



FACULTAT
**DE CIÈNCIES
I TECNOLOGIA**

UVIC | UVIC·UCC

Treball Fi de Grau

*Estudi del mecanisme d'acció de
Yondelis[®] a nivell molecular*

Mireia Autonell Gelabert

Grau en Biotecnologia

Tutor/a: Jordi Martínez Serra i Joan Bertran Comulada

Avalador/a: Joan Bertran Comulada

Vic, 6 de 2019

RESUM

Títol: Estudi del mecanisme d'acció de Yondelis a nivell molecular

Paraules clau: Trabectedin, Yondelis, apoptosi, cicle cel·lular, calci intracel·lular

Autora: Mireia Autonell Gelabert

Tutors: Joan Bertran Comulada (UVIC) i Jordi Martínez (IdisBa)

Data: Juny 2019

Trabectedin (ecteinascidina 743/ET-743), anomenat comercialment Yondelis, és un compost químic actualment aprovat en casi 80 països que s'utilitza com a fàrmac quimioteràpic pel tractament de sarcoma de teixit tous (STT) i càncer d'ovari. Els mecanismes d'acció d'aquest fàrmac s'han atribuït a la capacitat d'interaccionar amb el solc menor del DNA provocant així una cascada d'esdeveniments que afecten els processos de transcripció, replicació i reparació del DNA.

El present treball està enfocat en l'estudi detallat dels mecanismes d'acció del fàrmac d'interès, que fins el dia d'avui segueixen sense investigar-se. Es pretén determinar les vies moleculars per les quals Yondelis altera les cèl·lules i indueix l'apoptosi.

Al llarg de l'estudi es demostra que el compost provoca alteracions de la concentració intracel·lular del catió calci a diferents dosis. Addicionalment, es mostra la ineficàcia de Yondelis sobre la línia cel·lular A549 (adenocarcinoma de pulmó humà) per produir la mort cel·lular en els cultius tractats amb dosis terapèutiques i també, que la utilització d'antagonistes dels receptors NMDA que bloquegen l'entrada del Ca^{2+} extracel·lular reverteixen l'apoptosi induïda per Yondelis.

Els resultats obtinguts suggereixen que el Ca^{2+} i els seus canals iònics són claus en les propietats proapoptòtiques del fàrmac d'interès i que la seva concentració és dependent de les dosis de fàrmac administrades. A més, l'eficàcia del fàrmac és veu qüestionada per les limitacions antiproliferatives en determinades dosis i paral·lelament, per l'augment del cicle cel·lular.

Comprendre i conèixer quins són realment els mecanismes d'acció del fàrmac és crucial per esbrinar els efectes secundaris que pot causar, determinar en quines dosis i en quins tipus de tumors es pot aplicar i quins pacients són bons candidats per beneficiar-se dels seus efectes.

ABSTRACT

Title: Study of the mechanism of action of Yondelis at a molecular level

Key words: Trabectedin, Yondelis, apoptosis, cell cycle, intracellular calcium

Author: Mireia Autonell Gelabert

Tutors: Joan Bertran Comulada (UVic) and Jordi Martínez Serra (IdISba)

Date: June 2019

Trabectedin (ecteinascidin 743 / ET-743), commercially called Yondelis, is a chemical compound currently approved in almost 80 countries that is used as a chemotherapeutic drug for the treatment of soft tissue sarcoma (STT) and ovarian cancer. The mechanisms of action of this drug have been attributed to the ability to interact with the minor groove of DNA, thus causing a cascade of events that affect the processes of DNA transcription, replication and repair.

The present work focuses on the detailed study of the mechanisms of action of this drug, which have not yet been investigated. The aim is to define the molecular pathways by which Yondelis alters the cells and induces apoptosis.

As has been observed throughout this study, the compound of interest causes alterations of the intracellular concentration of calcium cation at different doses. In addition, it shows the inefficacy of Yondelis in the cell line A549 (Human lung adenocarcinoma epithelial cell line) to produce the cellular death in the cultures treated in therapeutic doses. Finally, it is determined that the antagonists of the NMDA receptors that block the Ca^{2+} cell inflow invest the Yondelis-induced apoptosis.

The results obtained suggest that Ca^{2+} and its ion channels are key in the proapoptotic properties of Yondelis and its concentration is dependent on the doses of drug administered. In addition, the efficacy of the drug is questioned by the antiproliferative limitations in certain doses and in parallel, by the increase of the cell cycle.

Understanding and knowing which are the mechanisms of action of the drug is crucial to find out the side effects it can cause, determine in what types of tumours it can be applied and which patients are good candidates to benefit from its effects.

ÍNDIX

RESUM	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDIX.....	4
1. INTRODUCCIÓ.....	6
1.1 Característiques generals del Yondelis.....	6
1.2 Cicle cel·lular.....	8
1.3 Calci; segon missatger	10
1.3.1 Receptors NMDA	10
1.3.2 Vies de senyalització del calci	13
1.4 Apoptosis cel·lular	15
1.4.1 Vies de senyalització d'apoptosis.....	17
1.4.1.1 Via intrínseca	17
1.4.1.2 Via extrínseca	19
1.4.1.3 Vies de supervivència cel·lular	20
1.5 Apoptosis cel·lular induïda per Yondelis	22
2. OBJECTIUS	24
3. MATERIALS I MÈTODES	25
3.1 Cultius cel·lulars	25
3.2 Estudis farmacològics i de proliferació cel·lular	25
3.3 Extracció de proteïnes i Western Blott	25
3.4 Obtenció dels nivells de Ca ²⁺ intracel·lulars	26
3.4.1 Espectrofotòmetre	26

4. RESULTATS	27
4.1 Yondelis altera proteïnes que participen en el cicle cel·lular	27
4.2 Yondelis provoca apoptosi cel·lular	29
4.3 Yondelis provoca l'alteració de les concentracions del calci intracel·lular...30	
4.4 Dextrometorfà inhibeix l'apoptosi induïda per Yondelis	32
5. DISCUSSIÓ	33
6. CONCLUSIONS	35
7. BIBLIOGRAFIA	36

1. INTRODUCCIÓ

1.1 CARACTERÍSTIQUES GENERALS DEL YONDELIS

Yondelis és un fàrmac contra el càncer que conté com a principi actiu la Trabectedina, la qual és una versió sintètica d'una substància química aïllada inicialment d'un invertebrat del Mar Carib anomenat *Ecteinascidia turbinata*. Des de 2007 representa el primer fàrmac anticancerigen d'origen marí que ha obtingut autorització de comercialització de l'Agència Europea de Medicaments (EM) i en molts altres països del món pel tractament de pacients amb Sarcoma Avançat de Teixits Tous, tipus de càncer poc freqüent que comença als teixits que connecten, sostenen i recobreixen altres estructures del cos, després del fracàs d'altres fàrmacs anticancerigens com les antraciclines i l'efosfamida, o per aquells pacients que no són aptes per rebre aquests agents.

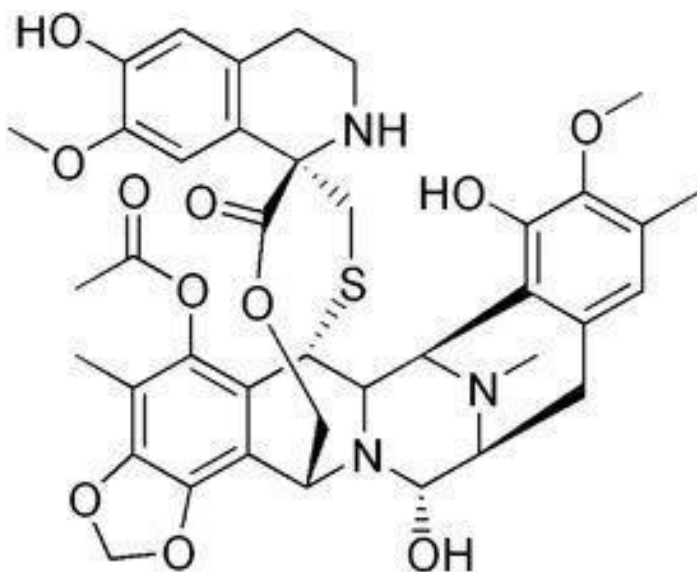


Figura 1: Estructura molecular de Yondelis.

El mecanisme d'acció d'aquest compost és més complex que el dels agents citotòxics convencionals. La seva citotoxicitat és causada a partir de la combinació de múltiples mecanismes d'acció. És capaç d'unir-se al solc petit del DNA sobresortint fora de l'hèlix del DNA fet que li permet unir-se a diverses molècules d'unió al DNA com els factors de transcripció i reparació. La unió al solc menor del DNA induïx una curvatura de l'hèlix cap al solc major que provoca el dany al DNA que és reconegut pels sistemes

de reparació per escissió de nucleòtids (NER, per les seves sigles en anglès) i, a conseqüència, es produeix la formació del complex ADN-trabectedin-proteïna (Takebayashi et al 2001; Mascilina et al 2014). Entre aquestes proteïnes, es troba l'endonucleasa XPG, que forma el complex ternari DNA-Trabectedin -XPG provocant ruptures de cadena simple i afectant dos processos cel·lulars molt importants; la transcripció i la replicació del DNA. (Zewail-Foote et al (1999); Pommier et al (1996).

Les ruptures de simple cadena impedeixen que es formi la forquilla de replicació del DNA. A conseqüència, els mecanismes de recombinació homòloga a l'intentar solucionar el problema provoquen ruptures de doble cadena que indueixen al bloqueig del cicle cel·lular i la inducció de l'apoptosi independent de p53. (Takebayashi et al. 2001; Jin et al 2000; Erba et al 2001). El complex terciari també altera el procés d'incitació de la transcripció impedit l'obertura de la doble hèlix, alterant així la funció de la proteïna XPG com a co-factor d'aquest procés (Feuerhahn S. et al 2011).

Gràcies a aquest mecanisme únic i innovador Yondelis pot evitar el creixement d'alguns tipus de càncers d'acord amb la seva activitat antiproliferativa, tan *in vitro*, en diverses línies cel·lulars derivades de tumors humans com càncer de mama, càncer de pulmó de cèl·lules no petites, melanoma i leucèmia (Martínez et al.2011) com *in vivo*, en sarcoma i càncer d'ovari (Carter et al 2010) però, cal remarcar que necessita un sistema NER funcional perquè la citotoxicitat sigui eficient.

1.2 CICLE CELULAR

Trabectedin actua sobre la vida de les cèl·lules malignes alterant el seu cicle cel·lular, procés complex que involucra nombroses proteïnes reguladores que dirigeixen la cèl·lula a través d'una successió d'etapes (G1, S, G2 i M) que culminen en la mitosi i la producció de dues cèl·lules filles. Les funcions cel·lulars normals, el desenvolupament i la prevenció de malalties depenen del manteniment de l'estabilitat del genoma. Per tal d'assegurar la transmissió precisa de la informació genètica existeixen mecanismes del cicle cel·lular que coordinen la replicació del DNA i la mitosi. La cèl·lula pot bloquejar la seva divisió a causa de dos tipus de factors: interns i externs. Els factors interns impliquen dany al DNA, mida cel·lular insuficient i falta de molècules per la següent fase. Qualsevol d'aquests errors impedeix que la cèl·lula avanci en el cicle.

La fase G1 és el període des que la cèl·lula neix fins que comença la fase S (síntesis de DNA). Durant aquesta etapa la cèl·lula és sensible a condicions externes i internes segons les quals decideix si continuar en el cicle cel·lular, quedar en senescència (fase G0) o en el pitjor cas, programar la mort per apoptosi. Si la cèl·lula decideix seguir endavant en el cicle cel·lular, ha de passar uns punts de control constituïts per uns enzims anomenats, quinases dependents de ciclines (CDks). Aquestes molècules necessiten estar unides a les proteïnes ciclines i ser fosforilades per estar actives. Una vegada activades són responsables de reprimir els inhibidors del cicle cel·lular, permetent que el cicle progressi. Entre les 16 ciclines existents les més importants per la progressió del cicle són la A, B, D i E.

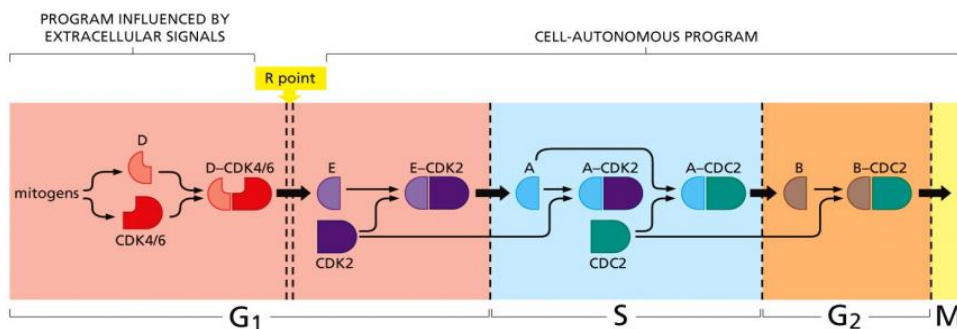


Figure 8.12 The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Figura 2: Esquema de les diferents ciclines implicades en el cicle cel·lular. Esquema adquirit de "The biology of Cancer".

