antiproliferativa y la capacidad para inhibir la formación de tubos, ya que aquellos compuestos con un IC_{50} más bajo requieren menor concentración para bloquear la neovascularización.

Las actividades como agentes inmunomoduladores de los compuestos seleccionados se evaluaron a través de la capacidad para inhibir la expresión de las proteínas PD-L1 y c-Myc, en las líneas tumorales HT-29 y A549. Los derivados que presentaron mayor actividad reduciendo la expresión de la proteína PD-L1 fueron **U.4**, **U.11** y **U.21**, destacando especialmente los compuestos **U.4** y **U.11**, ya que fueron los más activos inhibiendo tanto la proteína PD-L1 como c-Myc. Finalmente, el efecto de los productos en la proliferación de células cancerosas, en presencia de células T Jurkat que

expresan PD-1, se evaluó tanto con la cámara Neubauer como por citometría de flujo. De nuevo, el compuesto **U.4** es el que presenta mayor actividad, pues afecta en gran medida a la proliferación de las células T y, además, favorece cambios morfológicos de las mismas; este resultado sugiere que actúa a través de un mecanismo distinto al resto de derivados evaluados, y que requeriría de estudios en profundidad para detallarlo.

4.11. Materiales y métodos

Reactivos y cultivo celular

Las líneas celulares se obtuvieron de la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC, American Type Culture Collection). Los medios de cultivo celular se adquirieron de Gibco (Grand Island, Nueva York). El suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) fue un producto adquirido de Harlan-Seralab (Belton, Reino Unido). Los suplementos y otros compuestos químicos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los materiales plásticos para el cultivo celular fueron suministrados por Thermo Scientific BioLite. Para el ensayo de la formación de tubos, se empleó una placa IBIDI para el proceso de angiogénesis (IBIDI, Martinsried, Alemania).

Todos los compuestos evaluados estaban disueltos en DMSO a una concentración de 10 µg/mL y almacenados a -20°C hasta su uso. Las líneas celulares empleadas se mantuvieron en el medio de cultivo basal DMEM, del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*, el cual contiene glucosa (1 g/L), glutamina (2 mM), penicilina (50 UI/mL), estreptomina (50 µg/mL) y anfotericina B (1.25 µg/mL), suplementado con FBS al 10%. La línea celular HMEC-1 se mantuvo en DMEM bajo en glucosa, el cual contiene glutamina (2 mM), penicilina (50 UI/mL), estreptomina (50 µg/mL) y anfotericina B (1.25 µg/mL), suplementado con FBS al 10%. Para llevar a cabo el ensayo de formación de tubos en Matrigel®, las células HMEC-1 se cultivaron en el medio EGM-2MV, suplementado con EGM-2MV SingleQuots.

Estudio de la interacción entre las triazolonas y PD-L1 mediante PTS

El ensayo de PTS se realizó siguiendo las instrucciones indicadas en el kit Protein Thermal Shift™ Dye (Applied Biosystems ref. 4461146). Se emplearon 2 µL de una solución acuosa de PD-L1 (ref. ab167713) a 0.1 mg/mL y 1.5 µL del producto correspondiente a 0.1 mg/mL. Las curvas de fusión se registraron empleando el sistema StepOne™ Real-Time PCR.

Ensayo de MTT

Un total de 5×10^3 células (HT-29, A-549, MCF-7 y HEK-293) o 3×10^3 (HeLa y HMEC-1), en un volumen total de 100 μL de sus respectivos medios de crecimiento, se incubaron con diluciones en serie de los compuestos a evaluar. Se emplearon placas de 96 pocillos para llevar a cabo el ensayo de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma Chemical Co.), como se ha descrito previamente.²⁴² Tras dos días de incubación (37°C, 5% CO_2 en una atmósfera húmeda), se añadieron 10 μL de MTT (5 mg/mL en PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) a cada pocillo, y la placa se incubó durante otras 3 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se descartó el sobrenadante y se reemplazó por 100 μL de DMSO, para disolver así los cristales de formazán. A continuación, se hizo la lectura de la absorbancia a 540 nm por espectrofotometría. Para todas las concentraciones del compuesto, la viabilidad celular se expresó como el porcentaje de la relación entre la absorbancia media de células tratadas y la absorbancia media de las células sin tratar. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes, y los valores de IC_{50} se determinaron gráficamente, utilizando el software *GraphPad Prism 4*.

Ensayo de RT-qPCR

Un total de 15×10^4 células de HT-29 se sembraron en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas, se incubaron con los productos a estudiar en DMSO a la concentración correspondiente, durante 48 horas. Pasado este tiempo, se recogieron las células y se aisló el ARN celular total de las células HT-29, empleando para ello el kit Ambion RNA Extraction, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cADN fue sintetizado por MMLV-RT con 1-21 μg del ARN extraído y oligo(dT)15, según las instrucciones del fabricante. Los genes fueron amplificados por un termociclador y sondas StepOnePlus™ TaqMan®. Se empleó el kit TaqMan® Gene Expression Master Mix Fast, el cual contiene el tampón o *buffer* apropiado para las condiciones de amplificación, dNTPs, la enzima ADN polimerasa termoestable y una sonda de referencia pasiva. Para llevar a cabo la amplificación de cada uno de los genes, se utilizaron los cebadores prediseñados por Life Technologies TaqMan® Gene Expression Assay: Hs99999903-m1 (β -actina), Hs00972646-m1 (*hTERT*), Hs00153408-m1 (*c-Myc*), Hs00204257-m1 (*PD-L1*) y Hs00900055-m1 (*VEGF*).

²⁴² Rodríguez-Nieto, S.; Medina, M. A.; Quesada, A. R. *Anticancer Res.* **2001**, 21, 3457-3460.

Detección de las proteínas c-Myc, PD-L1 y VEGF mediante ELISA

Un total de 15×10^4 células de HT-29 se sembraron en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas, se incubaron con los productos a estudiar en DMSO a la concentración correspondiente durante 48 horas (c-Myc y PD-L1) o 72 horas (VEGF). Los sobrenadantes en el medio de cultivo se recogieron y la proteína VEGF secretada por las células HT-29 se determinó empleando el kit Invitrogen™ Novex™ Human Vascular Endothelial Growth Factor ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células se recogieron, se lavaron dos veces con PBS y después se lisaron con 200 μ L del tampón de lisis celular, el cual consiste en Tris (pH 7.4) 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, NaF 1 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 20 mM, Na_3VO_4 2 mM, Triton™ X-100 1%, glicerol 10%, SDS 0.1% y desoxicolato 0.5%. Inmediatamente antes de su uso, PMSF (0.3 M en DMSO) se añadió a un cóctel de inhibidores de proteasa 1 mM y a 50 μ L/mL (Sigma Cat. No. P-2714). Las concentraciones de proteína en los lisados celulares se determinaron mediante el método Bradford y entonces se llevaron a una concentración de 200 μ g/mL. A continuación, el ensayo ELISA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la determinación de la proteína c-Myc, se empleó el kit Invitrogen™ Novex™ c-Myc (Total) Human ELISA ThermoFisher®, mientras que para la proteína PD-L1 se utilizó el kit Abcam Human PD-L1 ELISA test (ref. ab214565).

Detección de proteína c-Myc libre en solución acuosa mediante ELISA

Una mezcla de proteína c-Myc (solución de 1000 pg/mL ref. ab169901) y el compuesto a evaluar (100 μ M) en agua se agitó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, la cantidad de proteína c-Myc libre se determinó a través del kit Invitrogen™ Novex™ c-Myc (Total) Human ELISA.

Cuantificación de VEGFR-2, PD-L1 y c-Myc mediante citometría de flujo

VEGFR-2 se determinó a través de la cuantificación de Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD309 (VEGFR-2), mediante citometría de flujo. Para detectar el VEGFR-2 de membrana, las células se incubaron con los compuestos durante 24 horas y, pasado este tiempo, se recogieron, fijaron y marcaron con Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD309 (VEGFR-2). Para la detección del VEGFR-2 total (de membrana y citosólico), las células se

incubaron con los compuestos 24 horas y, a continuación, se obtuvieron los lisados celulares, que fueron marcados con Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human CD309 (VEGFR-2). El análisis de resultados se llevó a cabo con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6.

Para la detección de c-Myc y PD-L1 total, las células cancerosas fueron sembradas en placas de 6 pocillos, en una proporción de 3×10^5 células por pocillo, y se incubaron durante 24 horas con los compuestos correspondientes. Pasado este tiempo, las células fueron recogidas, fijadas, tratadas con Triton™ X-100 0.5% y, finalmente, marcadas con Alexa Fluor® 647 Rabbit monoclonal Anti-PD-L1 (ab215251) y FITC Rabbit monoclonal anti-c-Myc (ab223913). El análisis de resultados se llevó a cabo con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6.

Ensayo de formación de microtubos

Los pocillos de la placa para angiogénesis IBIDI (IBIDI, Martinsried, Alemania) se recubrieron con 12 μL de Matrigel® (10 mg/mL, BD Biosciences) a 4°C. Tras la gelificación a 37°C durante 30 minutos, las células HMEC-1 fueron sembradas a una concentración de 2×10^4 células por pocillo en 35 μL de medio de cultivo sobre la Matrigel®, y fueron incubadas 30 minutos a 37°C. A continuación, los compuestos fueron añadidos disueltos en 35 μL de medio de cultivo y, tras una incubación de 20 horas a 37°C, se evaluó la destrucción de tubos.

Evaluación de la proliferación celular en co-cultivos

Se sembraron 10^5 células HT-29 por pocillo en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 24 horas con medio de cultivo celular suplementado con interferón γ (10 ng/mL; humano, Invitrogen®). Tras esto, el medio fue reemplazado por otro que contenía 4×10^5 células T Jurkat por pocillo y los correspondientes compuestos a una concentración de 10 μM , o bien DMSO, empleado como control. Después de 24 horas de incubación, los sobrenadantes se recogieron para determinar las células T Jurkat vivas y, por otro lado, las células HT-29 se recogieron con tripsina. Los dos tipos de células se contaron empleando azul de tripano y la cámara Neubauer, así como mediante la técnica de citometría de flujo. El análisis de resultados se llevó a cabo con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron empleando Microsoft Excel y GraphPad Prism®. Las diferencias entre las medias se determinaron utilizando oneway ANOVA con la prueba de comparación múltiple de Dunnett y se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $\alpha \leq 0.05$.

5. DESARROLLO DE BIOMOLÉCULAS DIRIGIDAS CON EFECTO ANTICÁNCER

5. DESARROLLO DE BIOMOLÉCULAS DIRIGIDAS CON EFECTO ANTICÁNCER

5.1. Plásmidos como potenciales biofármacos

En el capítulo anterior hemos descrito el desarrollo de pequeñas moléculas que eran capaces de inhibir la proliferación de células tumorales mediante la inhibición o la regulación de la expresión de ciertos oncogenes. En este capítulo vamos a describir el desarrollo de biomoléculas como potenciales agentes anticáncer dirigidos a inhibir la expresión del sustrato del receptor de insulina (IRS) mediante el silenciamiento génico o *knock down*, que implica la reducción de la expresión de genes, no su eliminación (*knock out*). El ARN de interferencia (ARN de doble hebra) activa el mecanismo de silenciamiento génico. Una manera sencilla de administrar ARN de interferencia como potenciales biofármacos es en forma de plásmidos. Aunque ya se ha descrito en el capítulo 1, cabe recordar que los plásmidos son moléculas de ADN circular de doble cadena (ds) extracromosómico, que, en bacterias, se replica independientemente del ADN nuclear.²⁴³ Cuando se transfecta a células eucariotas, el ADN plasmídico (ADNp) debe penetrar las membranas citoplasmática y nuclear para acceder al núcleo y poder sintetizar el ARN correspondiente.

