

## **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

La actividad antitumoral de las Antraciclinas está relacionada con la unión al DNA, que tiene lugar por intercalación en secuencias 5' (A/T)CG 3' (Chaires et al., 1990; Valentini et al., 1985). A pesar de su eficacia, el uso de las Antraciclinas en la quimioterapia del cáncer presenta dos inconvenientes: la inducción de toxicidad en los tejidos sanos y la existencia de tumores resistentes a los tratamientos (Booser and Hortobagyi, 1994; Minotti et al., 2004). Durante las últimas décadas se han intensificado los esfuerzos en el diseño y síntesis de nuevas Antraciclinas que sean más eficaces (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001). Una de las estrategias utilizadas es el diseño racional de nuevos derivados antraciclínicos, basado en el conocimiento estructural de las interacciones Antraciclinas-DNA (Chaires, 1990; Chaires, 1996; Chaires et al., 1987; Chaires et al., 1990; Priebe, 1995). El diseño modular de Bisantraciclinas es un ejemplo de diseño racional, que consiste en la unión de dos Antraciclinas, para crear una molécula de mayor tamaño (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001). Ya que la actividad antitumoral de las Antraciclinas depende de la unión al DNA, las Bisantraciclinas son moléculas potencialmente más eficaces debido a que reconocen secuencias en el DNA de mayor longitud (5'CGNNCG'3), aumentando la afinidad y la selectividad de secuencia (Priebe et al., 2001). Diferentes estudios computacionales, termodinámicos y cristalográficos demuestran que la interacción con el DNA tiene lugar por bisintercalación en secuencias de 6 pb con CG en sus extremos (Chaires et al., 1997; Priebe et al., 2001). Demostradas las propiedades de unión al DNA de las Bisantraciclinas, actualmente se está evaluando su actividad antitumoral sobre numerosas líneas celulares correspondientes a tumores de origen humano.

En concreto, nuestro grupo ha participado en el análisis detallado de los mecanismos de acción de la Bisantraciclina WP631 (Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997; Priebe et al., 2001). La evaluación de la efectividad de la WP631 se ha basado fundamentalmente en la respuesta a cuatro preguntas:

(a) ¿Es la WP631 más potente que las Antraciclinas Daunorubicina y Doxorubicina?. Hemos determinado las dosis de Daunorubicina, Doxorubicina y WP631 que inhiben el crecimiento en diferentes líneas tumorales. Consideramos que,

como la cardiotoxicidad está relacionada con la dosis administrada de Antraciclinas (Zhang and Berger, 2003), si la WP631 es capaz de inhibir el crecimiento utilizada a dosis menores, es potencialmente un agente antitumoral más efectivo que la Daunorubicina y la Doxorubicina.

(b) ¿Es la WP631 más potente que las Antraciclinas monoméricas en líneas tumorales resistentes a la apoptosis?

(c) ¿Es la WP631 más potente que las Antraciclinas monoméricas en líneas tumorales con fenotipo MDR?

(d) ¿Es la WP631 un inhibidor específico de la unión de Sp1 al DNA? y, ¿de qué modo afecta esto a su capacidad antiproliferativa?

### **La WP631 es un agente antiproliferativo más potente que la Daunorubicina y la Doxorubicina en diferentes líneas celulares**

Se consideró que, como derivado de la Daunorubicina, los primeros análisis con la WP631 debían realizarse utilizando una línea tumoral de origen hematológico. Se escogió la línea Jurkat T, correspondiente a una leucemia de linfocitos T, como modelo de estudio. Los primeros resultados experimentales demostraron que la WP631 es mucho más eficaz que la Daunorubicina inhibiendo el crecimiento de las células Jurkat T (Portugal et al., 2001). Estos resultados preliminares revelaban las ventajas terapéuticas potenciales de la WP631.