El complex Cdk4/ciclina D actua fosforilant, i per tant, inhibint el Retinoblastoma (Rb), factor de transcripció guardià del punt de restricció R, que quan està actiu impedeix que es transcrivin gens necessaris per entrar a la fase S. Per arribar aquest punt, la cèl·lula és dependent dels diferents mitògens, però una vegada s'inicia la replicació ja no hi ha marxa enrere i la cèl·lula es dividirà independentment dels senyals. Aquests mitògens actuen activant el receptor cel·lular que activarà les proteïnes Ras-GTPases afavorint l'expressió de factors de transcripció com c-MYC, aquests, al mateix

temps, afavoreixen l'expressió de la ciclina D que activa les CDKs per fosforilar RB alliberant-lo del factor de transcripció E2F permetent la transcripció de gens crítics per la progressió de les cèl·lules de la fase G1 a la fase S (Figura 3).

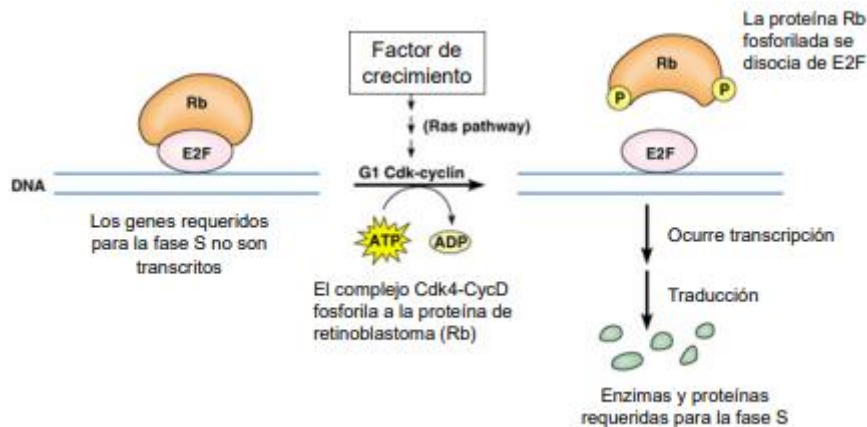


Figura 3: Esquema de la regulació del retinoblastoma. Esquema adquirit de depa.fquim.unam.mx.

Paral·lelament, aquests complexos estan regulats per moltes proteïnes, entre elles p53, supressor tumoral anomenat “guardià del genoma”. Treballa a múltiples nivells per assegurar que les cèl·lules amb dany al DNA no ho transmetin a la descendència a través de la divisió cel·lular. En primer lloc, com a factor de transcripció indueix l'expressió de la proteïna p21, un inhibidor de Cdk (CKI) que bloqueja l'activitat del complex Cdk-ciclina evitant que la cèl·lula passi de G1 a la fase S. En segon lloc, activa els enzims de reparació del DNA i finalment, si aquest no és reparable, activarà la mort cel·lular programada. És el gen que de tot el genoma es troba mutat amb major freqüència en els càncers ja que quan està defectuós o absent, les mutacions cel·lulars s'acumulen ràpidament.

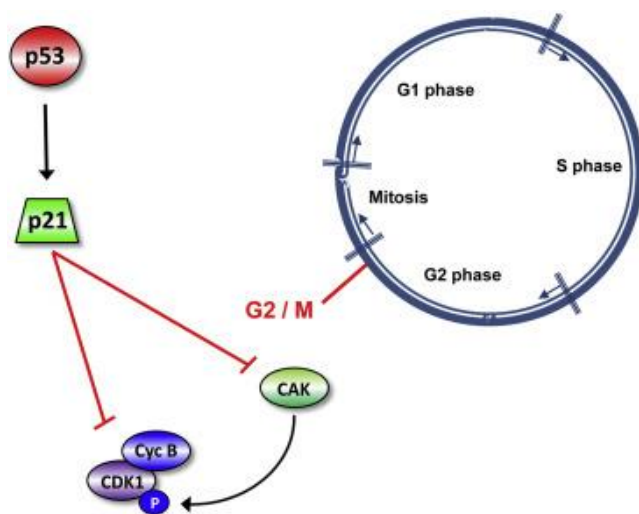


Figura 4: Regulació del factor de transcripció p53 sobre el cicle cel·lular. Imatge adquirida de [Kulaberoglu et al \(2016\)](#).

1.3 CALCI; SEGON MISSATGER

El calci és un segon missatger que com que no pot ser degradat, les cèl·lules han de regular estrictament la seva concentració cel·lular. Les principals fonts de Ca^{2+} són el medi extracel·lular i el reticle endoplasmàtic (RE); orgànel·lular que és anomenat reticle sarcoplasmàtic en les cèl·lules musculars (RS). Aquest catió està implicat en molts processos cel·lulars amb implicacions fisiològiques i patològiques. (Rizuto et al 2003; Monteith et al 2012). L'excessiva recaptació en la mitocondria pot generar un estrès oxidatiu que dona lloc a senyals apoptòtiques (Takeuchi et al 2014) i la sobrecàrrega d'aquest ha estat relacionada amb el dany cel·lular en molts teixits (Parekh et al 2010). Tenint en compte que el Ca^{2+} és un activador d'alguns enzims que participen en el catabolisme d'una gran varietat de biomolècules es suposa que un increment sostingut de la concentració d'aquest ió pot resultar en la degradació incontrolada de macromolècules important en el manteniment de l'estructura i funció de la cèl·lula (Machaca et al 2010). Així doncs, és imprescindible un control estricte del nivell de calci citosòlic per la supervivència cel·lular i per ajustar les funcions de les cèl·lules dependents d'aquest ió.

Les cèl·lules canceroses s'associen a canvis importants en l'expressió dels canals i bombes de calci (Monteith et al 2012) atesa una relació directa entre els senyals encarregats de l'entrada de Ca^{2+} al citosol i la resposta cel·lular enfront aquesta entrada (Hogan 2003 (Wang Y et al. 2017)). Els augments de calci intracel·lular són determinats en resposta als fàrmacs que indueixen l'apoptosi, ja que el Ca^{2+} realitza un paper importat durant la progressió del cicle cel·lular, sobretot en els passos inicials de G_1 i en la transició G_1/S i G_2/M . La disminució del calci en el RE produeix estrès que afecta les seves funcions alterant la síntesi, plegament i transport de proteïnes provocant l'activació de l'apoptosi a través de l'activació proteasa caspasa 12 i la inducció del gen CHOP anomenat també DDIT3 (de les seves sigles en anglès "DNA damage-inducible transcript 3"). Aquest últim és una proteïna que juga un paper important en la regulació de processos relacionats amb la proliferació i diferenciació cel·lular, capaç de parar el creixement cel·lular i provocar dany en el DNA (Wang XZ et al 1996). Per altra banda, la fosfolipasa A2, dependent de calci i calmodulina, al ser activada per altes concentracions de calci pot degradar la membrana de forma excessiva i generar metabòlits tòxics que provocaran la mort cel·lular (Figura 6).

1.3.1 Receptors NMDA

L'augment del calci intracel·lular està regulada per l'activació del receptor NMDA, receptor inotròpic del glutamat, que permeten el flux d'aquest ió cap a l'interior cel·lular. S'anomena així perquè la molècula agonista N-metil-D-aspartat (NMDA) s'uneix selectivament a ell i no a altres receptors de glutamat (AMPA i Kinato). És una proteïna molt complexa i altament regulada que s'activa quan el glutamat i la glicina s'uneixen a ella en presència d'una diferència de potencial causada pels ions Mg^{2+} . La unió permet l'obertura del canal iònic per on els ions carregats positivament (Na^+ , Ca^{2+}) penetren la membrana cel·lular i els ions K^+ es desplacen cap a fora de la cèl·lula. Són estructures macromoleculares que es formen per combinacions de diferents subunitats: NMDAR1(NR1), NMDAR2 (NR2 i NR3), la seva estructura amb conjunt forma un canal iònic permeable a Ca^{2+} . La NR1 està codificada per un únic gen però el transcrit pot generar almenys 8 isoformes diferents. En canvi, per les subunitats de tipus NR2

existeixen quatre gens diferents que codifiquen per les subunitats NR2A, NR2C i NR2D. Normalment, els receptors NMDA es formen per heterotretàmers formats per dos dímers de les subunitats NR1 i NR2, on cada subunitat NR1 té un lloc d'unió per la glicina i les dues subunitats NR2 tenen un lloc d'unió pel glutamat cada una, és a dir, dos llocs d'unió per la glicina (S1) i dos per al glutamat (s2) en cada receptor (Flores-Soto et al 2012; Schüler T et al 2008) (Figura 5).

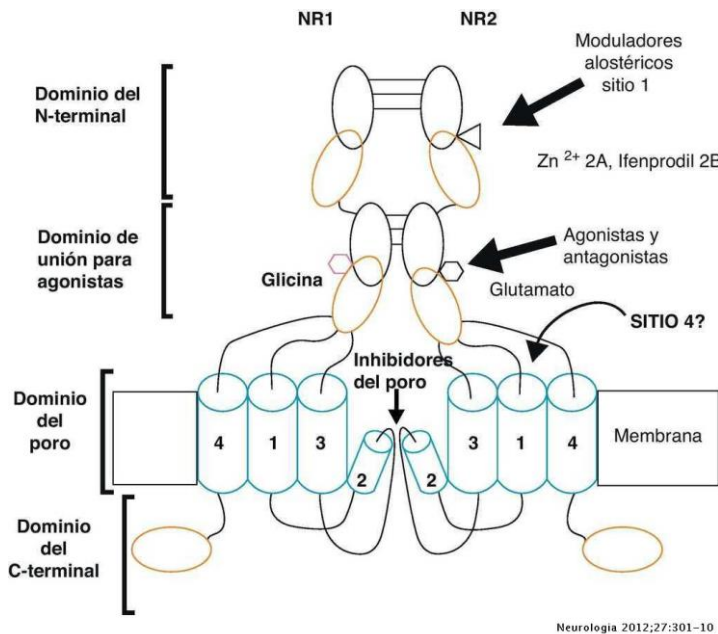


Figura 5: Estructura del receptor NMDA. Imatge adquirida de Flores-Soto et al 2011.

Els receptors NMDA estan involucrats en moltes funcions dintre del sistema nerviós; aprenentatge, memòria, desenvolupament, plasticitat sinàptica i la formació de la memòria (Cull-Candy et al 2004). Després d'un estímul intens o repetitiu, es produeix una despolarització que obri el canal iònic i es produeix l'entrada massiva del calci a l'interior cel·lular, el que activa diversos sistemes que donen lloc a canvis bioquímics i moleculars. L'activació dels receptors influeix en l'expressió de determinants gens (c-fos) i la síntesi de proteïnes específiques fos, considerades com a tercers missatgers que participen en la regulació de l'expressió de diferents gens. L'augment de la concentració intracel·lular del calci provoca l'activació de vies de senyalització intracel·lular relacionades amb la mort cel·lular apoptòtica com són: l'activació de diferents enzims dependent de calci (proteases, nucleases i fosfolipases) (Mattson MP et al 2000) i l'activació de la MAPKs (Kawasaki H. et al 1997).

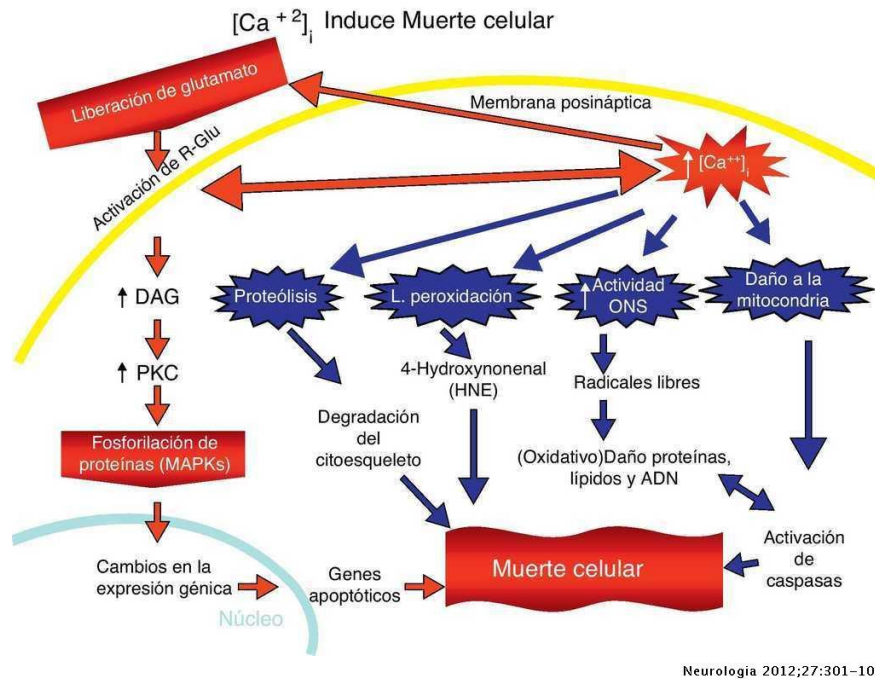


Figura 6: Implicacions del Ca²⁺ en la mort cel·lular. Imatge adquirida de Flores-Soto et al 2011.