El objetivo que nos planteamos en esta Tesis fue la generación de plásmidos capaces de silenciar tanto *IRS1* como *IRS2* y que incluyeran EGFP como gen chivato para comprobar la eficiencia de la transfección.²⁴⁴ El diseño del plásmido fue llevado a cabo por la Dra. Ana María Sánchez, coordinadora del grupo de investigación *Neurobiotec* de la Unidad predepartamental de Medicina de la Universitat Jaume I. Se diseñaron varias secuencias de ARN de interferencia (un ARN de horquilla, shRNA) complementarias a una región del ARNm *IRS1* e *IRS2*, de forma que activan el proceso de silenciamiento específico del *IRS1* e *IRS2*, reduciendo la traducción de este a proteína, utilizando el software disponible en la página web de Invitrogen²⁴⁵, y adaptándolo para su inserción en el plásmido pSM155. Este fue escogido como vector precisamente porque tiene en cuenta el procesamiento de los ARN de interferencia endógenos (los ARN micrones, miARN), colocando el shARN de interés en un “ambiente micrón”. Este vector permite, además, la

²⁴³ Disponible en: <https://www.ibiantech.com/vectores-de-clonacion/>

²⁴⁴ Ribes-Navarro, A.; Sánchez-Pérez, A. M. *Agora de salut* **2018**, 5, 201-208.

²⁴⁵ Disponible en: <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>

expresión de un gen chivato, que expresa proteína verde fluorescente EGFP (véase la Figura 5.1).

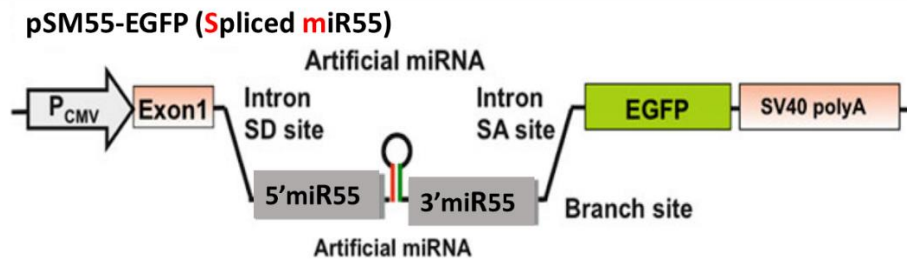


Figura 5.1. Estructura general del vector pSM55.²⁴⁶

Las secuencias de los oligonucleótidos codificantes para los shARN utilizados en la Tesis fueron las siguientes:

sh-IRS1

Top

5'TGCTGGCAGGCACCATCTCAACAATCGTTTTGGCCACTGACTGACG
ATTGTTGAGATGGTGCCTGC 3'

Bottom

5'CCTGGCAGGCACCATCTCAACAATCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGA
TTGTTGAGATGGTGCCTGCC 3'

sh-IRS2

Top

5'TGCTGGCCTGGAGTATTATGAGAACGGTTTTGGCCACTGACTGACC
GTCTCATAATACTCCAGGC 3'

Bottom

5'CCTGGCCTGGAGTATTATGAGAACGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCG
TTCTCATAATACTCCAGGCC3'

Los tres plásmidos que se diseñaron y purificaron para evaluarlos como posibles compuestos antitumorales fueron:

- pSM155-CMV-sh IRS1-GFP.
- pSM155-CMV-sh IRS2-GFP.
- pSM155-CMV-GFP.

²⁴⁶ Ying, S.-Y. *MicroRNA Protocols*. 2ª ed. Humana. 2013.

Los dos primeros silencian la expresión del IRS correspondiente, mientras que el tercero, el plásmido control, es el plásmido parental, sin las secuencias *sh/IRS1* y *sh/IRS2*. A continuación, en la Figura 5.2. se muestra la estructura general de este tipo de plásmidos:

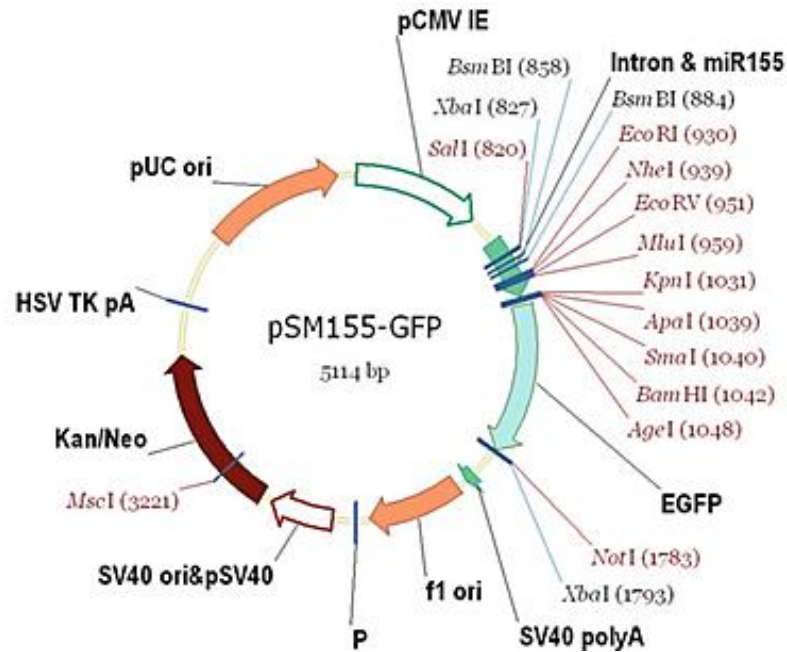


Figura 5.2. Estructura de los plásmidos estudiados.²⁴⁶

Los plásmidos fueron transformados en bacterias *E.Coli*, (cepa DH5α) y purificados de acuerdo a protocolos estándar (véase apartado 5.3), para ser transfectados a células humanas.

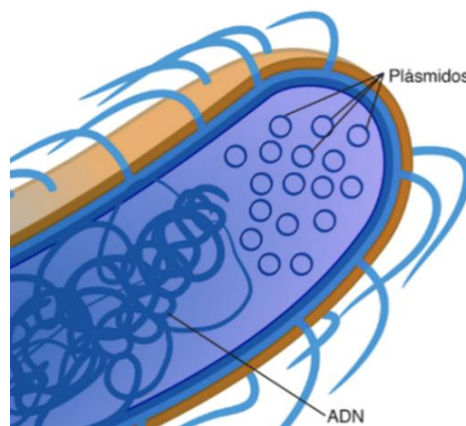


Figura 5.3. Ilustración de plásmidos de la bacteria *E. coli*.²⁴⁷

²⁴⁷ Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Plasmido>

5.2. Estudios biológicos con los plásmidos

5.2.1. Transfección de células

La transfección es un proceso que consiste en introducir ADN o ARN a una célula, con el objetivo de expresar o silenciar genes de interés en la célula transfectada. La transfección puede llevarse a cabo por distintos métodos.²⁴⁸ Uno de los procesos que permite realizar la transfección celular es la co-precipitación del ADN con fosfato de calcio.

Esta técnica consiste en que el calcio se asocia con las cargas negativas del ácido nucleico y, cuando se adiciona un *buffer* fosfato, precipita el ADN con el calcio y fosfato, formando partículas de pequeño tamaño; esto permite que el ADN pueda acceder a la célula mediante un proceso de endocitosis.²⁴⁹ Cuanto menor sea el precipitado formado, mayor es la eficiencia de la transfección realizada.²⁵⁰ Algunos factores que pueden condicionar el tamaño del precipitado formado son la temperatura, el pH o el modo en el que se mezcla el ADN con el *buffer*, por lo que afectan de manera directa a la eficiencia de la transfección.²⁵¹

5.2.2. Ensayos de proliferación celular con sh/*IRS1*

Para el estudio se seleccionaron células tumorales que tienen sobreexpresados estos IRS, como la línea de adenocarcinoma de mama MCF-7 (véase la Figura 5.4).²⁵² De esta manera, al añadir el plásmido capaz de silenciar el gen *IRS1*, se espera que el cultivo celular tumoral reduzca su crecimiento por activación de la apoptosis.

²⁴⁸ Iglesias-Artola, J. M.; Villamonte, G.; Gonzales-Molfino, H. M. *The Biologist (Lima)* **2015**, *13*, 125-142.

²⁴⁹ Loyter, A.; Scangos, G. A.; Ruddle, F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1982**, *79*, 422-426.

²⁵⁰ Jordan, M.; Schallhorn, A.; Wurm, F. M. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 596-601.

²⁵¹ Strain, A. J.; Wallace, W. A.; Wyllie, A. H. *Biochem. J.* **1985**, *225*, 529-533.

²⁵² Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169047-IRS1/cell#human>

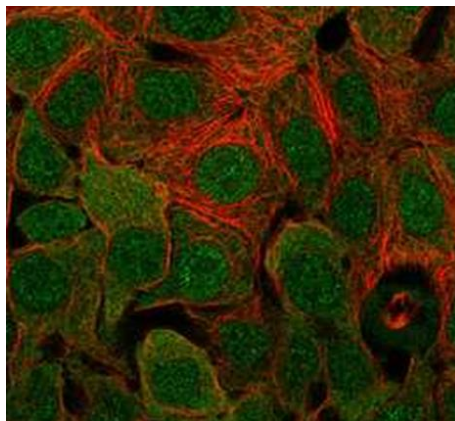


Figura 5.4. Localización de IRS-1 en nucleoplasma y citosol, en células MCF-7. En color rojo se muestran los microtúbulos que conforman el citoesqueleto, mientras que, en color verde, aparece el anticuerpo de IRS1.²⁵²

El objetivo de este ensayo fue determinar si el plásmido silenciador de IRS-1 era capaz de reducir la proliferación de las células tumorales. Para ello se sembraron 6×10^4 células en placas de 24 pocillos y después de 24 horas de incubación (37°C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda), se llevó a cabo la transfección, según el protocolo de transfección del fosfato de calcio, a diferentes tiempos de incubación (24, 48, 72 y 96 horas).

En el ensayo se establecieron cuatro grupos:

- *MCF-7 sin tratar*: células a las que no se les añadió ningún compuesto.
- *MCF-7 con el plásmido control*: este plásmido no es silenciador del gen *IRS1*, por lo que se espera que no cause efecto en las células.
- *MCF-7 con el plásmido sh*: células tumorales a las que se les añadió el plásmido capaz de silenciar el gen *IRS1*.
- *MCF-7 con las soluciones A y B*: estas soluciones se utilizan para llevar a cabo la transfección. Se quería descartar cualquier interferencia de estas soluciones con los resultados obtenidos con el plásmido silenciador.