Una de las dificultades del trabajo con líneas celulares establecidas es que tienden a ser inestables, pudiendo cambiar alguna de sus características fisiológicas y morfológicas a medida que se realizan pases. Por este motivo, el punto de partida del presente trabajo fue volver a determinar la capacidad de la Daunorubicina y la WP631 para inhibir la proliferación en la línea Jurkat T. Se confirmó que la WP631 es de tres a cinco veces más potente inhibiendo el crecimiento celular que el fármaco control, la Daunorubicina (Figura R2 y Tabla R1).

Las células tratadas con 91nM Daunorubicina ( $IC_{50}$ ) ó 60 nM WP631 ( $IC_{75}$ ) se acumulan en la fase  $G_2/M$  (Figura R3) con las características fenotípicas de células senescentes: aumento de tamaño, granulación y actividad SA- $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0 (Figura R7) y (Chang et al., 1999a; Dimri et al., 1995; Mansilla et al., 2003). Hemos comprobado que, a diferencia de las células tratadas durante 24 horas con 91 nM Daunorubicina, las células tratadas durante 72 horas con 60 nM WP631 son capaces de

sintetizar DNA (Figura R8), resultado que explica la presencia de células poliploides tras el tratamiento con WP631 (Figura R3). Dado que las células senescentes y en *crisis* tienen actividad SA- $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0, pero sólo las células en *crisis* sintetizan DNA (véase Introducción) nuestros resultados sugieren que el tratamiento de las células con 91 nM Daunorubicina induce senescencia, mientras que 60 nM WP631 induce la *crisis* celular en las células Jurkat T. Confirmamos que la WP631 induce la catástrofe mitótica en las células Jurkat T, caracterizada por la presencia de células poliploides binucleadas o multinucleadas (Figuras R3 y R9) y (Barbisan et al., 1999; Elliott et al., 1999; Erenpreisa et al., 2001), y de figuras mitóticas anormales (Figura R13) y (Roninson et al., 2001), que culmina con la muerte de las células (Tabla R2). Este resultado coincide con observaciones recientes que demuestran que la muerte de las células en *crisis* se produce por catástrofe mitótica (Shay and Wright, 2004). Aunque la morfología de las células apoptóticas y que sufren catástrofe mitótica es similar (Figura R14A) y (Chan et al., 1999), los cuerpos apoptóticos son fácilmente diferenciables de las células multinucleadas (Figura R14B).

El tratamiento de las células Jurkat T con la dosis IC<sub>75</sub> para la Daunorubicina está asociado mayoritariamente a la inducción de apoptosis (Figura R3 y R14A), resultado que está de acuerdo con numerosas publicaciones que indican que la Daunorubicina ejerce su efecto antitumoral induciendo la apoptosis dependiente de *p53* (da Silva et al., 1996; Gewirtz, 1999; Ling et al., 1993; Lowe et al., 1993). Sin embargo, el tratamiento con la IC<sub>50</sub> para la Daunorubicina induce apoptosis sobre una parte de la población y necrosis sobre otra, resultando ser esta última el destino final de las células senescentes (Figura R14A), y de acuerdo con lo descrito en (Seluanov et al., 2001). Nuestros resultados demuestran que la Daunorubicina puede inhibir el crecimiento de las células Jurkat T a través de dos mecanismos diferentes, que son dependientes de la dosis: apoptosis y senescencia celular, de acuerdo con resultados que demuestran que la intensidad de la apoptosis y la senescencia está determinada por la concentración del estímulo que las provoca: apoptosis a dosis altas, senescencia a dosis bajas, y apoptosis y senescencia a dosis intermedias (Bladier et al., 1997).