El receptor NMDA té implicacions patològiques importants. Un desequilibri produït per la sobre activació del receptor provoca un augment de la concentració citoplasmàtica de Ca²⁺ i la generació d'espècies reactives d'oxigen, factors que tenen un paper molt rellevant en la mort cel·lular progressiva en certes malalties com l'epilèpsia, Alzheimer, Huntington, esquizofrènia i esclerosi lateral amiotròfica (ALS) (Cull-Candy et al 2001). Els antagonistes del receptor NDMA, entre els quals es troba el Dextrometorfà (DM) i el seu metabòlit (Dextrorfà), poder inactivar l'activitat d'aquests receptors i arribar a convertir-se en agents terapèutics pel tractament de malalties com les mencionades anteriorment (Low SJ et al 2004; Siu A et al 2007).

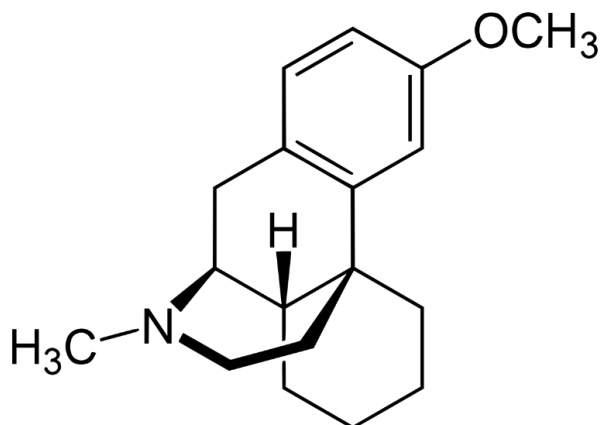


Figura 7: Estructura química del Dextrometorfà.

1.3.2 Vies de senyalització del calci

Entre les vies de senyalització intracel·lular regulades pel Ca^{2+} destaca la via PIP₂. La seva regulació consisteix en la unió del lligant al receptor acoblat a proteïna G (GPCR) de la membrana de la cèl·lula que provoca la hidrolització de PIP₂ donant lloc a dos missatgers secundaris: IP₃ i DAG. El primer es desplaça i s'uneix als receptors IP₃R del reticle endoplasmàtic provocant la sortida del calci emmagatzemat en el seu interior cap al citosol i l'activació d'altres senyals intracel·lulars com la via RAS-MAP quinasa i la via calcineurina-NFAT. Pel que fa DAG, juntament amb el calci alliberat, activa la PKC responsable d'activar RAS que activarà els factors de transcripció AP-2 (c-fos, c-jun) i NF- κ b implicats en la proliferació cel·lular. Al contrari, la disminució del calci en el reticle endoplasmàtic genera l'activació de la via d'entrada de Ca^{2+} extracel·lular, denominada SOCE que actua a través dels canals CRAC que depenen de dues molècules; STIM i Orai1. Una vegada es torna a incrementar el Ca^{2+} s'activen les vies de senyalització dels factors de transcripció responsables de la inducció de noves proteïnes (NFAT, NF- κ b, ERK) encarregades de les funcions de proliferació, diferenciació i resposta immunitària.

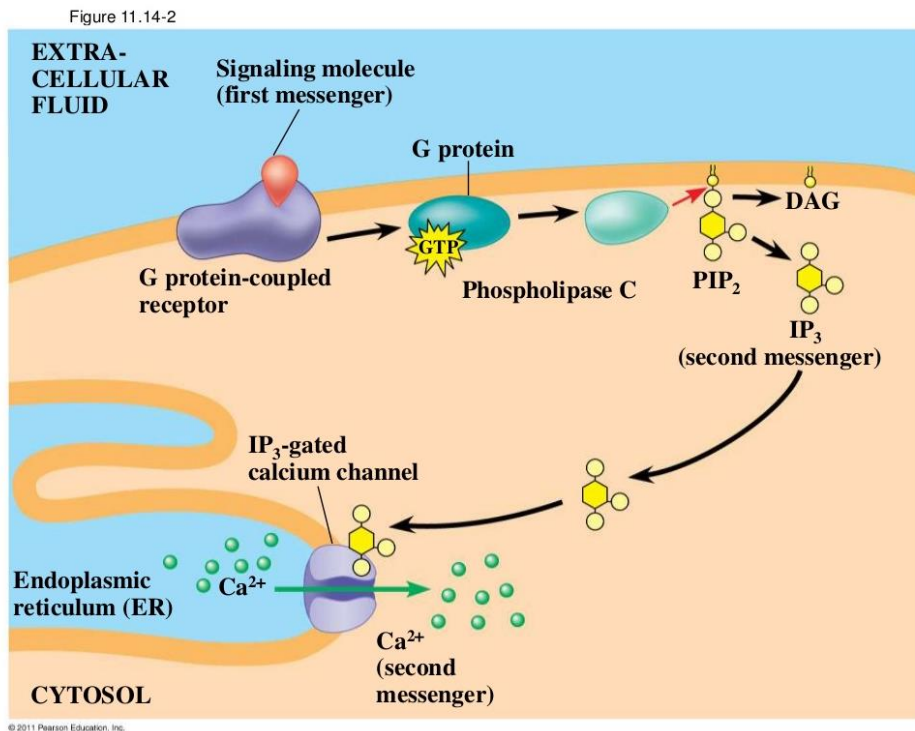


Figura 8: Regulació de la via PIP₂. Imatge adquirida de Pearson Education 2011.

Una altra via important controlada per l'homeòstasi del Ca^{2+} en la cèl·lula és la ruta de senyalització Ca^{2+} /Calcineurina/NFAT. Les proteïnes del factor nuclear de les cèl·lules T activades ("Nuclear factor of activated T-cells (NFAT)") són una família de factors de transcripció que fora del sistema immune tenen un paper important sobre el control del cicle cel·lular regulant la proteïna p21 (Horseley et al 2002).

NFAT fosforilat es troba en repòs en el citoplasma fins que es produeix una activació cel·lular per lligants que augmenten el calci intracel·lular que s'uneix a la calmodulina,

proteïna que transmet i modula els senyals del segon missatger a nivell citosòlic. La Calmodulina unida al calci s'activa patint un canvi conformacional que permet desfosforilar NFAT. Aleshores aquest últim és capaç de desplaçar-se al nucli actuant com a factors de transcripció de molts de gens dependents d'ell mentre es mantenen els senyals de calci. Quan el calci intracel·lular disminueix, la Calcineurina es desactiva i diferents quinases fosforilen el factor promovent així la seva exportació al citosol.

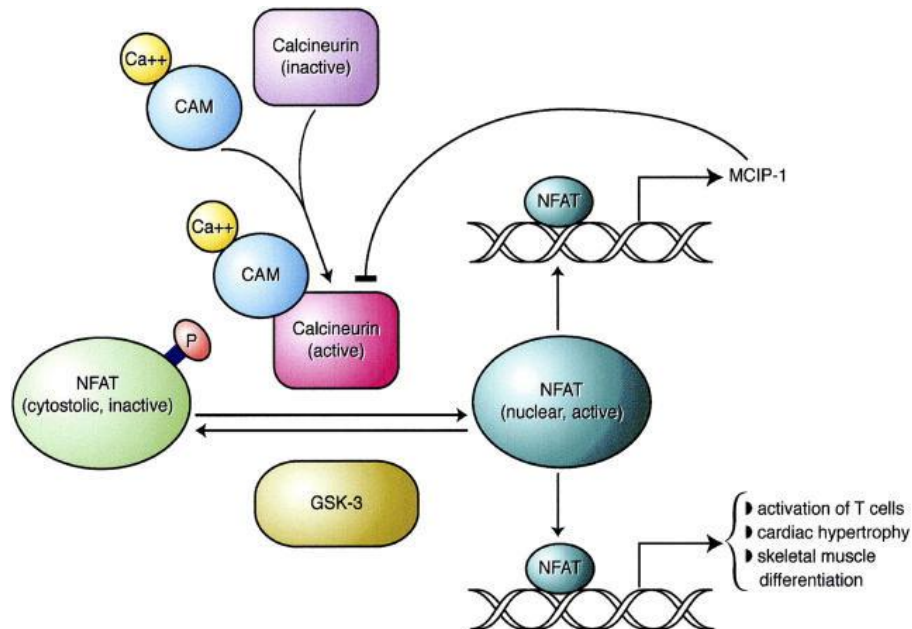


Figura 9: Regulació de la via Calcineurina/NFAT. Imatge adquirida de Mann KM et al (2004).

1.3 APOPTOSI CEL·LULAR

Yondelis actua provocant l'apoptosi cel·lular; procés programat que es caracteritza per l'alteració morfològica de les cèl·lules enfront un lesió aguda que causa la mort cel·lular. Quan el DNA està danyat de manera lleu, les proteïnes dels punts de control són activades per retardar la progressió a través del cicle cel·lular i guanyar temps perquè els factors de reparació del DNA puguin reparar el dany. En canvi, quan el dany en el DNA és més important, algunes de les proteïnes dels punts de control, com el p53, indueixen les cèl·lules a un procés de mort cel·lular, anomenat apoptosi. Perquè es produeixi, és necessari que una cel·lular deixi de rebre senyals de supervivència i comenci a rebre senyals de mort. Els senyals de mort que condueixen a l'apoptosi són múltiples, lesió del DNA, elevats nivells d'oxidants a l'interior cel·lular, fàrmacs quimioterapèutics, llum ultraviolada, estrès del reticle endoplasmàtic, produït per l'alteració de l'homeòstasi del calci o acumulació de proteïnes. Alguns dels canvis morfològics observats durant l'apoptosi són la fragmentació del DNA cromosòmic, la condensació de la cromatina, l'acidificació del citoplasma i la ruptura del nucli. Les cèl·lules apoptòtiques són reconegudes, fagocitades pels macròfags i retirades del teixit de forma eficaç. En adults, la mort cel·lular programada és la responsable de mantenir el nombre constant de cèl·lules en els teixits sotmesos a un continu recanvi cel·lular (Angosto, M. et al 2003). El procés d'apoptosis té un paper clau eliminant les cèl·lules innecessàries en els teixits durant el desenvolupament (Roseto A. et al 1999; Jacobson M. et al 1997). A més, és un mecanisme de defensa pel qual les cèl·lules alterades són eliminades de l'organisme. Les alteracions en l'apoptosi estan vinculades en la patogènesi de diferents malalties com en càncer, malalties cardiovasculars i moltes malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i el Parkinson (Braun F.K et al 2007; Thompson C. B. et al 1995). Per tant, l'estudi d'aquest mecanisme no tan sols és importat per entendre els mecanismes de regulació dels processos fisiològics normals, sinó també, per estudiar els mecanismes fisiopatològics de moltes malalties humanes.

L' apoptosi es duu a terme per dues classes de proteases especialitzades, les caspases iniciadores i les efectores. Les iniciadores s'activen després d'un estímul apoptòtic per autoprotòlisis, en canvi, les efectores s'activen dependent de les caspases iniciadores en una cascada amplificadora. L'activació de les caspases és una etapa crucial per l'activació d'aquest procés davant qualsevol estímul (Kaufmann SH. et al 2001).

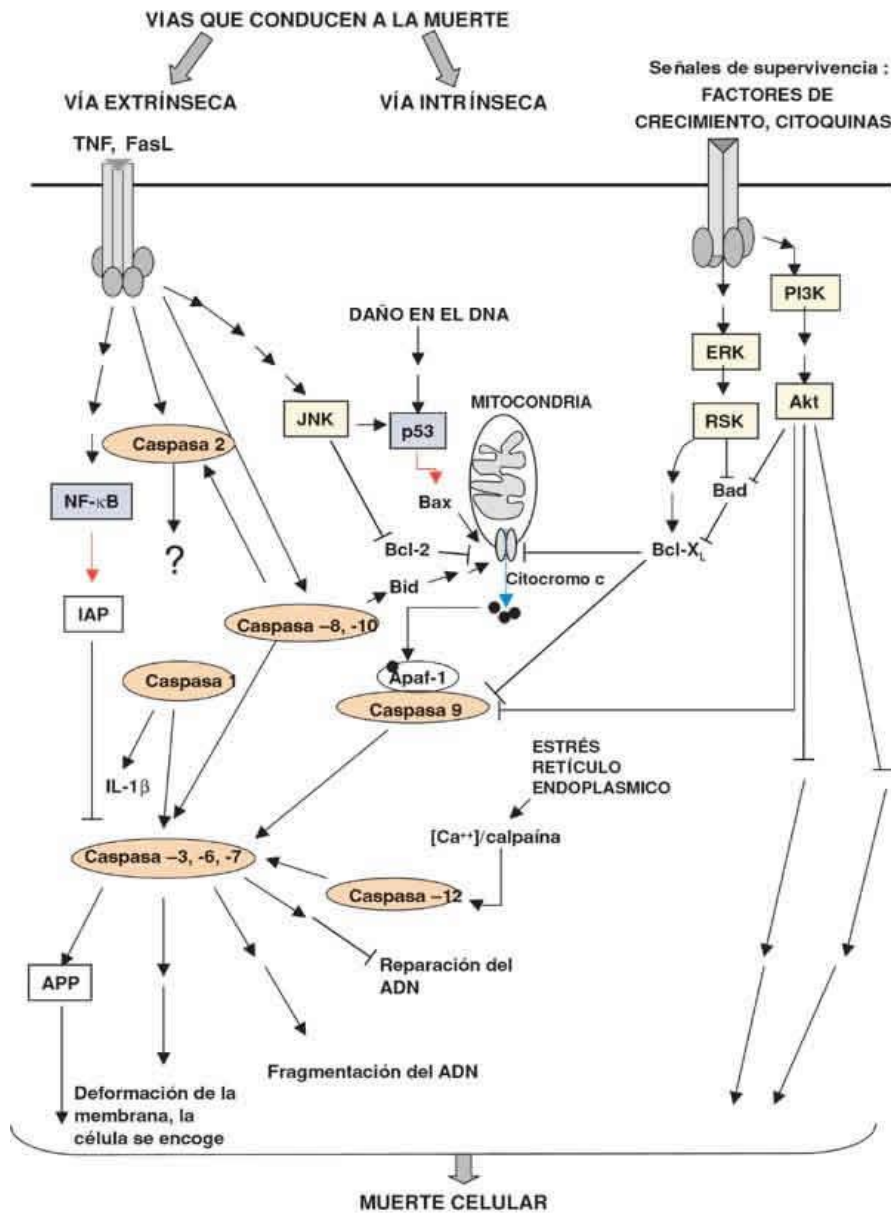


Figura 10: Esquema de les vies de senyalització de l'apoptosi o supervivència cel·lular.
 Imatge adquirida de García M. et al (2003).