La Figura 5.5. muestra el cultivo general de MCF-7 antes de la transfección. El aspecto del cultivo celular de los cuatro grupos después

de los diferentes tiempos de incubación se recoge en las Figuras 5.6. (24 h), Figura 5.7 (48 h), Figura 5.8 (72 h) y Figura 5.9 (96 h).

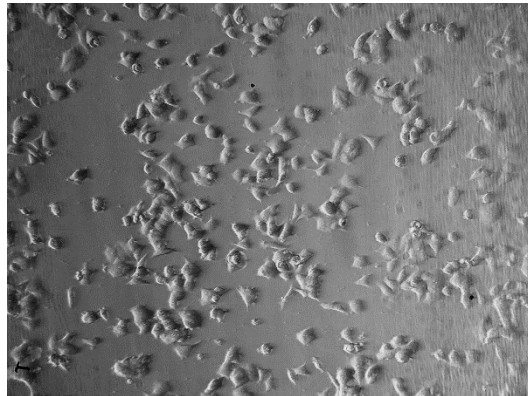


Figura 5.5. Células MCF-7 antes de realizar la transfección.

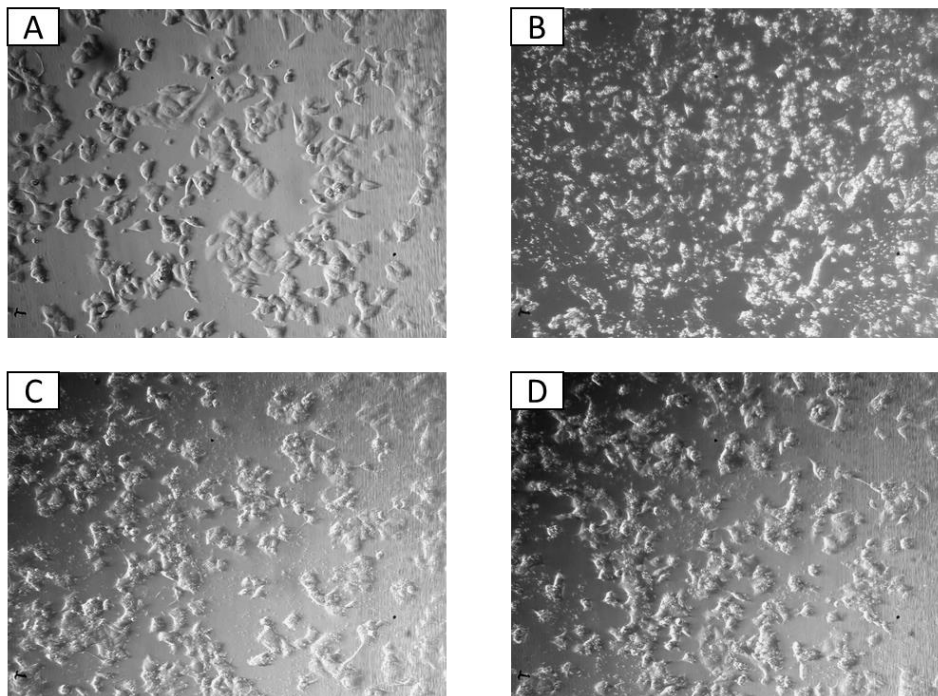


Figura 5.6. Crecimiento de las células tumorales MCF-7 **transcurridas 24 horas** de la transfección. A. Células MCF-7 sin tratar; B. Células MCF-7 con el plásmido control; C. Células MCF-7 con las soluciones A y B; D. Células MCF-7 tratadas con el plásmido silenciador del gen *IRS1*.

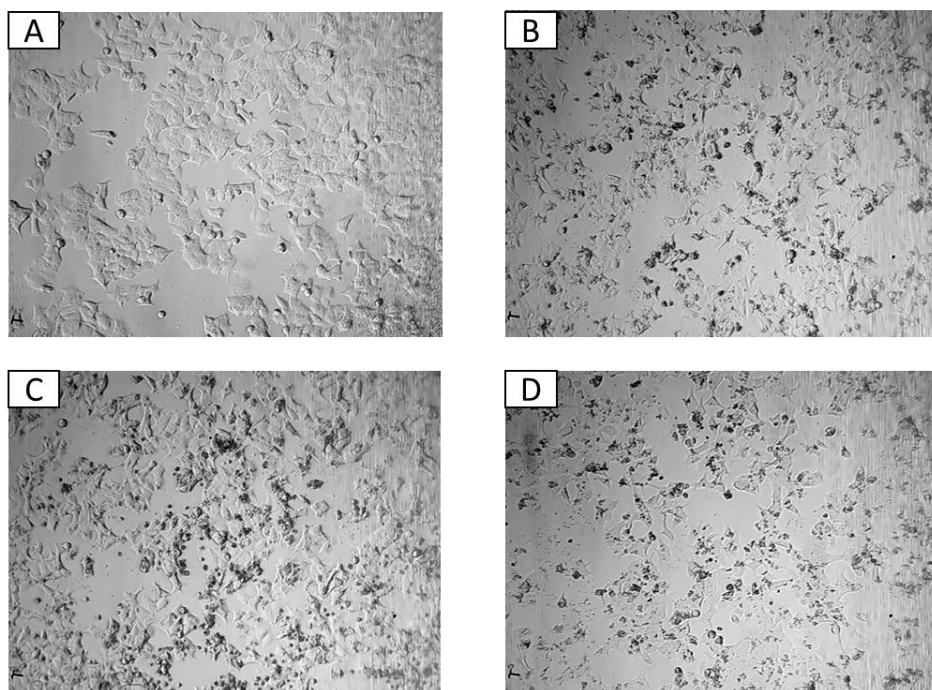


Figura 5.7. Crecimiento de las células tumorales MCF-7 **transcurridas 48 horas** de la transfección. *A.* Células MCF-7 sin tratar; *B.* Células MCF-7 con el plásmido control; *C.* Células MCF-7 con las soluciones A y B; *D.* Células MCF-7 tratadas con el plásmido silenciador del gen *IRS1*.

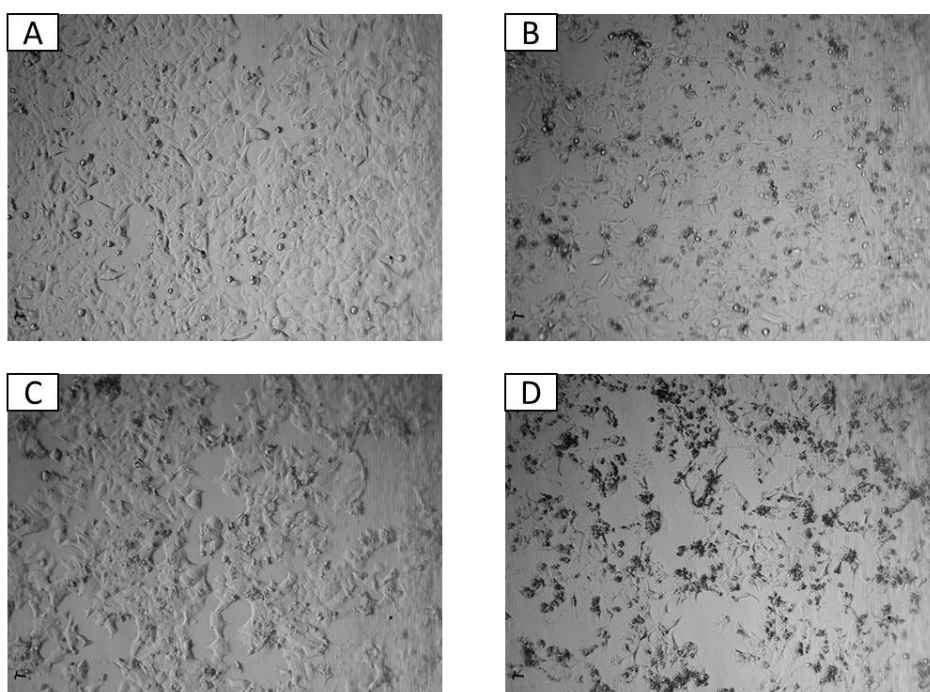


Figura 5.8. Crecimiento de las células tumorales MCF-7 **transcurridas 72 horas** de la transfección. *A.* Células MCF-7 sin tratar; *B.* Células MCF-7 con el plásmido control; *C.* Células MCF-7 con las soluciones A y B; *D.* Células MCF-7 tratadas con el plásmido silenciador del gen *IRS1*.

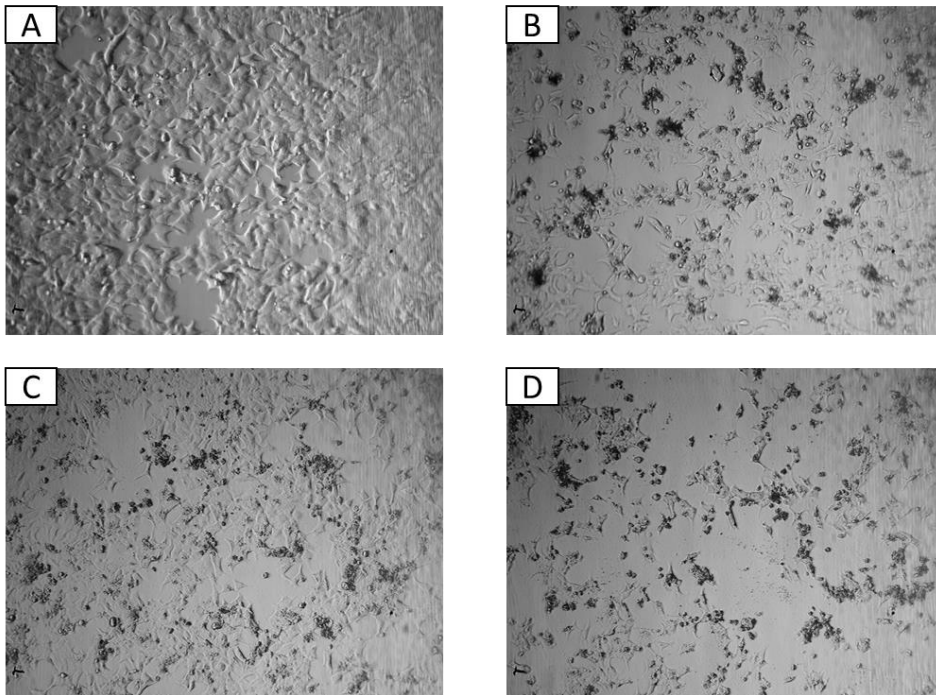


Figura 5.9. Crecimiento de las células tumorales MCF-7 **transcurridas 96** horas de la transfección. A. Células MCF-7 sin tratar; B. Células MCF-7 con el plásmido control; C. Células MCF-7 con las soluciones A y B; D. Células MCF-7 tratadas con el plásmido silenciador del gen *IRS1*.

En general, se observa que una vez transcurridas 48 h del tratamiento, la proliferación de las células tumorales disminuye, así como la viabilidad de las mismas. Para cuantificar el efecto que se observó en las células tumorales con el microscopio invertido, se realizaron tres ensayos diferentes: el recuento con la cámara Neubauer, la citometría de flujo y el cálculo del área despoblada.