También hemos analizado la efectividad de la WP631 sobre dos líneas tumorales resistentes a la apoptosis. Se han utilizado las líneas de carcinoma mamario MDA-MB-231 y MCF-7/VP. Las células MDA-MB-231 carecen de *p16* y *p53* funcionales (Craig et al., 1998; D'Assoro et al., 2004), comprometiendo los puntos de control de G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> y

la vía de la apoptosis dependiente de *p53* (Bunz et al., 1998). La línea MCF-7/VP deriva de células MCF-7 seleccionadas por su resistencia a concentraciones crecientes de etopósido (Schneider et al., 1994). Como derivadas de la línea MCF-7, las células MCF-7/VP carecen de p16 y caspasa-3 funcionales, por lo que son resistentes a la apoptosis (Craig et al., 1998; Essmann et al., 2004; Semenov et al., 2004). Además, se trata de células que sobreexpresan la proteína MRP-1 (Lawrence et al., 2001; Lee et al., 2004; Perez-Soler et al., 1997) asociada a la resistencia múltiple a antitumorales (Zhang and Berger, 2003). Hemos demostrado que la WP631 es un agente antiproliferativo más potente que la Doxorubicina en las dos líneas de carcinoma mamario (Tabla R1), especialmente en la línea MCF-7/VP, resistente a los tratamientos con Doxorubicina (Tablas R1, R2 y R3) y (Figuras R3, R4 y R5) y (Chaires et al., 1997; Portugal et al., 2001; Schneider et al., 1994), y a dosis moderadas de WP631 (Tablas R1, R2 y R3, y Figuras R3, R4 y R5). Solamente el tratamiento de las células MCF-7/VP con la dosis  $IC_{75}$  para la WP631 induce la muerte del 100% de las células, mientras que la Doxorubicina y la dosis  $IC_{50}$  para la WP631 sólo provocan la muerte de una parte de la población celular (Tabla R2).

El mecanismo mayoritario de muerte en las líneas MDA-MB-231 y MCF-7/VP es la catástrofe mitótica (Figuras R3, R10, R11, R15 y R16), confirmando así que la resistencia a la apoptosis no afecta a la sensibilidad de las células a los fármacos que se unen al DNA (Brown and Wouters, 1999; Roninson et al., 2001). A diferencia de las células Jurkat T, las células MDA-MB-231 y MCF-7/VP acumuladas en  $G_2/M$  no presentan actividad SA- $\beta$ -galactosidasa lisosomal a pH 6.0 (véase Resultados). Nuestros resultados indican que la catástrofe mitótica puede ser tanto un proceso dependiente como independiente de procesos de senescencia o *crisis* celular, coincidiendo con observaciones de otros grupos (Chang et al., 1999a). Las células que sufren catástrofe mitótica se encuentran mayoritariamente en suspensión (Figuras R15 y R16), lo que está de acuerdo con resultados experimentales que demuestran que las células en catástrofe mitótica pierden con el tiempo capacidad de adhesión (Lock and Stribinskiene, 1996).

Hemos demostrado no sólo que la WP631 es un inhibidor de la proliferación celular muy potente, sino que las Antraciclinas pueden ejercer su efecto antitumoral activando mecanismos distintos a la apoptosis. Nuestros resultados están de acuerdo con la idea emergente de que ni el estatus funcional de *p53*, ni el grado de apoptosis pueden

considerarse indicadores de la sensibilidad de las células cancerosas a los tratamientos con antitumorales: las células pueden morir por apoptosis, pero la forma dominante no ha de ser necesariamente la apoptosis (Brown and Wouters, 1999).

**La actividad antiproliferativa de las Antraciclinas está mediada por cambios en la transcripción génica: la WP631 es un inhibidor de la transcripción dependiente de Sp1 *in vivo* (células en cultivo)**

Mediante microscopía confocal se ha demostrado que la WP631 se acumula en el interior de las células, localizándose mayoritariamente en el núcleo (Villamarín et al., 2003). Este resultado confirma que, igual que para la Daunorubicina y la Doxorubicina, los efectos de la WP631 pueden estar mediados por la unión al DNA (Belloc et al., 1992; Chaires, 1996; Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997; Priebe et al., 2001; Valentini et al., 1985). Hemos demostrado que en las células Jurkat T y MDA-MB-231 la WP631 se incorpora más lentamente en el interior de las células que la Daunorubicina o la Doxorubicina, y que la concentración intracelular de la Bisantraciclina es siempre menor (Figuras R6A y R6B). Estos resultados sugieren en primer lugar, que se necesitan dosis menores de WP631 para ejercer el mismo efecto antiproliferativo en las líneas Jurkat T y MDA-MB-231, y en segundo lugar, que la concentración efectiva de WP631 para ejercer este efecto (fármaco que ha entrado en las células) es mucho menor. Aunque igual que la Daunorubicina y la Doxorubicina, la WP631 tiene las propiedades de un tensioactivo, pudiendo atravesar la membrana plasmática por transporte pasivo y llegar al núcleo (Lampidis et al., 1997), el transporte de la WP631 al interior de las células podría estar limitado por su mayor tamaño.