1.4.1 Vies de senyalització que condueixen a l'apoptosi

En general, hi ha dues vies que provoquen l'activació d'aquestes caspases. La via extrínseca regulada pels lligands que s'uneixen als receptors en la superfície cel·lular i la intrínseca provocada per estrès cel·lular o lesió del DNA.

1.4.1.1 Via intrínseca

Es desencadena per alteracions en la permeabilitat mitocondrial facilitant la sortida de molècules proapoptòtiques d'aquest orgànel cap al citosol a causa de dany al DNA, estres oxidatiu, pèrdua de factor de supervivència cel·lular o gran quantitat de calci en el citosol. La via mitocondrial està regulada per proteïnes de la família del Bcl2 dividida en tres grups. El grup I (Bcl-2, Bcl-XL) són antiapoptòtiques. Les del grup II (Bax i Bak) i grup III (Bim i Bid) són proapoptòtiques (Zhang C.L et al 2003). Quan Bax i Bak s'uneixen a Bim, proteïna implicada en l'inici de l'apoptosi cel·lular i considerada el detector de l'estrès cel·lular més important, s'insereixen a la membrana mitocondrial externa provocant l'augment de la permeabilitat i facilitant la sortida del citocrom c al citoplasma. Aquest, s'uneix al factor 1 activador de la proteasa apoteòtica, APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) provocant-li un canvi conformacional que permet que la procaspasa 9 s'uneixi i així, es formi una molècula gran anomenada apoptosoma (Shakeri R et al 2017). La caspasa 9 genera proteòlisis de la caspasa 3 activant-la i generant la fragmentació del DNA i alguns canvis cel·lulars que indueixen a la mort. El factor inductor de l'apoptosi, AIF (apoptosis inducing factor) també és alliberat de la mitocòndria durant el procés i passa del citoplasma al nucli on condensa la cromatina, fragmenta el DNA, augmenta l'alliberació del citocrom C i potencia així la apoptosi independent de caspases (Daugas E et al 2000). La proteïna P53 també està present en les vies apoptòtiques. Té la capacitat d'activar la transcripció de gens proapoptòtics i desencadenar la mort programada reprimint gens antiapoptòtics promovent l'activació de les caspases (Polyak, K. et al 1997). En la mitocòndria, forma un complex amb la ciclofilina D; família de proteïnes que isomeritzen els enllaços peptídics des de l'estat trans al cis fet que facilita el plegament de la proteïna. La formació d'aquest complex provoca la interrupció de l'estructura mitocondrial facilitant l'alliberació del citocrom C (Chuaire N et al 2008). A més, P53 està implicada amb l'activació del apoptosoma activant l'expressió de APAF1. Aquest supressor tumoral també pot activar la via extrínseca d'apoptosi a l'estimular la transcripció del receptor Fas en la superfície cel·lular. Finalment pot regular la transcripció de la proteïna Bid que té la funció d'unir la via extrínseca amb la intrínseca (Haupt S. et al 2003).

VIA INTRÍNSECA: VÍA MITOCONDRIAL

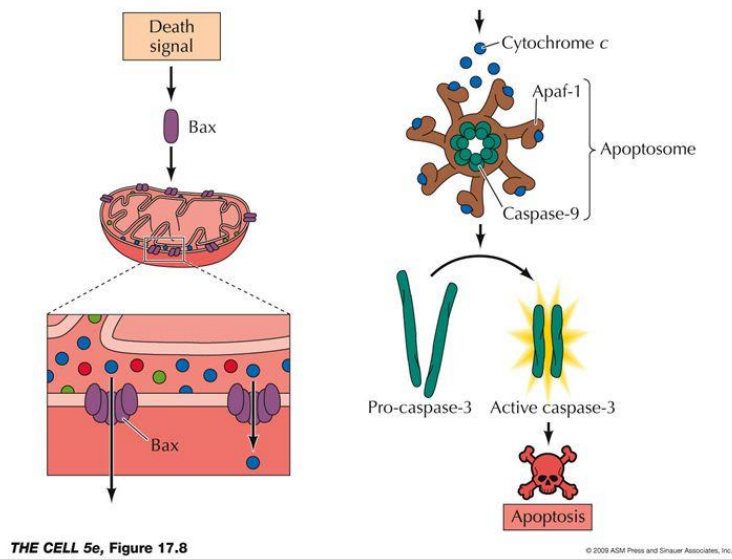


Figura 11: Via intrínseca o mitocondrial. Imatge adquirida de "Molecular Biology of the cell".

1.4.1.2 Via extrínseca

La unió del factor de necrosis tumoral (TNF) o altres membres semblants (FasL) al seu receptor, TNFR1 o Fas (CD95) respectivament, genera un senyal apoptòtica activant directament a les caspases iniciadores. Aquests receptors tenen un domini intracel·lular que recluta proteïnes adaptadores com el domini de mort associat al receptor TNF (TRADD) i el domini de mort associat a Fas (FADD). La unió del lligant al seu receptor provoca la formació d'un lloc d'unió per una proteïna adaptadora i es forma un complex lligant-receptor-adaptador conegut com a DISC (complex de senyalització que indueix la mort). Seguidament, el DISC activa la caspasa-8 (caspasa iniciadora) que, una vegada activada, desencadena l'activació d'altres caspases efectores provocant una cascada amplificadora d'activació responsable dels canvis morfològics i bioquímics que condueixen a l'apoptosi cel·lular com per exemple: la condensació de la cromatina, perduda de la integritat de la membrana, i finalment la formació de cossos apoteòtics i la fagocitosis de les cèl·lules apoteòtiques (Kaufmann SH et al 2001; Abbas AK et al 2012). Paral·lelament, la caspasa-8 pot activar el factor proapoptòtic Bid, normalment inactiu al citosol, transportant-lo a la mitocondria i alterant la membrana per alliberar el citocrom c al citosol (Kaufmann SH et al 2001).

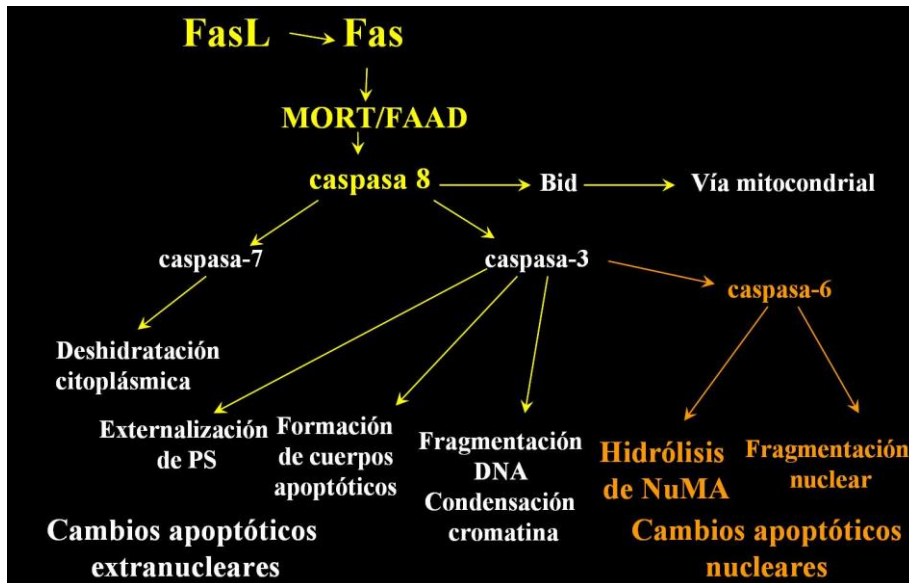


Figura 12: Regulació de la via apoptòtica Fas – Fas lligant. Imatge adquirida de <http://www3.uah.es/davididiaz/Apoptosis/viaextrinseca.htm>

1.4.1.3 Vies de supervivència cel·lular

Algunes vies de senyalització promouen la supervivència cel·lular mitjançant la inhibició de l'apoptosi.

- Via PI3K/Akt

És una de les principals vies de senyalització intracel·lular que promou la supervivència cel·lular. L'activació anormal de la via PI3K provoca l'alteració dels mecanismes del control del creixement, supervivència i proliferació cel·lular. Aquesta via comença quan l'enzim fosfoinositido-3quinasa (PI3K) és activat per la proteïna tirosina quinasa o per receptors associats a proteïnes G. Seguidament, PI3K fosforila PIP2 convertint-lo en un segon missatge (PIP3), el qual, corrent a baix condueix a l'activació de Akt que inactiva diversos factors proapoptòtics com BAD. Aquest, és un membre de la família Bcl-2 que indueix a la mort cel·lular estímulant l'alliberació del citocrom c des de la mitocòndria. Akt també pot bloquejar directament l'activació de les caspases mitjançant la fosforilació de la caspasa 9. També, activa mTOR, regulador central del creixement cel·lular, i inactiva el gen supressor de tumor p53 activant MDM2 que el regula negativament (Eduardo et al. 2009). Al contrari, aquesta via està regulada negativament per PTEN, proteïna supressora de tumors que s'expressa quan hi ha dany cel·lular. L'activitat fosfatasa de PTEN permet desfosforilar PI3P inhibint el procés d'activació de Akt. Així doncs, p53 es manté actiu per inhibir la proliferació cel·lular i promoure l'apoptosi (Cantley et al 1999). En conclusió, quan la via PI3K/Akt està activada permanentment permet que una cèl·lula resisteixi a l'apoptosi, sobrevisqui i proliferi.

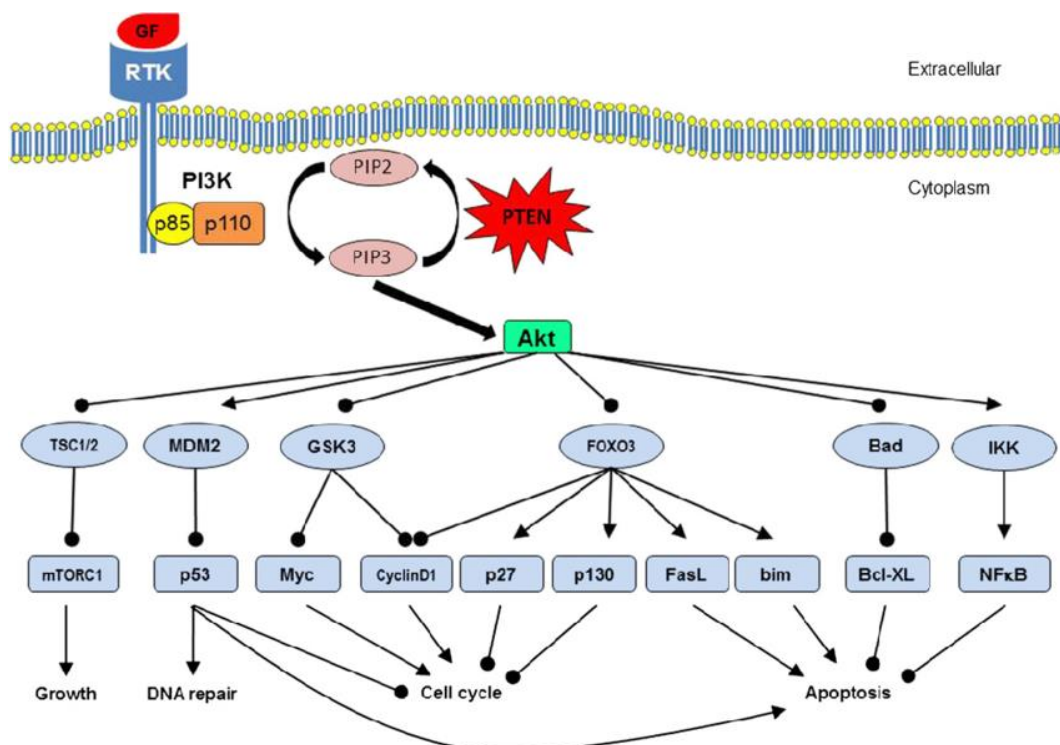


Figura 13: Regulació de la via AKT. Imatge adquirida de Govender D. et al (2012).