Recuento con cámara Neubauer

Se llevó a cabo un recuento de células vivas con la cámara Neubauer, a las 48 y 72 horas tras la transfección en los cuatro grupos: células sin tratar, células tratadas únicamente con la solución A y B, células con el plásmido control y células con el plásmido con capacidad de silenciar la expresión del *IRS1* (véase Figura 5.10). Los datos se expresan como el porcentaje en relación a las células sin tratar.

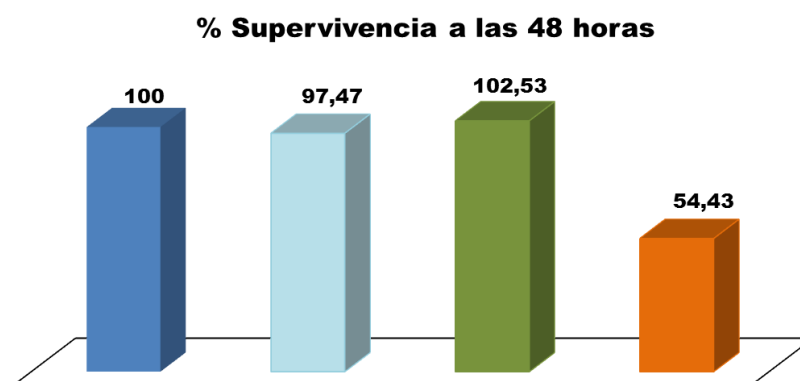


Figura 5.10. Porcentaje de proliferación celular presente en cada tipo de muestra, a las **48 horas** tras realizar el proceso de transfección.

A las 48 horas tras la transfección con el plásmido silenciador el porcentaje de células vivas se redujo a la mitad, aproximadamente; este resultado concuerda con lo que se observó en el microscopio invertido. Sin embargo, a las 120 horas tras la transfección el porcentaje de células vivas en la muestra tratada con el plásmido control y la muestra con el plásmido capaz de silenciar la expresión de *IRS1* fue muy similar. Este incremento pudo deberse a la proliferación de las células no transfectadas.

Recuento mediante citometría de flujo

Mediante esta técnica se pudo cuantificar la cantidad de células vivas y muertas presente en cada tipo de muestra (véase la Figura 5.11).

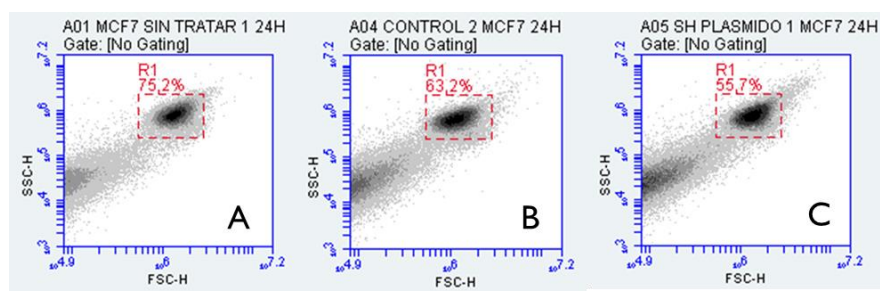


Figura 5.11. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo. A. Porcentaje de células vivas en las MCF-7 sin tratar. B. Porcentaje de células vivas en las MCF-7 con el plásmido control pSM155-CMV-GFP. C. Porcentaje de células vivas en las MCF-7 tratadas con el plásmido pSM155-CMV-sh *IRS1*-GFP.

El ensayo se realizó a diferentes tiempos tras la transfección: 24, 48, 72, 96 y 120 horas tras la misma. Sin embargo, finalmente se descartaron los

tiempos a 24 y 120 horas, ya que no aparecían diferencias significativas con las células MCF-7 sin tratar; en el primer caso, se debía a que todavía no había dado tiempo a ver el efecto de la transfección, y a las 120 horas, ya había pasado demasiado tiempo y las células volvieron a una proliferación normal.

El efecto del plásmido *shIRS1* se hace patente a las 96 horas de tratamiento (véase la Figura 5.12); en plásmido control había un 77-79% de células vivas respecto al control sin plásmido, mientras que en las células tratadas con *shIRS1* este porcentaje se redujo a un 44-45% de células viables, respecto al control de células sin tratar.

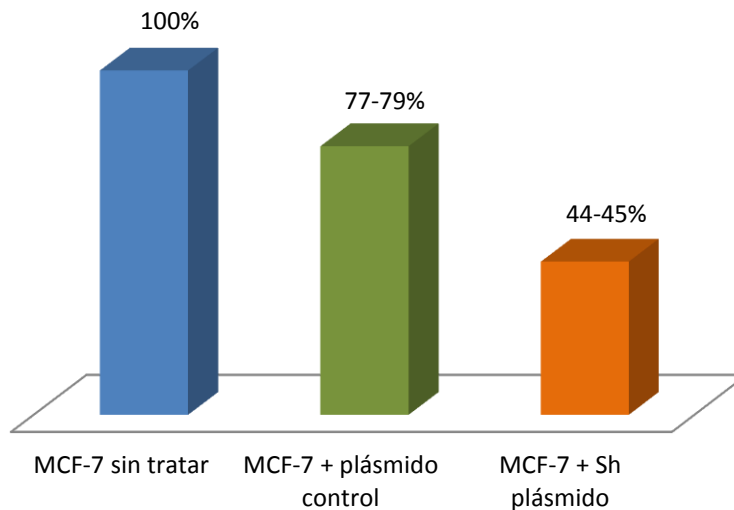


Figura 5.12. Porcentaje de células vivas presentes en cada tipo de muestra a las 96 horas tras la transfección. Este resultado es la media de cuatro ensayos independientes.

Cálculo del área despoblada

En este ensayo se calculó el área despoblada de células en cada pocillo, mediante el programa Image J®. Para llevarlo a cabo, se realizaron fotografías previas al estudio anterior de citometría de flujo, con la intención de calcular el área despoblada (véase la Figura 5.13).

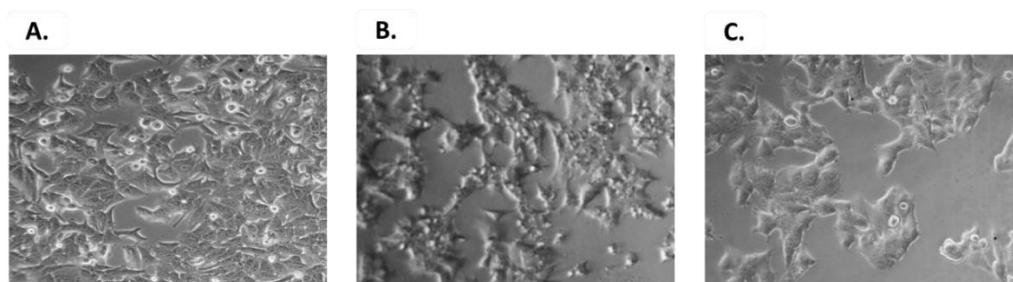


Figura 5.13. A. MCF-7 sin tratar; B. MCF-7 con el plásmido control pSM155-CMV-GFP; C. MCF-7 con el plásmido silenciador pSM155-CMV-sh IRS1-GFP. Las imágenes fueron tomadas a las 96 horas tras la transfección.

El área despoblada se correlacionan bien con el ensayo anterior: el área despoblada en las células MCF-7 sin tratar fue del 2-8%; plásmido control era de 5-12%; y con sh/*IRS1* se observó un despoblamiento del 30-45% (véase la Figura 5.14)

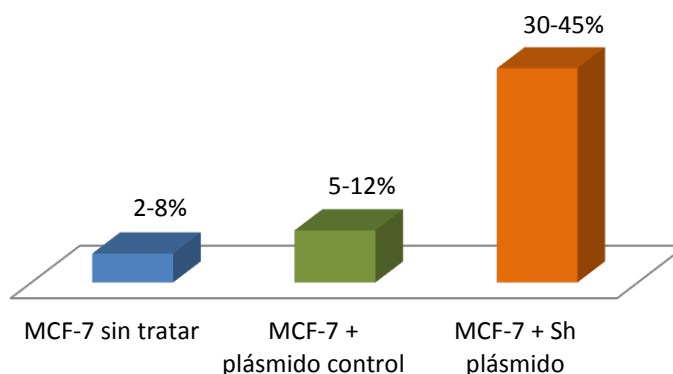


Figura 5.14. Área despoblada de células en cada tipo de muestra a las 96 horas tras la transfección. Este resultado es la media de cuatro ensayos independientes.

Los resultados obtenidos mediante estos tres ensayos de proliferación celular apoyan el resultado visual que se obtuvo con las imágenes del microscopio invertido, en los que se pudo observar una reducción de células vivas en aquellas muestras tratadas con el plásmido capaz de silenciar el gen *IRS1*.

5.2.3. Ensayos de proliferación celular con sh/*IRS2*

En este ensayo se quiso estudiar cómo afectaba el silenciamiento de *IRS2* a través del plásmido silenciador pSM155-CMV-sh*IRS2*-GFP a la proliferación celular. En este caso se utilizaron dos líneas celulares, MCF-7 (tumoral) y HEK-293 (embrionaria). La técnica empleada fue la citometría de flujo, y se

realizaron las mediciones a 24, 48, 72 y 96 horas tras la transfección. Se llevaron a cabo cuatro ensayos independientes, en los cuales se evaluaron cinco tipos de muestra: células sin tratar, células tratadas con la solución A y B, células tratadas con el plásmido control (pSM155-CMV-GFP) y células tratadas con el plásmido silenciador de *IRS2* (pSM155-CMV-sh *IRS2* (hu1)-GFP y pSM155-CMV-sh *IRS2* (hu2)-GFP).

En las células HEK-293, no se observaron diferencias entre plásmido control, y las sh*IRS2* a las 72 horas (véase la Figura 5.15) y tampoco a 96 horas (véase la Figura 5.16). Curiosamente se encontró un efecto negativo en la solución A y B.

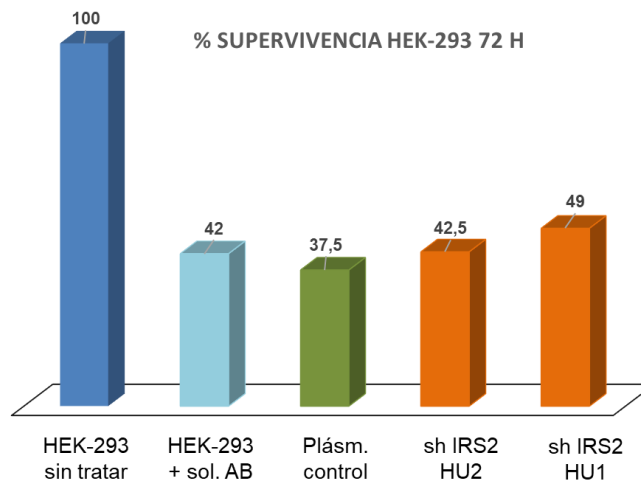


Figura 5.15. Número de células vivas en la línea celular no tumoral HEK-293, a las 72 horas tras la transfección.