Cuando el gen asociado a la resistencia múltiple *mrp-1* está sobreexpresado, como es el caso de las células MCF-7/VP, la concentración intracelular de la WP631 es superior a la de la Doxorubicina (Figura R6C), posiblemente debido a que la WP631 es más hidrofóbica que la Doxorubicina, pudiendo escapar mejor de la acción de las bombas transportadoras MRP-1 y MDR-1 (Garnier-Suillerot et al., 2001). Hemos demostrado que la efectividad de la WP631 en la línea MCF-7/VP está determinada por el efecto directo sobre la transcripción del gen *mrp-1* (Figura R21). La Bisantraciclina WP631 inhibe la transcripción del gen *mrp-1* en la línea MCF-7/VP (Figura R21), disminuyendo la actividad de la bomba transportadora (Figura R22). La capacidad de interferir con la transcripción y afectar la actividad de la proteína MRP-1 depende de la

dosis de WP631 utilizada, alcanzándose una inhibición cercana al 50% en las células tratadas con 594 nM (su IC<sub>75</sub>), respecto a las células sin tratar (Figuras R21 y R22). Cabe remarcar que el efecto de la dosis IC<sub>75</sub> para la WP631 es muy potente, dado que la actividad total de las bombas asociadas a resistencia en las células sanas puede alcanzar el 20% (Garnier-Suillerot et al., 2001). Por este motivo, dependiendo de la dosis usada, la WP631 se incorpora más eficazmente que la Doxorubicina en la línea MCF-7/VP (Figura R6C). Nuestros resultados sugieren que sólo cuando se tratan las células MCF-7/VP con la dosis IC<sub>75</sub> para la WP631, el fármaco es capaz de superar la acción de la proteína transmembrana MRP-1, acumularse en el interior de las células eficazmente, y provocar la muerte del 100% de las células (Tabla R2 y Figura R3). Se trata del primer caso descrito en que un antitumoral supera los mecanismos de resistencia asociados a la sobreexpresión de la proteína MRP-1 inhibiendo su transcripción. Recientemente se ha descrito que se puede incrementar la sensibilidad a antitumorales en células de glioma que expresan MRP-1, usando oligonucleótidos *antisense* (Matsumoto et al., 2004). Este resultado corrobora nuestras observaciones, poniendo de manifiesto la importancia de la inhibición de la expresión del gen *mrp-1* para ganar efectividad en el tratamiento de tumores con resistencia múltiple. Dado que la expresión de los genes *mdr-1* y *mrp-1* está controlada por el factor de transcripción Sp1 (Bein et al., 2004; Muredda et al., 2003) nuestros resultados indican que la WP631 no es sólo un inhibidor muy potente de la transcripción dependiente del factor Sp1 *in vitro* (Martín et al., 1999), sino también en células en cultivo y a bajas dosis, de acuerdo con diferentes resultados experimentales (Botella et al., 2001; Gaidarova and Jiménez, 2002; Mansilla et al., 2004).

Dado que la línea Jurkat T nos permitía estudiar las diferentes respuestas celulares (apoptosis, senescencia celular y catástrofe mitótica) (véase Resultados), la escogimos como modelo para analizar detalladamente otros efectos de la WP631 sobre la transcripción, y compararlos con los de la Daunorubicina. Hemos relacionado los perfiles de expresión génica con las respuestas celulares, y la capacidad de las diferentes Antraciclina y dosis de producir lesiones en el DNA (véase Anexo I y Tabla R7).