- Via Ras/RAF/MAPK

Una altra via de senyalització de factors de creixement és la via de les proteïnes quinases activades per mitògens. La unió del lligant a la tirosina quinasa del receptor dona lloc a la autofosforilació del receptor i la unió de proteïnes adaptadores que donaran lloc a l'activació de Ras (GTP-Ras) que inicia la cascada de les MAP quinases. GTP-Ras s'unirà a Raf, el qual s'uneix i fosforila MEK i finalment l'última quinasa del MAP, la ERK, penetra el nucli on fosforila diversos factors de transcripció com c-jun i c-fos que activen el creixement cel·lular.

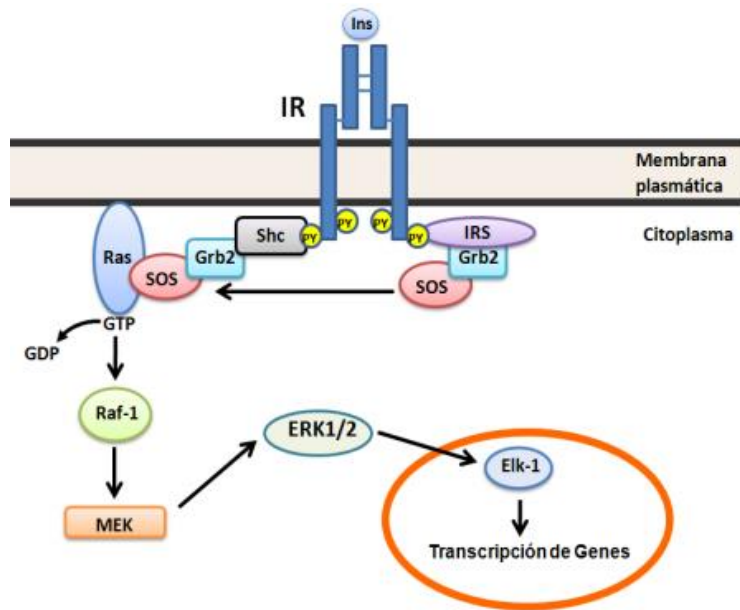


Figura 14: Via de senyalització MAPK. Figura adquirida de Olivares Reyes JA et al (2008).

1.5 APOPTOSI CEL·LULAR INDUÏDA PER YONDELIS

El mecanisme d'acció pel qual Trabectedin indueix l'apoptosi s'ha atribuït a la capacitat de provocar ruptures letals a les cadenes del DNA. L'estudi més detallat dels mecanismes moleculars ha determinat que Yondelis inhibeix la producció de mediadors proinflamatoris i modula el microambient tumoral (Germano G et al 2013; D'Incalci M et al 2014). S'ha demostrat que Trabectedin també inhibeix les citocines, les quimiocines, els factors de creixement i transcripció secretats pel les cèl·lules senescent en resposta al dany del DNA (Allevena et al 2005). La quimioteràpia provoca que els tumor sòlids adoptin un fenotip de senescència que els permet secretar diversos factors (SASP) a través d'un procés anomenat Therapy-induced senescence (TIS). La secreció d'aquests SASP afecta les mateixes cèl·lules senescent i a les cèl·lules veïnes canviant el microambient tumoral però Yondelis és capaç de contrarestar els efectes negatius del TIS disminuint significativament les concentracions de SAPS. La subunitat RelA/p65 de NF-kB, factor de transcripció essencial durant la resposta immune i el dany del DNA, és considerada una poderosa mediadora en la supervivència de les cèl·lules tumorals i la quimioresistència a causa de les seves propietats duals pro i antiapoptòtiques. Juga un paper important en la regularització dels SASP, ja que moltes de les citocines i quimiocines són segregades de manera depenent a aquest factor. Yondelis actua sobre l'acció transcripcional de NF-kB (Camonari et al 2018) regulant la repressió de gens antiapoptòtics i la transcripció de Fas donant com a resultat la sensibilització de les cèl·lules canceroses a la mort cel·lular via Fas (Martínez et al 2011).

La inhibició del creixement està relacionada amb la fragmentació de la proteïna nuclear PARP (Poli-ADP.ribosa.polimerasa-1), un procés molecular que indica clarament l'activació de l'apoptosi (Kaufmann et al 1993). PARP és la responsable de la síntesi de la poli (ADP-ribosa), enzim clau per mantenir la integritat del genoma en resposta del DNA danyat. PARP-1, també coneguda com a Poli-ADPribosa Sintetasa (PARS), és un important regulador de la via de reparació de l'excisió de la base del DNA (BER) activant-se principalment en resposta al dany del DNA generat per diferents agents genotòxics i per altres estímuls diferents com la infecció i estrès (Gordon-shaag et al 2003).

En condicions normals, quan es detecta el dany, PARP-1 s'uneix al DNA, activant-se i automodificant-se provocant la modificació de proteïnes nuclears que participen en la reparació del dany. Una vegada reparat el dany es dissocia del DNA i es degrada (Figura 15). En el cas amb excessiu dany cel·lular la funció de l'enzim és excessiva i es produeix un gran augment del consum del nivell de NAD⁺, el que arriba a provocar la mort cel·lular. Per evitar-ho, PARP és proteolitzada i inactivada per la caspasa-3 tallant-la en dos fragments, el catalític de 89KD i el fragment amb el domini d'unió al DNA de 24KDa (DNA-binding domain, DBD) fet considerat com un "hallmark" de l'apoptosi cel·lular (Kaufman SH et al 1993).

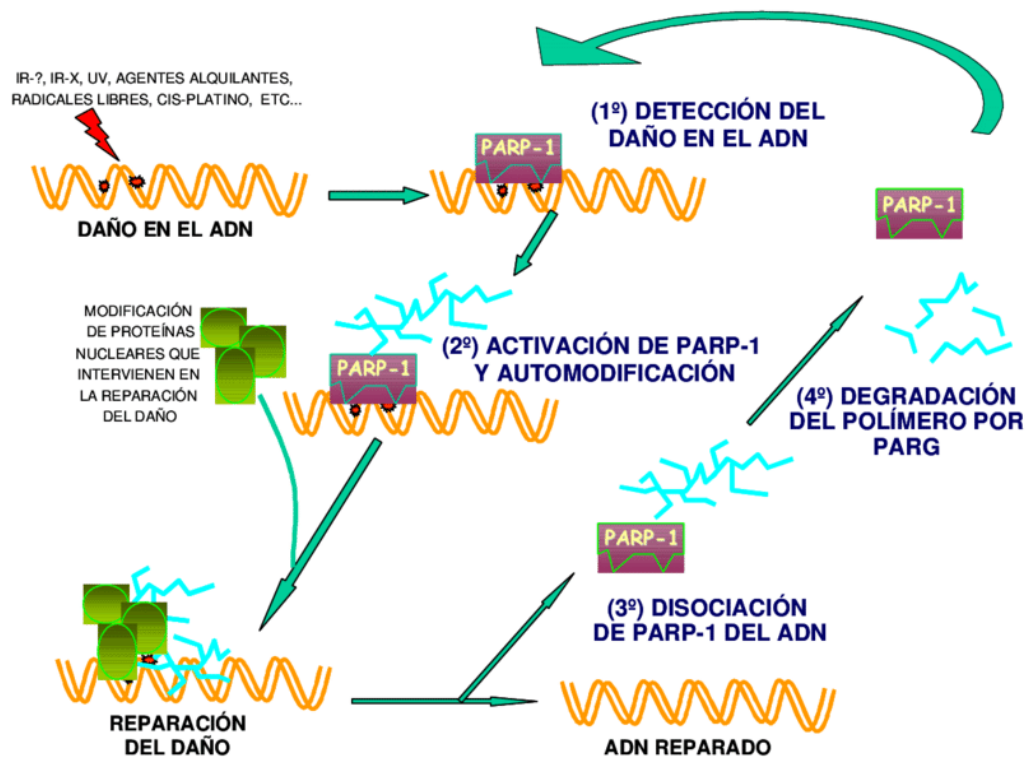


Figura 15: Etapes d'activació de la PARP-1. Imatge adquirida de Martin-Oliva D. et al 2006.

2 OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest projecte és estudiar en detall els mecanismes moleculars pels quals actua Trabectedin. La hipòtesi és que Yondelis provoca la mort cel·lular desregulant certes proteïnes vinculades amb el cicle cel·lular i que les seves propietats proapoptòtiques tenen relació amb les concentracions intracel·lulars del catió calci desregulades pel mateix fàrmac.

Per poder verificar la hipòtesi es fixen uns objectius concrets:

1. Estudiar si Yondelis indueix l'apoptosi cel·lular.
2. Estudiar si Yondelis regula proteïnes que participen en el cicle cel·lular.
3. Estudiar si Yondelis provoca canvis en la concentració de calci intracel·lular.
4. Estudiar si l'ió calci participa de manera directa en l'acció antiproliferativa de Yondelis.
5. Estudiar l'efecte que provoca l'antagonista dels receptors NMDA (Dextrometorfà) sobre Yondelis.

3 MATERIALS I MÈTODES

3.1 Cultius cel·lulars

Per la realització de tots els experiments s'ha utilitzat la línia cel·lular A549 derivada d'adenocarcinoma de pulmó humà. Es varen obtenir de la American Type Culture Collection (Manassas VA, USA). El medi utilitzat fou RPMI-1640 complementat amb 10% (v/v) de sèrum boví fetal, 100 unitats/ml de penicil·lina, 100yg/ml d'estreptomicina i 2mM de glutamina. Les cèl·lules foren incubades a 37°C i al 5% de CO₂.

3.2 Estudis farmacològics i de proliferació cel·lular

A partir d'un estoc de 50µg/ml dissolt en DMSO, Yondelis es va diluir amb H₂O per obtenir diferents solucions estoc de 10µM, 1µM, 100nM i 10nM. Les cèl·lules es varen sembrar amb 5 ml de medi de cultiu amb una densitat del 3 x10⁶ cèl·lules/flascó. Posteriorment, es varen incubar tota la nit per facilitar l'adhesió. Una vegada adherides es varen tractar amb una concentració de 100nM,10nM, 1nM i 0,1 nM de fàrmac. Els efectes es van observar a les 24 h, 78 h i els 7 dies després de la incubació. Paral·lelament, el Dextrometorfà (100µM) va ser incubat 2 h abans del tractament amb Yondelis.

3.4 Extracció de proteïnes i Western Blott

Les cèl·lules es varen tractar amb buffer de digestió per produir la ruptura cel·lular i alliberació de proteïnes. El buffer estava compost per inhibidors de proteases (1mM PMSF i 5mM Iodocetamina), inhibidors de fosfatases (1mM cantaridina i 1mM ortovonat), dodecilsulfat sòdic (SDS) i buffer d'extracció de proteïnes (394mg Tris-HCl + 731 mg NaCl + 51mg MgCl₂ + 186 mg EDTA + H₂O fins a 250 ml). La quantificació de proteïnes es va realitzar amb el kit de Bio-Rad (Bio-Rad protein assay kit) i es va mesurar la quantitat de proteïna per mostra amb el lector de plaques (microplate Reader SYNERGY H1). Una vegada extretes i quantificades les proteïnes es va realitzar un Western Blott amb gels al 12% SDS-PAGE. Seguidament, es va realitzar transferència de les proteïnes a la membrana de nitrocel·lulosa i es va realitzar l'immuno-blot utilitzant com anticossos primaris: anti-CD3 Mouse mAB (Cell Signaling Technology, Inc), anti-p53 (Cell Signaling Technology), anti-PARP (Cell Signaling) i anti-ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology) i com a secundari anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Tecnolgy). Com a control de càrrega es va utilitzar l'anticòs policlonal de la B-actina (Santa Cruz Biotechnology). Finalment, els resultats foren visualitzats mitjançant l'equip ImageQuant LAS4000 (General Electric).

3.5 Obtenció dels nivells de Ca²⁺

Per poder mesurar els nivells de calci intracel·lular es va utilitzar la sonda Fluo3/AM (Sigma, Madrid), ja que la seva intensitat de fluorescència és proporcional a la concentració de calci intracel·lular.

Les cèl·lules es van sembrar en una placa de 96 pouets i es va deixar tota la nit a 37°C per facilitar l'adhesió. A continuació es va dissoldre 1MG de Fluo 3-AM amb 442µl de DMSO per obtenir una concentració de 2mM. Es va mesclar 50µl de l'estoc anterior amb 50µl de Plurònic al 20% DMSO (Fisher Scientific, Madrid) i es varen afegir 4 ml de medi HBSS - Hank's Balanced Salt Solution (Sigma, Madrid). El nou estoc es va incubar durant 30 min. Paral·lelament, es varen rentar els pouets amb medi HBSS i acabat el temps d'espera, es varen afegir 80 µl/pouet de la dissolució anterior. Seguidament s'incubà la placa durant 1 h a 37°C. Finalment, es va retirar el fluo3/AM, es va afegir 90 µl/pouet de medi normal i es varen tractar les cèl·lules amb diferents dosis de fàrmac (100nm,10nm,1nm,0.1nm)

3.4.1 Espectrofotòmetre

Els nivells de calci es varen monitorar mitjançant un lector de plaques de fluorescència (SYNERGY H1 Microplate Reader, BIO-TEK INSTRUMENTS).