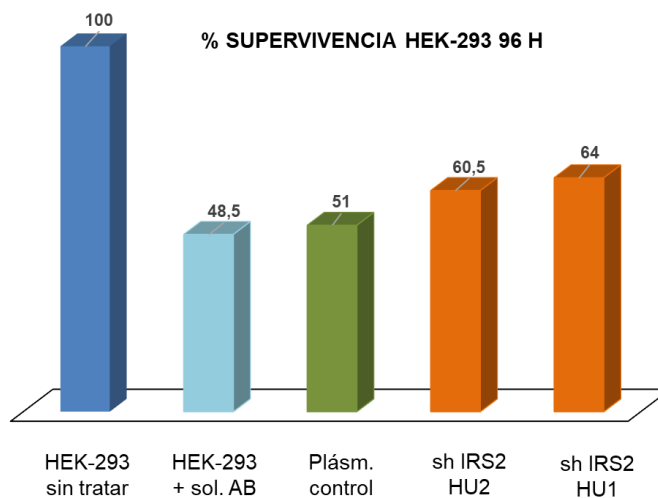


Figura 5.16. Número de células vivas en la línea celular no tumoral HEK-293, a las 96 horas tras la transfección.

En el caso de las células tumorales MCF-7, se observó una reducción de la supervivencia respecto al plásmido control, especialmente sh/IRS2 hu2, máxima a las 72 horas tras la transfección (véase la Figura 5.17). A partir de las 96 horas, los porcentajes de supervivencia volvieron a aumentar, hecho que pudo ser debido a la proliferación de las células no transfectadas (véase la Figura 5.18).

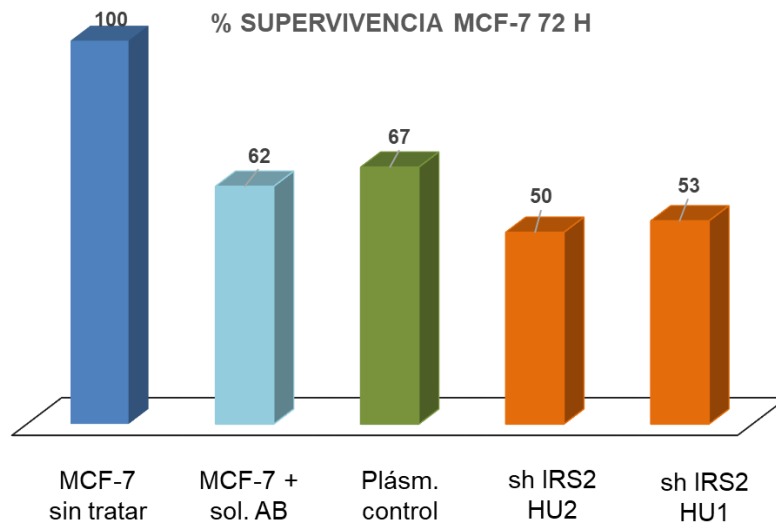


Figura 5.17. Número de células vivas en la línea celular no tumoral MCF-7, a las 72 horas tras la transfección.

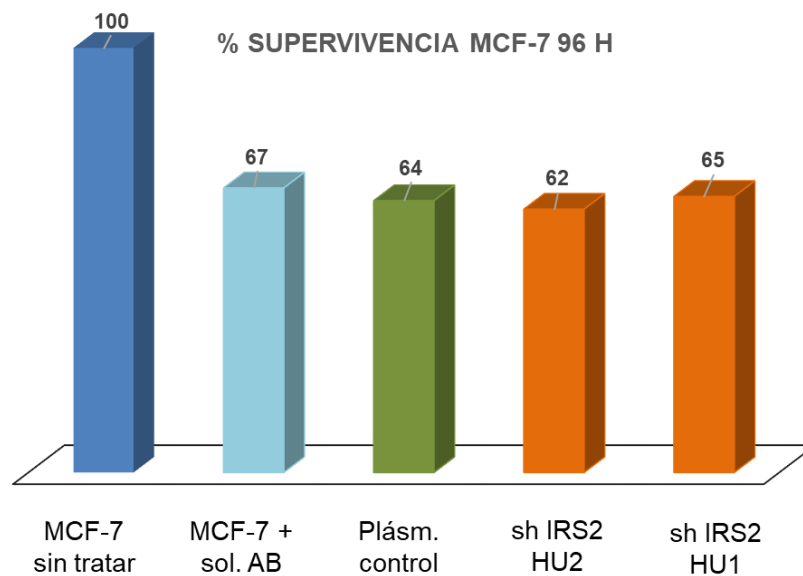


Figura 5.18. Número de células vivas en la línea celular no tumoral MCF-7, a las 96 horas tras la transfección.

Por ello, se concluye que el plásmido silenciador de la expresión de *IRS2* que presenta mayor actividad en la línea tumoral MCF-7 es pSM155-CMV-sh *IRS2* (hu2)-GFP. Además, de los plásmidos silenciadores evaluados, es el que menos afecta a las células HEK-293, por lo que presenta mayor selectividad hacia las células cancerosas.

5.2.4. Ensayos de ciclo celular con sh*IRS1*

En este ensayo se intentó establecer el efecto de sh*IRS1* en el ciclo celular. Para llevar a cabo el estudio, se empleó la técnica de citometría de flujo. Las líneas utilizadas fueron HeLa y MCF-7 (tumoraes), y HEK-293. En este estudio, se evaluaron: células sin tratar, células con el plásmido control (pSM155-CMV-GFP) y células con el plásmido silenciador (pSM155-CMV-sh *IRS1*-GFP), y las mediciones se llevaron a cabo a las 24, 44, 72 y 96 horas tras la transfección. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la línea celular HEK-293 (véase Tabla 5.1 y Figura 5.19) y en HeLa (véase Tabla 5.2 y Figura 5.20):

Tabla 5.1. Resultados obtenidos en el ciclo celular en la línea celular HEK-293.

	MUESTRA	G ₀	S+G ₂ /M
24 horas	HEK-293 sin tratar	82 ± 6	14 ± 2
	Plásmido control	76 ± 5	20 ± 5
	Plásmido silenciador	75 ± 3	21 ± 3
44 horas	HEK-293 sin tratar	56 ± 3	43 ± 4
	Plásmido control	53 ± 2	42 ± 2
	Plásmido silenciador	60 ± 6	35 ± 5
72 horas	HEK-293 sin tratar	54 ± 3	41 ± 3
	Plásmido control	51 ± 1	45 ± 1
	Plásmido silenciador	48 ± 2	47 ± 3
96 horas	HEK-293 sin tratar	55 ± 3	40 ± 3
	Plásmido control	56 ± 8	40 ± 8
	Plásmido silenciador	65 ± 8	30 ± 8

*Los datos son el promedio (±SD) de tres experimentos.

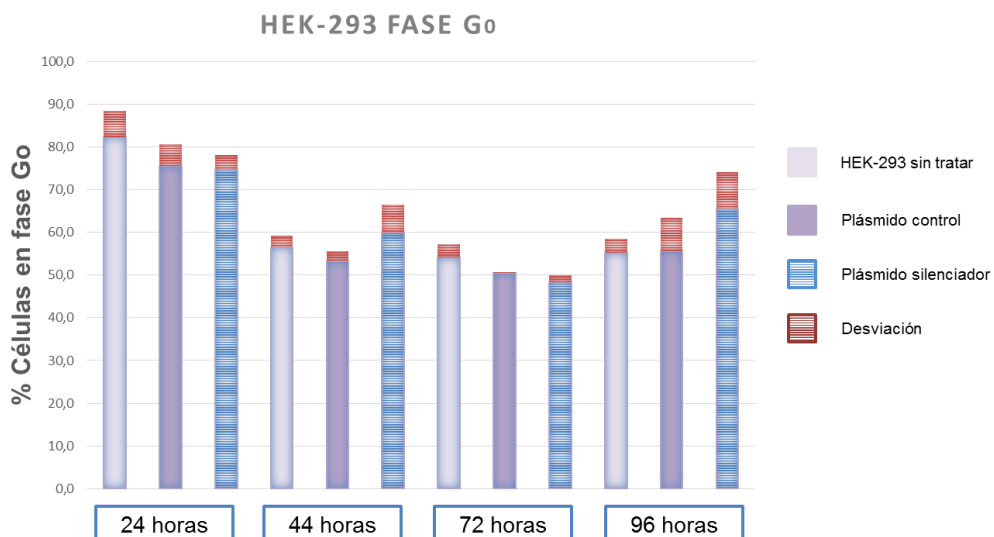


Figura 5.19. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo en la línea celular HEK-293. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

Tabla 5.2. Resultados obtenidos en el ciclo celular en la línea celular HeLa.

	MUESTRA	G ₀	S+G ₂ /M
24 horas	HeLa sin tratar	69 ± 7	17 ± 8
	Plásmido control	63 ± 6	19 ± 7
	Plásmido silenciador	64 ± 5	17 ± 9
44 horas	HeLa sin tratar	63 ± 2	26 ± 2
	Plásmido control	54 ± 1	11,7 ± 0,8
	Plásmido silenciador	58 ± 2	14 ± 2
72 horas	HeLa sin tratar	70 ± 4	15 ± 5
	Plásmido control	56,7 ± 0,4	14 ± 3
	Plásmido silenciador	59 ± 1	14 ± 6
96 horas	HeLa sin tratar	65 ± 2	23 ± 3
	Plásmido control	63 ± 1	14 ± 3
	Plásmido silenciador	59 ± 2	19 ± 3

*Los datos son el promedio (±SD) de tres experimentos.

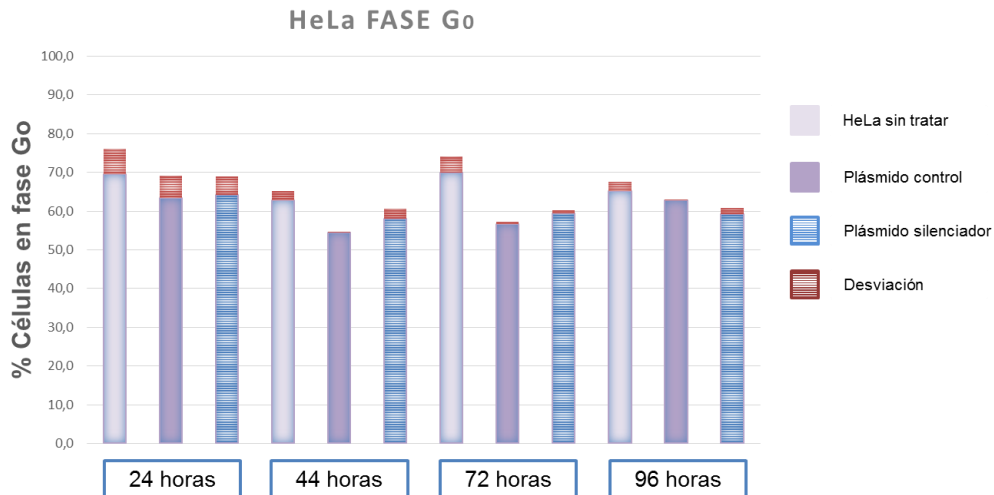


Figura 5.20. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo en la línea celular HeLa. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

Respecto a los resultados obtenidos, en ninguna de las dos líneas celulares se observan diferencias en las fases del ciclo celular con respecto a las células sin tratar, o tratadas con el plásmido control.