El fluo3 és un indicador de fluorescència del calci intracel·lular tot i que no és fluorescent fins que s'hidrolitza amb el Ca²⁺. Les cèl·lules es carregen utilitzant el seu derivat, l'èster d'acetoximetil (AM), ja que les sals de fluo-3 no pot penetrar les cèl·lules. Una vegada dins la cèl·lula, les esterases inespecífiques rompen l'èster i atrapen el fluo 3 de manera efectiva. L'experiment es va realitzar amb una longitud d'excitació/emissió de 506/526nm durant 3h obtenint dades de la longitud d'ona de cada mostra cada 2 minuts. Els resultats es varen exportar a l'Excel obtenint gràfiques del nivell de fluorescència vs. temps, agafant només les dades d'una hora d'experiment.

4 RESULTATS

4.1 Yondelis altera proteïnes que participen en el cicle cel·lular

Cèl·lules A549 es van incubar amb Yondelis amb unes concentracions de 100nM, 10nM, 1nM i 0,1 nM durant 24 h fins als 7 dies i es va observar l'efecte del fàrmac al microscopi òptic.

Sabent que les cèl·lules A549 que no estan en cicle es troben adherides i tenen forma estrellada i que, en canvi, les que estan en divisió tenen forma arrodonida i brillant es va valorar quin era el nivell de divisió cel·lular. Els cultius tractats amb 10nM (dosis no terapèutica) de fàrmac van augmentar el nombre de cèl·lules en divisió entre les 24-48 h de manera significant respecte de totes les altres concentracions i del control. Al contrari, l'altre dosis no terapèutica (100nM) va provocar una disminució de les cèl·lules en divisió respecte del control. Les cèl·lules tractades amb dosis terapèutiques de 1nM es varen mantenir semblant al control (Figura 16).

Els Westerns blotts realitzats verificaren aquestes observacions donant com a resultats l'alteració de diverses proteïnes responsables de regular el cicle cel·lular. La ciclina D3 va disminuir en dosis de Yondelis no terapèutiques més altes (100nM), en canvi, incrementà notablement la seva concentració a dosis de 10nM de fàrmac. A les dosis terapèutiques (1nM i 0,1nM) el nivell de ciclina D3 és manté constant respecte del control (Figura 17). Per altra banda, es va analitzar el factor de transcripció ERK 1/2 el qual, va augmentar la seva concentració en totes les dosis (Figura 17). Finalment, la proteïna P53 es va veure augmentada en totes les dosis respecte del control (Figura 17).

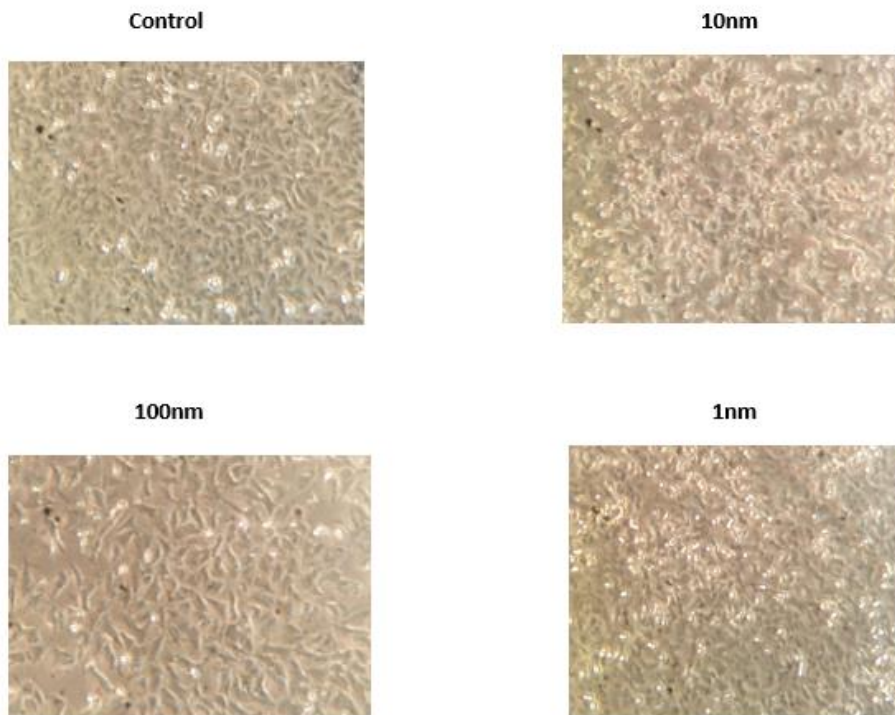


Figura 16: Efectes de Yondelis sobre la morfologia cel·lular de les cèl·lules A549 a les 24h d'incubació. Yondelis provoca que les cèl·lules entrin en cycle cel·lular, a conseqüència, adquireixen una morfologia arrodonida i brillant.

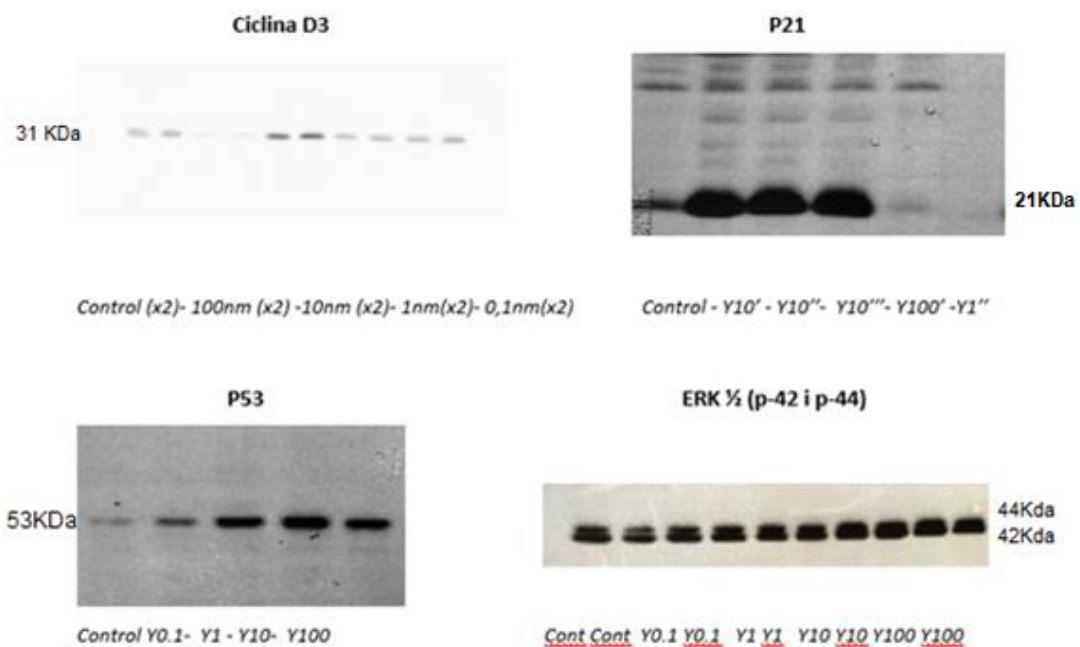


Figura 17: Efectes de Yondelis sobre diferents proteïnes reguladores del cycle cel·lular a les 48 h d'incubació. L'alteració del cycle cel·lular no es correlaciona amb els nivells de fosforilació de les dues isoformes de la quinasa ERK; p44 ERK1 y p42 ERK2. No s'observa relació entre P53 i P21.

4.2 Yondelis provoca apoptosi cel·lular

Igual que altres articles publicats (Martínez et al 2011) es confirma que Yondelis provoca l'augment de l'apoptosi en la línia cel·lular A549 després de les 48h d'incubació.

Pel que fa als resultats obtinguts, es pot observar una fragmentació clara de la proteïna PARP únicament en les línies cel·lulars tractades en dosis de 10nm. També s'observa una petita fragmentació a majors dosis (100nM) i nul·la a les dosis terapèutiques (Figura 18). Després de 7 dies es va tornar a avaluar l'acció antiproliferativa de les diferents dosis de fàrmac donant com a resultat una eficàcia del Yondelis sobre les cèl·lules A549 tan sols a les dosis major que les terapèutiques. A dosis menors s'observà una densitat cel·lular comparable a la del control. (Figura 19).

PARP 48h

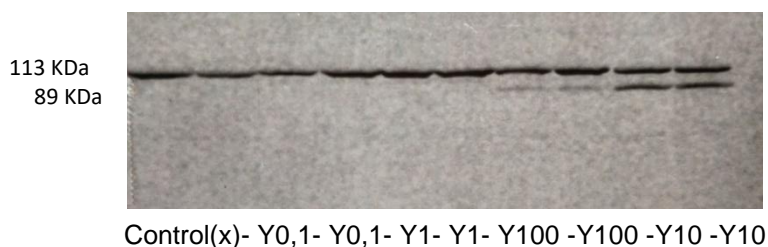


Figura 18: Yondelis indueix la fragmentació de la proteïna PARP.