Este mismo ensayo se llevó a cabo en la línea celular MCF-7, siguiendo la misma temporalización (véase Tabla 5.3 y Figura 5.21):

Tabla 5.3. Resultados obtenidos en el ciclo celular en la línea celular MCF-7.

	MUESTRA	G ₀	S+G ₂ /M
24 horas	MCF-7 sin tratar	65 ± 1	32 ± 2
	Plásmido control	70 ± 8	28 ± 7
	Plásmido silenciador	68 ± 2	30 ± 1
44 horas	MCF-7 sin tratar	74,4 ± 0,1	24,0 ± 0,4
	Plásmido control	77 ± 4	21 ± 4
	Plásmido silenciador	73 ± 3	26 ± 3
72 horas	MCF-7 sin tratar	53 ± 5	44 ± 5
	Plásmido control	53,7 ± 0,1	43,0 ± 0,2
	Plásmido silenciador	58 ± 3	39 ± 3
96 horas	MCF-7 sin tratar	55 ± 8	43 ± 7
	Plásmido control	66 ± 2	32 ± 2
	Plásmido silenciador	63 ± 2	35 ± 2

*Los datos son el promedio (±SD) de tres experimentos.

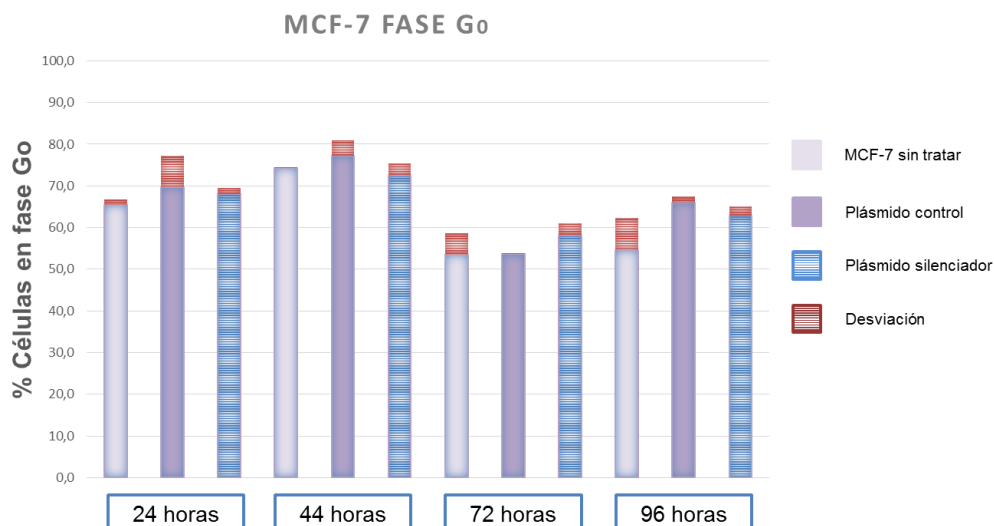


Figura 5.21. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo en la línea celular MCF-7. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos en esta línea celular, respecto a la influencia de silenciar el gen de *IRS1* en el ciclo celular, son muy similares a las líneas HEK-293 y HeLa. Por ello, se concluye que el silenciamiento de este gen no afecta a las fases del ciclo celular.

5.2.5. Ensayos de ciclo celular con sh/*IRS2*

Este estudio se llevó a cabo para establecer el efecto de sh/*IRS2* en el ciclo celular mediante citometría de flujo y, de nuevo, las líneas celulares seleccionadas fueron HEK-293 y MCF-7. Se establecieron también cuatro grupos: células sin tratar, células con el plásmido control (pSM155-CMV-GFP) y células con el plásmido silenciador (pSM155-CMV-sh *IRS2* (hu1)-GFP y pSM155-CMV-sh *IRS2* (hu2)-GFP), y las mediciones se llevaron a cabo a las 48, 72 y 96 horas tras la transfección; no se realizaron mediciones a las 24 horas, ya que estudios anteriores sugerían que no había efecto a ese tiempo. Se llevaron a cabo cuatro estudios independientes. Los resultados obtenidos en la línea celular HEK-293 se recogen en la Tabla 5.4 y la Figura 5.22, mientras que los de MCF-7 están reflejados en la Tabla 5.5 y Figura 5.23:

Tabla 5.4. Resultados obtenidos en el ciclo celular en la línea celular HEK-293.

	MUESTRA	G ₀	S+G ₂ /M
48 horas	HEK-293 sin tratar	74 ± 2	29 ± 3
	HEK-293 + Sol. AB	82 ± 2	20 ± 3
	Plásmido control	79 ± 1	23 ± 1
	Plásmido silenciador 1	81 ± 3	21 ± 3
	Plásmido silenciador 2	80 ± 2	23 ± 3
72 horas	HEK-293 sin tratar	76 ± 6	27 ± 7
	HEK-293 + Sol. AB	76 ± 7	27 ± 8
	Plásmido control	76 ± 7	27 ± 7
	Plásmido silenciador 1	77 ± 8	25 ± 8
	Plásmido silenciador 2	76 ± 6	27 ± 7
96 horas	HEK-293 sin tratar	80 ± 7	23 ± 7
	HEK-293 + Sol. AB	77 ± 8	26 ± 9
	Plásmido control	79 ± 5	24 ± 6
	Plásmido silenciador 1	79 ± 7	23 ± 8
	Plásmido silenciador 2	79 ± 8	23 ± 8

*Los datos son el promedio (±SD) de cuatro experimentos.

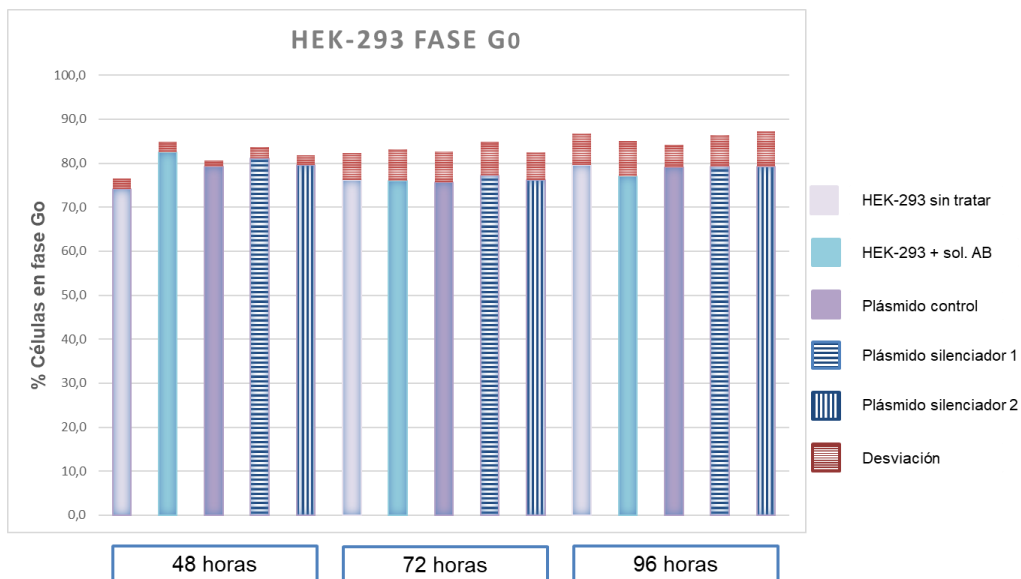


Figura 5.22. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo en la línea celular HEK-293. Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes.

Tabla 5.5. Resultados obtenidos en el ciclo celular en la línea celular MCF-7.

	MUESTRA	G ₀	S+G ₂ /M
48 horas	MCF-7 sin tratar	68 ± 4	31 ± 4
	MCF-7 + Sol. AB	67 ± 2	31 ± 2
	Plásmido control	69 ± 2	30 ± 2
	Plásmido silenciador 1	68 ± 3	30 ± 3
	Plásmido silenciador 2	68 ± 2	31 ± 3
72 horas	MCF-7 sin tratar	68 ± 7	31 ± 7
	MCF-7 + Sol. AB	73 ± 9	26 ± 9
	Plásmido control	72 ± 9	26 ± 9
	Plásmido silenciador 1	73 ± 9	26 ± 10
	Plásmido silenciador 2	74 ± 11	25 ± 11
96 horas	MCF-7 sin tratar	70 ± 11	28 ± 11
	MCF-7 + Sol. AB	74 ± 9	25 ± 9
	Plásmido control	72 ± 9	27 ± 9
	Plásmido silenciador 1	74 ± 12	25 ± 12
	Plásmido silenciador 2	73 ± 11	25 ± 11

*Los datos son el promedio (±SD) de cuatro experimentos.

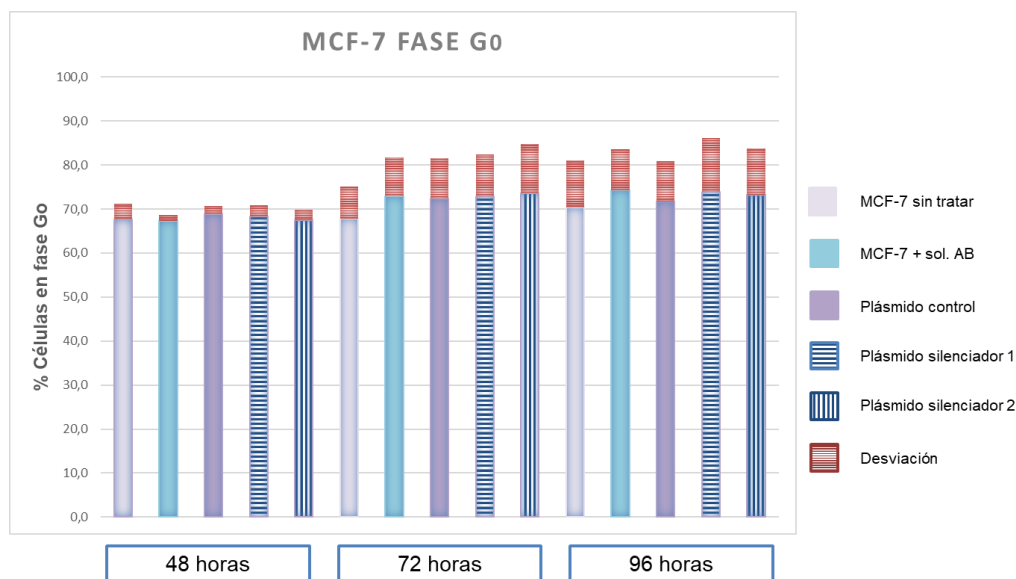


Figura 5.23. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo en la línea celular MCF-7. Se llevaron a cabo cuatro experimentos independientes.

No se apreciaron diferencias entre las células tratadas con el plásmido control y las tratadas con los plásmidos silenciadores, a ninguno de los tiempos de medición, tanto en la línea tumoral MCF-7, como en la no cancerosa HEK-293. De ahí que concluyamos que el silenciamiento de *IRS2* no afecta al ciclo celular.