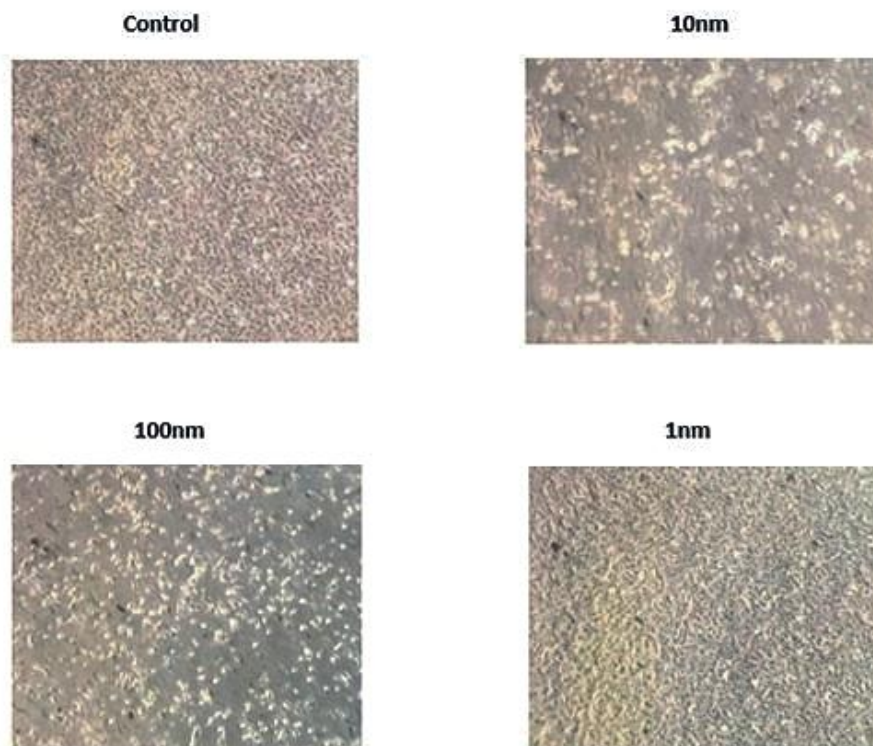
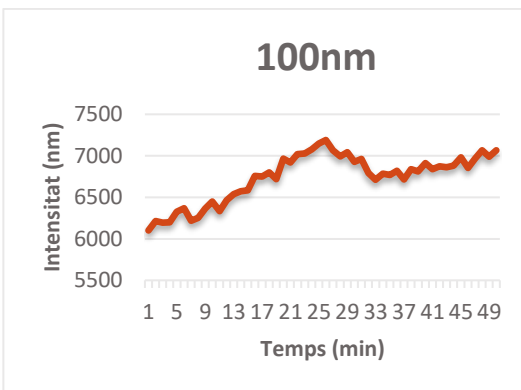
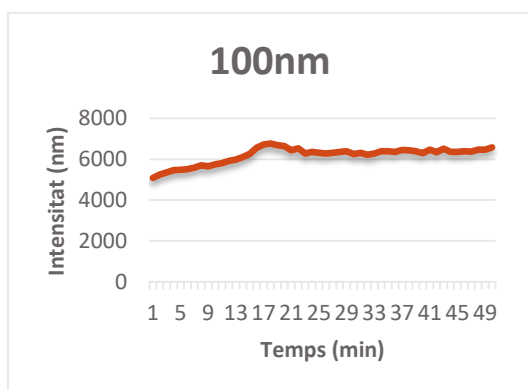
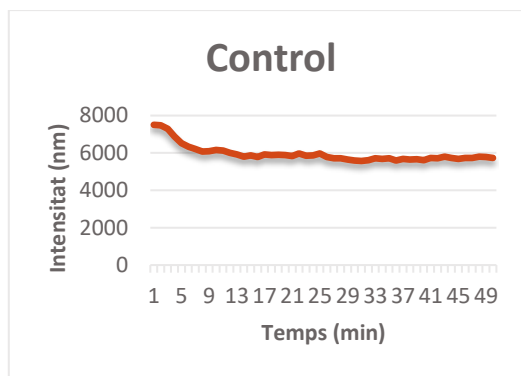
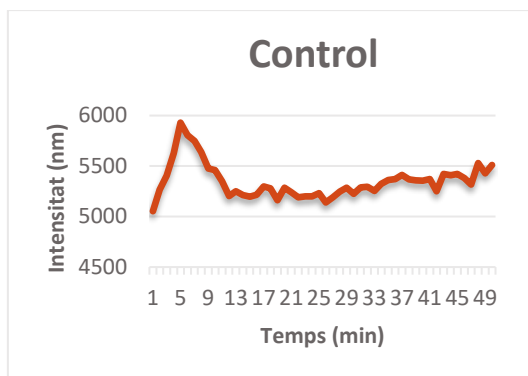
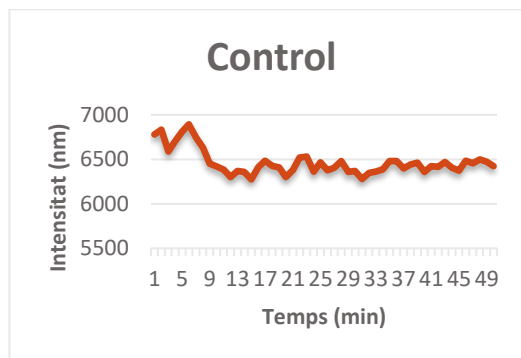
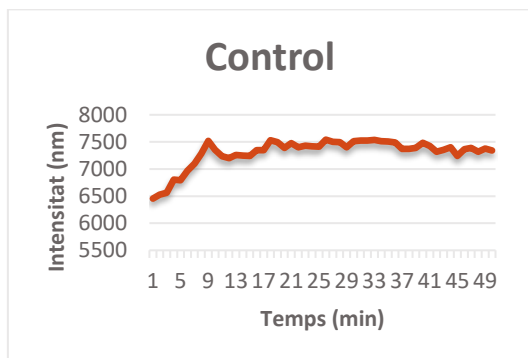
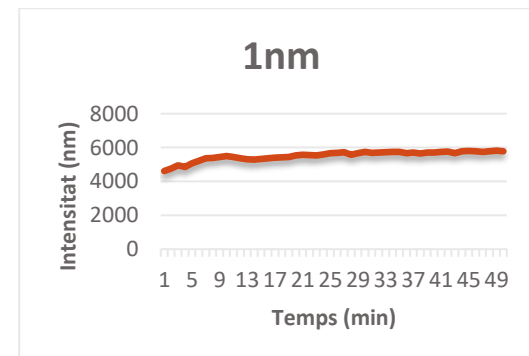
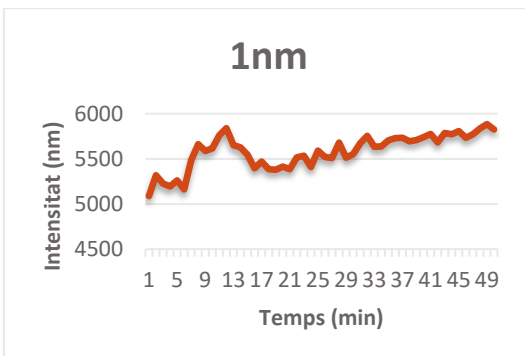
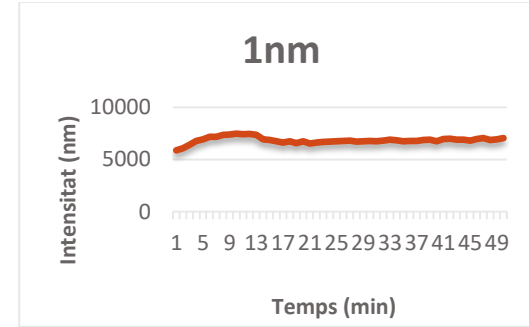
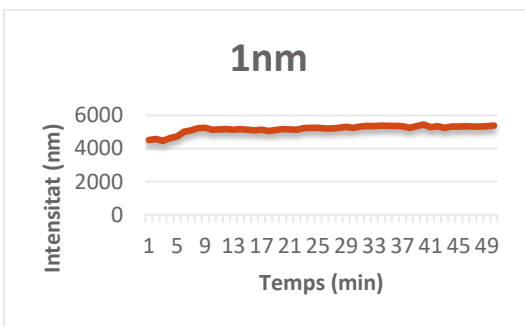
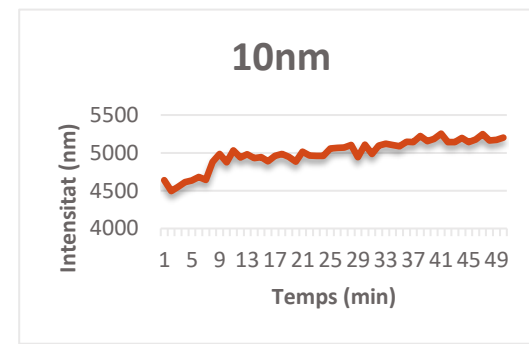
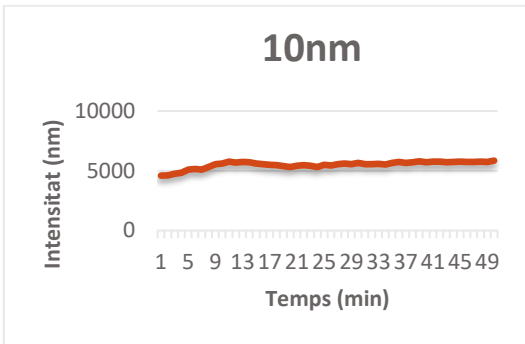
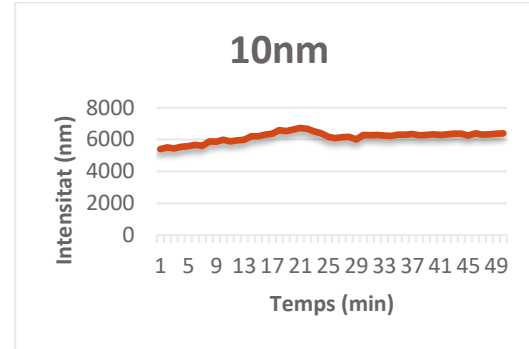
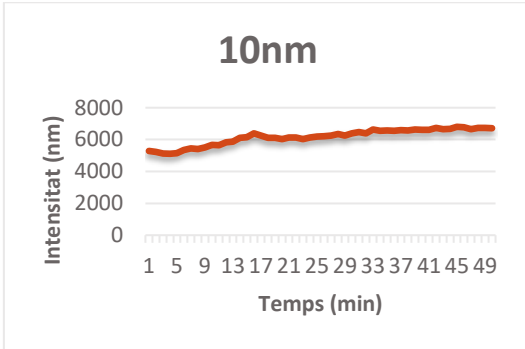
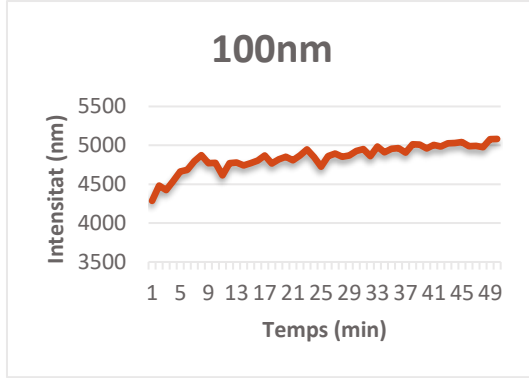
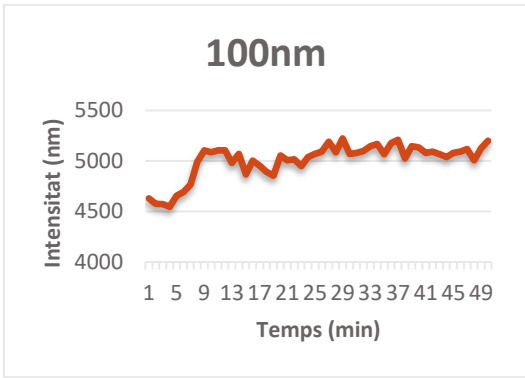


Figura 19: Yondelis provoca la mort cel·lular. Al cap de 7 dies d'incubació de la línia cel·lular A549 amb Yondelis només les dosis no terapèutiques provoquen la mort cel·lular.

4.3 Yondelis provoca l'alteració de les concentracions del calci intracel·lular

Les cèl·lules A549 incubades en presència de diferents dosis de fàrmac varen ser monitorades per estudiar les oscil·lacions del calci intracel·lular utilitzant la sonda Fluo 3-AM. La mesura del calci intracel·lular a llarg termini pot ser essencial per entendre el paper d'aquest ió en l'acció antitumoral de Yondelis.





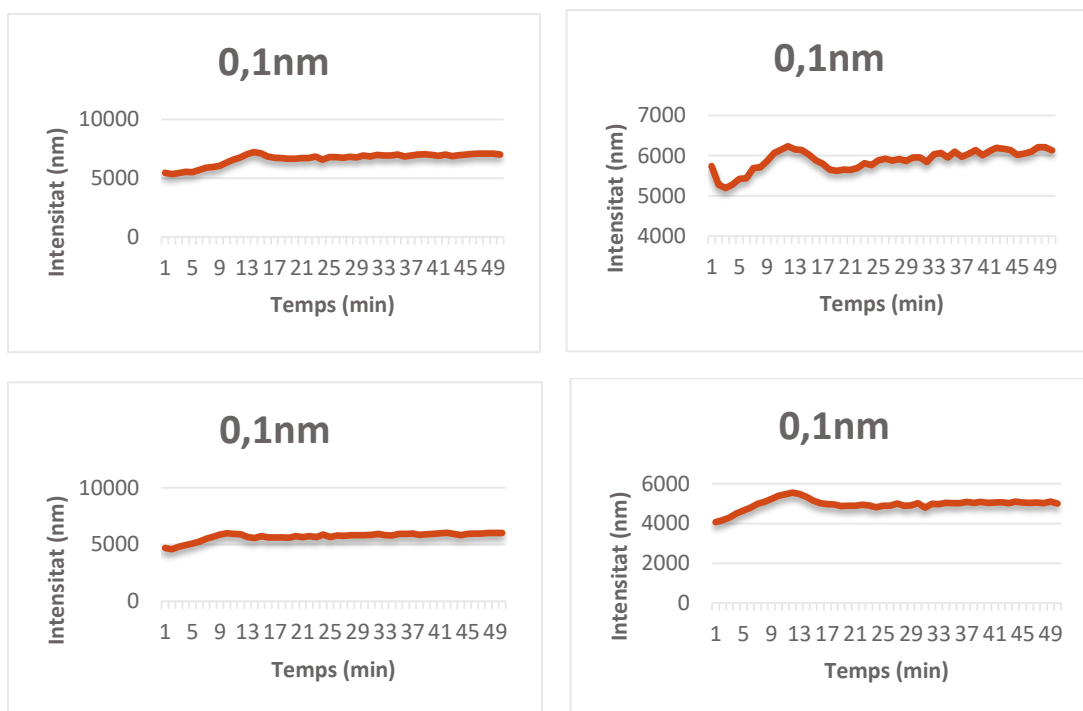


Figura 20: Estudi de l'efecte de Yondelis sobre la concentració de calci intracel·lular. Yondelis altera les concentracions de calci a l'interior cel·lular.

4.4 Dextrometorfà provoca la inhibició de l'apoptosi provocada per Yondelis

Recolzant la hipòtesi de l'acció del fàrmac sobre el calci intracel·lular i al mateix temps la influència d'aquest ió en l'acció antiproliferativa de Yondelis es va utilitzar un antagonista dels receptors NMDA per inhibir l'entrada de calci a l'interior cel·lular i analitzar les conseqüències. En la figura 21 es pot observar com la incubació simultània de les cèl·lules amb Yondelis i Dextrometorfà (DM) provoca la inhibició de l'apoptosi induïda pel mateix fàrmac (Figura 21).

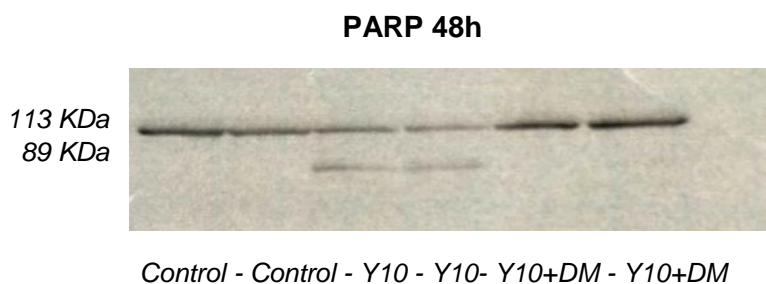


Figura 21: Dextrometorfà inhibeix l'apoptosi induïda per Yondelis.

5. DISCUSSIÓ

L'objectiu real de l'estudi dels mecanismes moleculars d'un fàrmac, en aquest cas, el Yondelis, és utilitzar els coneixements sobre la seva acció antiproliferativa per induir la mort de les cèl·lules no desitjades i crear teràpies efectives per la salut dels pacients. Al llarg del present treball s'han investigat les funcions proliferatives i antiproliferatives del compost d'interès per esbrinar la seva funcionalitat com a fàrmac antitumoral.