5.2.6. Ensayos Akt/p-Akt y ERK/p-ERK con sh/IRS1 y sh/IRS2

Este estudio, realizado mediante la técnica de citometría de flujo, tenía por objetivo verificar si el silenciamiento de los genes *IRS1* e *IRS2* disminuía la fosforilación de Akt y ERK, lo que indicaría una disminución en las vías Akt/mTOR y MAPK, respectivamente. La importancia de estas vías de señalización reside en que regulan una gran variedad de procesos celulares, como la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte de la célula. Se llevaron a cabo cuatro réplicas del ensayo, en el que se empleó la línea celular tumoral MCF-7; las muestras presentes en el estudio fueron células sin tratar, células con la solución A y B, células con el plásmido control (pSM155-CMV-GFP) y células con el plásmido silenciador correspondiente (pSM155-CMV-sh *IRS1*-GFP, pSM155-CMV-sh *IRS2* (hu1)-GFP y pSM155-CMV-sh *IRS2* (hu2)-GFP). Los tiempos de medición fueron a las 48, 72 y 92 horas tras la transfección; esta temporalización estaba basada en los ensayos anteriores, ya que, a partir de esos tiempos, se empezaban a observar resultados. En la Figura 5.24 se muestra la media de los resultados obtenidos para pERK/ERK:

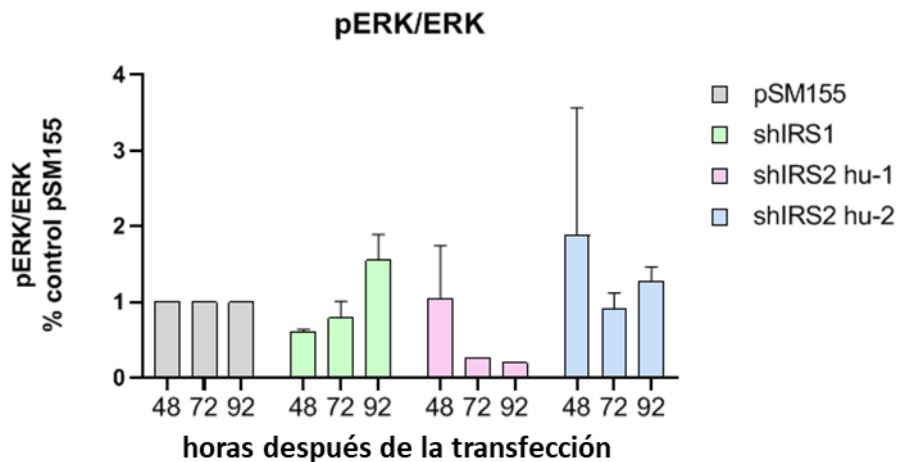


Figura 5.24. Porcentaje pERK/ERK respecto al plásmido control pSM155, a los tres tiempos del ensayo.

pERK/ERK respecto al plásmido control disminuye con sh/*IRS1* a las 48 y 72 horas tras la transfección. sh/*IRS2* hu1 reduce pERK/ERK a las 72 y 92 horas. Sin embargo, hay que destacar que del pSM155 – sh/*IRS2* hu1 solo se pudo realizar una réplica, debido a la falta del plásmido, por lo que sería necesario realizar más ensayos. Por su parte, el plásmido pSM155 – sh/*IRS2* hu2 no parece tener efecto sobre esta vía.

En la Figura 5.25 se muestran los resultados obtenidos para pAkt/Akt:

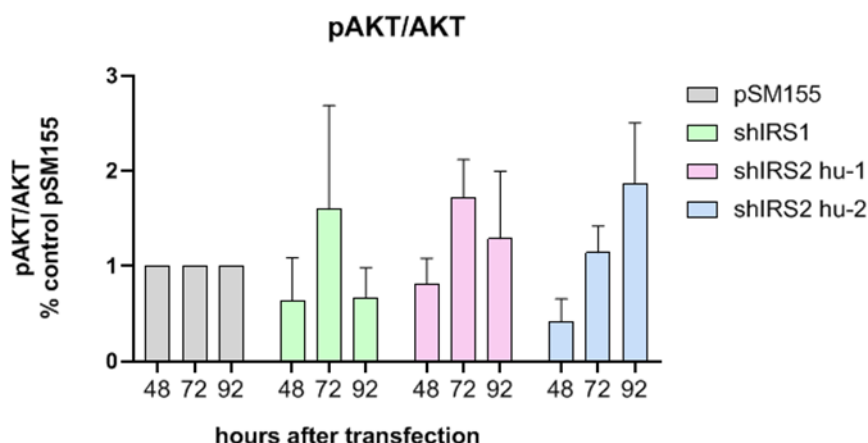


Figura 5.25. Porcentaje pAkt/Akt respecto al plásmido control pSM155, a los tres tiempos del ensayo.

En el ensayo sobre la relación pAkt/Akt, también se observó una mayor disminución de la fosforilación a las 48 horas. De nuevo, sh/*IRS1* fue capaz de reducir la fosforilación de Akt a las 48 y 92 horas. Por otra parte, el plásmido sh/*IRS2* hu1 tuvo un muy efecto débil, mientras que el sh/*IRS2* hu2 también redujo significativamente la fosforilación a las 48 horas tras la transfección.

En general, en ambas vías se observó un aumento del sustrato fosforilado a medida que aumentaba el periodo de tiempo tras la transfección. Ese incremento de fosforilación con el paso del tiempo pudo ser debido a que tanto ERK como Akt se fosforilan por otras vías. Esto explica por qué en todos los casos el efecto de mayor inhibición del sustrato fosforilado y, por tanto, de las vías de señalización estudiadas, se da siempre a las 48 horas.

5.2.7. Conclusiones

Se realizaron diferentes ensayos biológicos para conocer el efecto de los diferentes plásmidos sintetizados como silenciadores de la expresión de *IRS1* e *IRS2* en el crecimiento tumoral, así como su mecanismo de acción específico. Para ello, se empleó principalmente la línea celular tumoral MCF-7, ya que presenta un mayor nivel de expresión de *IRS*; y como línea celular no cancerosa se empleó HEK-293, con el fin de conocer el efecto en células no tumorales.

Los ensayos de proliferación celular mostraron que el plásmido pSM155-CMV-sh IRS1-GFP presentaba un efecto antiproliferativo notorio a partir de las 96 horas tras la transfección, mientras que el plásmido pSM155-CMV-sh IRS2 (hu2)-GFP lo hacía transcurridas 72 horas después la transfección. Por ello, se quiso conocer el mecanismo a través del cual estos plásmidos ejercían su acción antiproliferativa. En primer lugar, se determinó el efecto de los plásmidos sobre las fases del ciclo celular. Sin embargo, ninguno de los plásmidos evaluados presentó diferencias con el plásmido control, ni en la línea tumoral ni en la embrionaria. Por tanto, deducimos que sh*IRS1* e sh*IRS2* no afectan al ciclo celular, lo que sugiere que el silenciamiento de *IRS1* e *IRS2* induce muerte celular por apoptosis.

Posteriormente se determinó el efecto de los plásmidos sobre las vías de señalización ERK/pERK y Akt/pAkt. Este estudio demostró que el plásmido pSM155-CMV-sh IRS1-GFP es el que produce una mayor inhibición de las dos vías (inhibe tanto la fosforilación de ERK como la de Akt) principalmente a las 48 horas tras la transfección. La acción del plásmido pSM155-CMV-sh IRS2 (hu2)-GFP sobre la vía de Akt es moderada a las 48 horas de la transfección, pero no tiene efecto sobre la vía ERK. Por su parte, el plásmido pSM155-CMV-sh IRS2 (hu1)-GFP requeriría la realización de más ensayos, por la falta de réplicas en la vía ERK/pERK, que es en la que presentaba más efecto; sobre la vía celular Akt/pAkt, no ejercía un efecto considerable, al compararlo con los otros dos compuestos evaluados.

5.3. Materiales y métodos

Purificación de los plásmidos

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo en el grupo de investigación *Neurobiotec* de la Unidad predepartamental de Medicina de la Universitat Jaume I, coordinado por Ana María Sánchez Pérez. La cepa facilitada por el grupo para realizar la purificación fue *E. Coli*, y se empleó el kit comercial NZYMidiprep.

Para la purificación de los plásmidos seleccionados se utilizó el kit comercial NZYMidiprep, que consiste en los siguientes pasos:²⁵³

²⁵³ Disponible en: <https://www.nzytech.com/products-services/molecular-biology/dna-rna-purification/plasmid-dna-purification/midiprep/mb050/>

A 50 mL de medio LB con 50 μ L del antibiótico (kanamicina) se inocularon bacterias *E.Coli*, cepa DH5 α , desde un tubo a -80°C) con glicerol. Se agitó toda la noche a 37°C en un Erlenmeyer de 250 mL. Estas bacterias son clones y contienen el plásmido con el inserto shRNA. El plásmido presenta además resistencia al antibiótico.

Las bacterias se recogen en un *corning* de 50 mL por centrifugación a 6000 G durante 10 minutos a 4°C.

Se eliminó el sobrenadante, y el pellet se resuspendió con 4 mL de Buffer M1. Vórtex si es necesario.

Se añadieron 4 mL de Buffer M2 (para lisar) y se mezclaron invirtiendo 5 veces, y luego se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos.

Se añadieron 4 mL de Buffer M3 (para neutralizar) y se mezcló invirtiendo 15 veces. Se centrifugó durante 50 minutos a 16.000 G y 4°C.

Se dispuso una columna en una probeta de 50 mL, y se equilibró con 2.5 mL de MEQ Buffer, y se dejó eluir por efecto de la gravedad.

Se añadió sobre la columna el sobrenadante de la mezcla de bacterias, que eluyó por gravedad y se añadieron 10 mL de Buffer MW para lavar.

Se retiró la columna de la probeta y se dispuso en un *corning* de 50 mL. Se añadieron 5 mL de Buffer ME precalentado a 50°C.

Se retuvo el contenido del *corning* y se añadieron 3.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente. Esto provocó la precipitación del ADN. Se mezcló bien con la pipeta (o invirtiendo el *corning*) y se dejó reposar 2 minutos.

Se centrifugó a 16.000 G durante 35 minutos a 4°C. Luego se descartó el sobrenadante y se retuvo el pellet.

Se añadieron 2 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 16.000 G a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Se descartó el etanol y se dejó secar para eliminarlo por completo. Se resuspendió el pellet con unos 100 μ L de agua (RNAsa *free water*).

Se midió con NanoDrop la concentración de ADN.

Reactivos y cultivo celular

Las líneas celulares se obtuvieron de la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC, American Type Culture Collection). Los medios de cultivo

celular se adquirieron de Gibco (Grand Island, Nueva York). El suero fetal bovino (FBS, *fetal bovine serum*) fue un producto adquirido de Harlan-Seralab (Belton, Reino Unido). Los suplementos y otros compuestos químicos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los materiales plásticos para el cultivo celular fueron suministrados por Thermo Scientific BioLite.

Los plásmidos evaluados estaban almacenados a -20°C hasta su uso. Las líneas celulares empleadas se mantuvieron en el medio de cultivo basal DMEM, el cual contiene glucosa (1 g/L), glutamina (2 mM), penicilina (50 UI/mL), estreptomina (50 $\mu\text{g/mL}$) y anfotericina B (1.25 $\mu\text{g/mL}$), suplementado con FBS al 10%.