Els resultats obtinguts es relacionen amb un clar augment, en les dosis de 10nM, de la ciclina D3; proteïna que activa el cicle cel·lular, però alhora també hi ha un augment de la proteïna p21 que realitza l'acció contrària; parar el cicle cel·lular per induir l'apoptosi (Figura 17). Aquest fet suggereix que la cèl·lula a l'entrar de manera sobtada i excessiva al cicle cel·lular a conseqüència de l'acció proliferativa que indueix Yondelis en un primer moment, activa altres rutes moleculars per contrarestar aquest procés i per tant, activa proteïnes com la p21 per induir la mort cel·lular. Alhora, no s'observa relació entre p53 i p21, ja que aquesta última, a les 24h de tractament, s'incrementà a les dosis de 10nm, però a les dosis de 100nm i 1nm, es va produir una inhibició respecte de les cèl·lules control. En canvi, la p53 es va veure incrementada en totes les dosis, descartant així una regulació de p53 sobre p21 (Figura 17). A més, els resultats asseguren que l'aturada del cicle cel·lular no depèn de la quinasa ERK (Figura 17). Cal destacar que, les dosis semblants a les presents en el plasma dels pacients (1nM i 0,1 nM) no han provocat la mort cel·lular de la línia A549 (figura 18 i 19) però al mateix temps, segueixen mantenint el cicle cel·lular actiu, fet que ens porta a pensar quina és realment l'eficiència del compost a l'hora de posar fi a la vida de les cèl·lules malignes.

Per altra banda, les accions pro i antiapoptòtiques de Yondelis estan correlacionats amb l'entrada del Ca^{2+} al citosol; segon missatger que regula molts de processos cel·lulars importants. S'ha demostrat la presència de modificacions en l'expressió de cert gens a conseqüència de modificacions amb la concentració citoplasmàtica del Ca^{2+} directament vinculades en cascades de senyalització cel·lular que contribueixen en processos de proliferació, migració, invasió i metàstasi (Berridge et al.2003). En les gràfiques (figura 20) s'observen oscil·lacions del calci intracel·lular diferents depenen de la dosi de fàrmac utilitzada. A l'estudiar detingudament aquestes oscil·lacions es pot observar un fenomen repetitiu en gairebé tots els experiments; el control provoca una baixa del calci després del 5 min de l'inici de la mesura de la fluorescència, en canvi, totes les mostres tractades amb Yondelis provoquen l'augment en menor o major mesura del catió, destacant sobretot l'augment d'aquest en els primers instants de les dosis de 100nm. Aquesta informació permet hipotetitzar que la disminució observada de la ciclina D3 produïda per les dosis citotòxiques majors, es pot relacionar amb una entrada sobtada de calci intracel·lular provocant la inhibició del cicle cel·lular a causa d'una retroalimentació negativa en la cèl·lula, suggerint que l'ió participa en el mecanisme d'acció antitumoral actuant com a factor transcendental en les propietats proapoptòtiques del fàrmac.

A més, l'augment dels receptors del calci (NMDA) s'ha observat en moltes malalties assegurant que podrien ser dianes terapèutiques potencials en el tractament

de certs tumors (Rzeki et al.2001). El canal format per aquests tipus de receptors permet el pas dels ions calci a través seu gràcies a una diferència de potencial en presència de Mg^{2+} , provocant un increment de la concentració de calci intracel·lular cada vegada que el receptor s'activa. L'activació dels receptors NMDA s'ha associat amb funcions neurofisiològiques diverses com l'aprenentatge, el processament de memòria i fins i tot, amb el dolor i la funcionalitat reduïda dels receptors opioides (Chizh BA et al 2005; Bennett GJ et al 200). Les molècules que s'uneixen a aquests últims receptors són anomenades opioides i tenen propietats analgèsiques per alleujar el dolor. La funció reduïda dels receptors és causada per una disminució en la sensibilitat que es tradueix en tolerància als opioides i per tant, els pacients requereixen dosis més altes, per exemple de morfina, per tenir els mateixos efectes (DuPen A, et al 2007). La reducció de la quantitat d'opioïdes sempre ha estat un objectiu important pel fet de la dependència psicologia i somàtica que indueixen i pels efectes secundaris que provoquen.

Els receptors NMDA s'activen per aminoàcids excitadors (EAA); neurotransmissors del sistema nerviós central (SNC), com el glutamat i aspartat, que estimulen les neurones sinàptiques per transmetre sensacions de dolor. Aquesta resposta pot ser eliminada pels antagonistes de NDMA, com el Dextrometorfà (DM), un antagonista de NMDA que s'utilitza habitualment com un antitussigen oral, que ha estat protagonista en moltes investigacions per les seves possibles propietats contra el dolor en pacients en càncer (Mercadante et al 1998; Avi A Weinbroum et al 2000). Es postula que pot arribar a convertir-se en un component per tractar el dolor, alleujar els fenòmens neurovegetatius que l'acompanyen i reduir l'ús d'opioïdes. Així i tot, es necessiten més estudis dels antagonistes de NMDA per determinar millor la seva utilització amb relació amb el dolor i controlar eficaçment els seus efectes secundaris. Com s'ha demostrat en el treball (figura 21), la capacitat del DM per reduir el flux de calci intracel·lular a través dels canals activats pel receptor NMNA pot provocar la reducció de l'acumulació de l'ió en el citosol i, conseqüentment, desregularitzar moltes rutes bioquímiques, com la inhibició de l'apoptosi induïda per Yondelis.

6. CONCLUSIONS

- 1) Yondelis activa la divisió cel·lular actuant sobre proteïnes reguladores del cicle cel·lular.
- 2) L'entrada al cicle cel·lular provoca que el DNA quedi exposat i sigui accessible pel fàrmac per poder dur a terme la seva funció proapoptòtica.
- 3) L'acció proapoptòtica és dependent de les dosis de fàrmac administrades.
- 4) El mecanisme d'acció de Yondelis està relacionat amb la mobilització del calci intracel·lular.
- 5) S'ha demostrat que el Dextrometorfà provoca la inhibició de l'apoptosi cel·lular induïda per Yondelis impedit l'entrada de calci al citosol.
- 6) La utilització d'antagonistes dels receptors NMDA per tractar el dolor dels pacients amb certs tipus càncer podria afectar de manera directa a l'eficàcia del tractament.

7. BIBLIOGRAFIA

Allavena P. et al (2005) " Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production" . Cancer Res 65 : 2964 – 2971.

Angosto, M. et al (2003) "Bases moleculares de la apoptosis". Anal. Real. Nat. Farm. 69:36-64.

Berridge et al (2009). "Calcium signalling: Dynamics, homeòstasis and remodeling". Nat Rev Mol Cell Biol. 4(7):517-29.

Braun F.K et al 2007 "Blockade of death receptor-mediated pathways early in the signaling cascade coincides with distinct apoptosis resistance in cutaneous T-cell lymphoma cells". J Invest Dermatol, 127, pp. 2425-2437

Cantley L.C et al (1999) "New insights into tumor suppression". Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 96: 4240-4245.

Carter et al (2010) "Trabectedin: a review of its use in soft tissue sarcoma and ovarian cancer" Drug 2010 Feb 12; 70(3):335-76.

Chuaire N et al (2008) "P53 y su papel en el epitelio superficial del ovario: Revisión Invest". Clínic; 49(4), 561-593.

Cull-Candy et al (2001)" NMDA receptor subunits: diversity, development and disease". Curr Opin Neurobiol. 11(3):327-35.

Cull-Candy et al (2004) "Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses". Sci STKE. 19;(255):re16.

Daugas E. et al (2000) "Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis" . FEBS Lett.476, 118–123.

D'Incalci, M. Et al (2014) "Trabectedin, a drug acting on both cancer cells and the tumour microenvironment". Br. J. Cancer 111, 646–650.

Erba et al. (2001) "ecteinascidin 743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action". Eur J.cancer. 2001 Jan; 37(1):97-105.

Feuerhahn S. et al (2011). "XPF-dependent DNA breaks and RNA polymerase II arrest induced by antitumor DNA interstrand crosslinking-mimetic alkaloids". Chem Biol. 2011;18:988–999.

Flores-Soto et al (2012) "Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA". Neurología. 2012 Jun;27(5):301–10.

García M. et al (2003). " Vías de Senyalización intracelular que conducen a la apoptosis de las celulas de la retina. Arch Soc Esp Oftalmol [online], vol.78, n.7, pp.351-364. ISSN 0365-6691.

Germano, G. et al (2013). "Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin". *Cancer Cell* 23, 249–262.

Gordon-Shaag et al (2003). "The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3". *J Virol* 77, 4273–4282.

Govender D. Et al (2012) "Gene of the month: PTEN". *J Clin Pathol* 65:601–3. doi:10.1136/jclinpath-2012-200711.

Haupt S. et al (2003) "Apoptosis—the p53 network," *Journal of Cell Science*, vol. 116, no. 20, pp. 4077–4085.

Hogan et al (2003) "Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT". *Genes Dev.* 17(18)_2205-32.

Horseley et al (2002) "NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation". *J Cell Biol* 156(5):771-4.

Jacobson M et al (1997) "Programmed cell death in animal development". *Cell*, 88, pp. 347-354

Jin S. et al. (2000) "Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97:6775–6779. doi: 10.1073/pnas.97.12.6775

Kaufmann S.H et al (1993) "Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis" *Cancer Res.*, 53 (1993), pp. 3976-3985.

Kaufmann SH et al (2001) "Analysis of caspase activation during apoptosis". *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 18: Unit. 10.1002/0471143030.cb1802s11 [doi].

Kawasaki, H. et al (1997) "Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells". *J. Biol. Chem.* 272, 18518–18521.

Kulaberoglu et al (2016) "Chapter 15 - The Role of p53/p21/p16 in DNA-Damage Signaling and DNA Repair". *Genome Stability from Virus to Human Application*, 243-256.

Low St et al (2004) "An audit of changes in outcomes of Acute Pain Service: Evolution Over the last 2 decades". *Medicine (Baltimore)*; 94(40):e1673.

Machaca K. et al (2010) "Ca²⁺ signaling, genes and the cell cycle," *Cell Calcium*, vol. 48, no. 5, pp. 243–250, 2010.

Mann KM. et al (2004) "Calcineurin initiates smooth muscle differentiation in neural crest stem cells". *J Cell Biol* 2004; 165: 483–91.

Martínez-Serra et al. (2011) "Yondelis (ET-743, Trabectedin) sensitizes cancer cell lines to CD95-mediated cell death: new molecular insight into the mechanism of action". *Eur J Phamarcol.* 11;658(2-3):57-64.

Martin-Oliva D. et al (2006) "Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa- 1: una proteína nuclear implicada en procesos inflamatorios, muerte celular y càncer". *MÉDICAS UIS.* 19:95-103.

Mattson M. P. et al. (2000) "Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders". *Trends Neurosci.* 23 , 222–229.

Monteith et al (2012) "Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences" *J Biol Chem.* 287(38):31666-73.

Muzio M. et al (1996) "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex". *Cell*, 85. pp. 817-827.

Olivares-Reyes JA et al (2008) "Bases moleculares de las acciones de la insulina". *Rev Edu Bioq.* 27:9-18.

Parekh et al (2010) "Store-operated CRAC channels: function in Health and disease". *Nat Rev Drug Discov.* 9(5):399-410.

Pinzon C.E et al (2009) "Role of phosphatidylinositol 3-kinase pathway (PI3K/Akt) in humans", *Revista Ciencias de la Salud*, vol. 7, no. 2, pp. 47–66.

Polyak, K. et al (1997) "A model for p53-induced apoptosis". *Nature* 389, 300–305.

Pommier et al (1996) "DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*". *Biochemistry.* 34(41): 13303-9.

Roseto A et al (1999) "Apoptosis o la muerte celular programada". *Arch Argen Pediatr*; 97(4): 253-75.

Rzeski et al (2001). "Glutamate antagonist limit tumor growth". *Proc Natl Acad Sci U S A.*2001 May 22;98(11).

Schüler T. Et al (2008) "Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly" . *J. Biol. Chem*;283:37–46. doi: 10.1074/jbc.M703539200.

Shakeri R et al (2017) "Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*; 135: 111–125.

Siu A. et al (2007) "Dextromethorphan: a review of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in the management of pain". *CNS Drug Rev*, 13:96-106.

Takebayashi et al. (2001) "Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair." *Nat Med.* 2001 Aug; 7: 961-966.

Thompson C. B. et al (1995) "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease". *Science* 267, 1456-1462.

Wang X.Z. et al (1996) "Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153)" *Mol. Cell. Biol.* 1996;16:4273–4280. doi: 10.1128/MCB.16.8.4273.

Wang Y et al (2017) "Intracellular calcium promotes radioresistance of non-small cell lung cancer A549 cells through activating Akt signaling". *Tumour Biol* 2017; 39: 1393393694.

Zewail-Foote et al (1999) "Ecteinascidin 743: a minor Groove alkylator that bends DNA toward the major groove". J Med Chem. 42(14):2397-7.

Zhang Z.L et al (2003) "Expression of apoptosis regulators in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells". J Pathol, 200, pp. 249-254.