Co-precipitado con fosfato de calcio

Este método de transfección se basa en la propiedad del ADN para formar precipitados con ciertas sales. Los pasos a seguir se detallan a continuación:

1) Preparación de las disoluciones A y B:

Solución A: 250 mM cloruro de calcio en agua destilada.

Solución B: 1.4 mM fosfato (sal sódica de H_2PO_4^- o HPO_4^{2-}); 140 mM NaCl; 50 mM *buffer* HEPES. Ajustar pH de la solución B a 7.05. El pH es un punto crucial en la transfección, ya que dependiendo de este se obtiene una eficiencia más alta o más baja.

2) Preparación del ADN: formación del complejo con el fosfato de calcio.

Por cada mL de cultivo se necesitan:

- 2.5 μg ADN.
- 50 μL Solución A.
- 50 μL Solución B.

3) Se añade el volumen de ADN necesario a la solución A. Mezclar bien.

4) Se añade, gota a gota, la solución B a la mezcla de la solución A + ADN.

5) La mezcla de solución A + ADN + Solución B se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.

6) Tras la incubación el color de la solución se vuelve más translúcido, al formarse el precipitado. Se añade la mezcla final al cultivo celular.

7) Se incuba durante 24 horas a 37°C .

- Se observa en el microscopio. Si se ha formado el precipitado y parece no ser tóxico para las células, no hace falta cambiar el medio.

- Si hay precipitado y parece tóxico para las células, se realiza un lavado con PBS 1x y se añade medio nuevo.

Determinación del ciclo celular por citometría de flujo

Se sembraron 0.06×10^6 células de las líneas HEK-293, HeLa y MCF-7 en placas de 24 pocillos y, tras 24 horas de incubación (37°C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda), se llevó a cabo la transfección con los plásmidos silenciadores sh*IRS1* y sh*IRS2*, así como con el plásmido control. Las células fueron fijadas, tratadas con RNasa y marcadas con yoduro de propidio a diferentes tiempos tras la transfección (24, 44-48, 72 y 96 horas), siguiendo las instrucciones del kit BD Cycletest™ DNA. El análisis de resultados se llevó a cabo con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6.

Cuantificación de ERK/pERK y Akt/pAkt por citometría de flujo

Se sembraron 0.06×10^6 células de la línea MCF-7 en placas de 24 pocillos y, tras 24 horas de incubación (37°C, 5% CO₂ en atmósfera húmeda), se llevó a cabo la transfección con los plásmidos sh*IRS1* y sh*IRS2*, así como con el plásmido control. Pasadas 48, 72 y 96 horas de la transfección, las células fueron recogidas, fijadas, tratadas con Triton™ X-100 0.5% y, finalmente, marcadas con los anticuerpos PE Mouse anti-MEK1 Invitrogen 560099, AlexaFluor(R)647 Mouse anti-MEK1 (pS218)/MEK2 (pS222) Invitrogen 562460, PE Mouse anti-Akt1 Invitrogen 560049 y AlexaFluor(R)647 Mouse anti-Akt (pS473) Invitrogen 560343. El análisis de resultados se llevó a cabo con un citómetro de flujo BD Accuri™ C6.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media \pm SEM. Los análisis estadísticos se realizaron empleando Microsoft Excel y GraphPad Prism®.

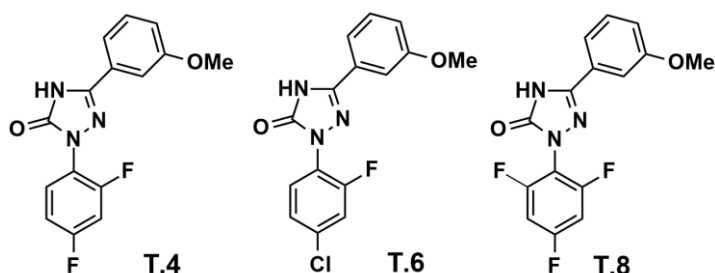
6. CONCLUSIONES GENERALES

6. CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo general que nos planteamos al inicio de Tesis Doctoral se ha conseguido puesto que hemos sido capaces de identificar nuevas entidades moleculares con acción selectiva frente a dianas biológicas anticáncer relacionadas con la senescencia (hTERT y c-Myc), la angiogénesis (VEGF y VEGFR-2) y la evasión del sistema inmunológico (PD-L1).

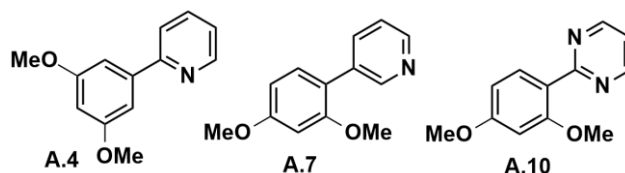
En concreto hemos descrito una serie de unidades estructurales que permiten desarrollar pequeñas moléculas orgánicas dirigidas selectivamente hacia determinadas dianas anticáncer, como son hTERT, c-MYC, PD-L1 y VEGF/VEGFR-2. De manera que:

A.1. Las moléculas con unidades de 2,4-diariltriazolona sirven como puntos de partida para el desarrollo de agentes anticáncer con actividad antitelomerasa e inmunomoduladora. La evaluación biológica de diferentes derivados de tipo triazolona (**Familia 1**) ha permitido determinar que, en general, son capaces de disminuir la viabilidad de las células tumorales en el rango micromolar bajo sin que afecten a las células no tumorales. Esto permite establecer que este tipo de moléculas son capaces de inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerosas. De los compuestos estudiados los derivados **T.4** y **T.8** son los más selectivos hacia las células tumorales. Además, estas moléculas tienen un efecto epigenético ya que son capaces de modular la expresión de uno o varios oncogenes (hTERT, c-Myc y PD-L1). En este sentido **T.6** es uno de los derivados más activos y, por tanto, el que consideramos como mejor candidato para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas anticáncer.

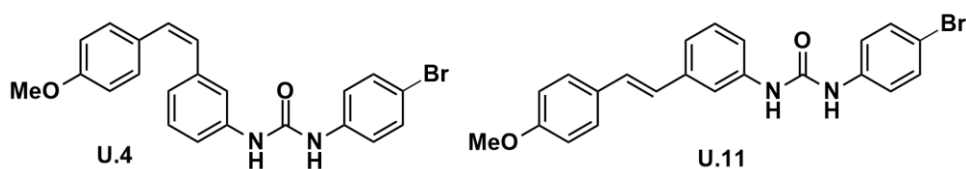


A.2. Las moléculas con unidades de tipo biarilo como potenciales agentes antitelomerasa y antiangiogénicos (**Familia 2**). Este tipo de estructuras presentan una moderada acción sobre la viabilidad celular con valores de IC₅₀ en el rango micromolar. El estudio sobre su efecto sobre la expresión de los genes *hTERT*, *c-Myc* y *VEGF* demostró que estos compuestos son capaces

de regular a la baja los genes diana siendo los más activos los derivados **A.4**, **A.7** y **A.10**. Además, de este efecto epigenético, los compuestos señalados son capaces, también, de modular la expresión de la proteína c-Myc y la secreción de VEGF al medio extracelular.



A.3. Las moléculas con estructura de tipo estililurea como potenciales agentes antiangiogénicos e inmunomodulares (**Familia 3**). El estudio biológico se realizó sobre entidades de tipo (*E*), (*Z*)-estirilurea y también sobre entidades de tipo fenetilurea. En el caso del efecto sobre la viabilidad celular concluimos que los derivados de tipo (*E*)-estirilurea son los más activos, siendo capaces de inhibir el crecimiento de las células tumorales en el rango nanomolar. Por otro lado, los compuestos que presentaron mayor actividad antiangiogénica fueron **U.4** y **U.11**, ambos con subunidades de *p*-bromofenilurea, siendo capaces de inhibir la formación de nuevas redes vasculares formadas por HMEC-1. Además, estos compuestos señalados inhiben la expresión tanto de la proteína PD-L1 como c-Myc. Finalmente, el estudio del efecto de los productos en la proliferación de células cancerosas, cultivadas en presencia de células T Jurkat que expresan PD-1, demostró que estas entidades son capaces de reducir la viabilidad de las células tumorales sin afectar a la viabilidad de las células defensivas. En este caso, destaca la actividad del compuesto **U.4** que reduce hasta un 9% la viabilidad de las células tumorales a dosis inferiores a las del valor del IC₅₀ determinado en el monocultivo tumoral.



B.1. Por otro lado, la presente Tesis Doctoral ha permitido abrir una nueva línea de investigación enfocada al desarrollo de nuevos biofármacos dirigidos a dianas anticáncer. Así pues, hemos desarrollado una serie de plásmidos silenciadores de unas nuevas dianas anticáncer como son los IRS (IRS1 y IRS2) que podrían servir como potenciales biofármacos en terapias

anticáncer. Y la evaluación biológica de los mismos ha permitido establecer que:

El plásmido silenciador de IRS1, pSM155-CMV-sh-IRS1-GFP, es capaz de reducir la viabilidad de las células tumorales siendo su efecto máximo a partir de las 96 horas desde la transfección, mientras que el plásmido silenciador de IRS2, pSM155-CMV-sh IRS2 (hu2)-GFP, reduce la viabilidad celular después de 72 horas desde la transfección, pero en menor grado que el IRS1. Ninguno de los plásmidos afecta al ciclo celular. Por otra parte, se ha demostrado que el plásmido pSM155-CMV-sh IRS1-GFP reduce la fosforilación de ERK y Akt principalmente a las 48 horas tras la transfección, mientras que los plásmidos pSM155-CMV-sh IRS2-GFP afectan sólo a la vía Akt y de forma más moderada que plásmido silenciador de IRS1.

7. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

7. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

7.1. Comunicaciones a congresos

- Póster: “Biological evaluation of stylbene derivatives as PD-L1 inhibitors”, Martín-Beltrán, C.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A.; 54th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT), Estrasburgo (Francia), julio **2018**.
- Póster: “Biological evaluation of stylbene derivatives as PD-L1 inhibitors”, Martín-Beltrán, C.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A.; XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (RSEQ), Sitges (España), junio **2017**.

7.2. Publicaciones

- “Arylpyridines, arylpyrimidines and related compounds as potential modulator agents of the VEGF, hTERT and c-Myc oncogenes” Martín-Beltrán, C.; Sánchez-Peris, M.; Conesa-Milián, L., Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J. A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2019**, *27*, 880-887.
- “New N,C-Diaryl-1,2,4-triazol-3-ones: Synthesis and Evaluation as Anticancer Agents” Santa María, D.; Claramunt, R. M.; Elguero, J.; Carda, M.; Falomir, E.; Martín-Beltrán, C. *Medicinal Chemistry* **2019**, *15*, 360-372.
- “Aryl Urea Based Scaffolds for Multitarget Drug Discovery in Anticancer Immunotherapies” Martín-Beltrán, C.; Gil-Edo, R.; Hernández-Ribelles, G.; Agut, R.; Marí-Mezquita, P.; Carda, M.; Falomir, E. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 337.