La IC<sub>75</sub> para la Daunorubicina es la única dosis que induce mayoritariamente muerte por apoptosis (Figuras R3 y R14). Este tratamiento daña significativamente el DNA de las células Jurkat T (Tabla R7). Este resultado está de acuerdo con numerosos estudios que demuestran que las Antraciclina inducen la apoptosis porque lesionan el

DNA, como consecuencia de la interferencia con la topoisomerasa II (Gewirtz, 1999; Zunino and Capranico, 1990). Por otro lado, las dosis  $IC_{50}$  e  $IC_{75}$  para la Doxorubicina y la WP631 respectivamente, no producen lesiones significativas en el DNA (Tabla R7). Este resultado corrobora que, a bajas concentraciones, el mecanismo de acción de las Antraciclinas no depende mayoritariamente de la inhibición de la topoisomerasa II y la consecuente inducción de la apoptosis (Gewirtz, 1999), y está de acuerdo con resultados preliminares que demuestran que la WP631 no es un inhibidor especialmente eficiente de la topoisomerasa II (W. Priebe, comunicación personal). Estos resultados pueden explicar porqué en estos casos el mecanismo principal de muerte celular no fue la apoptosis (Figura R3), a pesar de que las células Jurkat T usadas tuvieran p53 funcional. Seguramente los efectos celulares derivados de los tratamientos con las dosis  $IC_{50}$  para la Daunorubicina ó  $IC_{75}$  para la WP631 se deben a cambios en la expresión de genes concretos. Los cambios en la expresión génica pueden producirse en respuesta pequeñas lesiones en el DNA, consecuencia de la interferencia de los fármacos con la topoisomerasa II de manera más localizada, y al efecto directo de la Daunorubicina y la WP631 sobre la transcripción génica, mediante la interferencia con factores de transcripción (Marín et al., 2002; Martín et al., 1999). Utilizamos *arrays* de cDNA para determinar los cambios en los niveles de transcripción de aproximadamente 200 genes, clasificados como oncogenes y genes supresores de tumores (véase Anexo I), y comparamos los cambios observados con los resultados de RT-PCR semicuantitativa (Figura R17). Los resultados obtenidos indican que la respuesta final de las células está determinada por cambios en la expresión de genes concretos (véase Anexo I). La Figura D1 muestra los modelos que proponemos para relacionar la respuesta celular derivada de cada tratamiento con la activación de las rutas de la apoptosis, la senescencia celular inducida y la catástrofe mitótica. Existe una clara correlación entre los cambios en la expresión de genes involucrados en los puntos de control  $G_1/S$  y  $G_2/M$  observados (Tabla R6), y su implicación en la inducción de la apoptosis, la senescencia celular y la catástrofe mitótica. Las rutas descritas en la Figura D1 se basan en los perfiles de transcripción que observamos después de los tratamientos con Daunorubicina o WP631 (véase Anexo I), en la presencia de DNA dañado en cada caso (Tabla R7) y en la respuesta celular observada (véase Resultados).

El gen *p53* juega un papel central las tres rutas de la Figura D1. La activación de la expresión de los genes *p53* y *ATM*, junto con la estabilización de la proteína p53 en

respuesta a las lesiones en el DNA (Tabla R7) y (Chen et al., 1996) explica que el tratamiento de las células Jurkat T con la dosis IC<sub>75</sub> para la Daunorubicina active la vía de la apoptosis dependiente de *p53*, que tiene lugar desde la fase G<sub>1</sub> (Figuras R3 y R14) y (Bernstein et al., 2002; Chen et al., 1996; Vogelstein et al., 2000; White, 1996). El aumento de la expresión del gen *N-Ras* (Figura D1) está relacionado con la estabilización de la proteína p53 (Ferbeyre et al., 2002; Ferbeyre et al., 2000) en ausencia de grandes lesiones en el DNA (Tabla R7). Tanto el aumento del mRNA y de proteína p53 (Figuras R17, R18A y D1), la estabilización de proteína p53, como la activación transcripcional del gen *p21<sup>WAF1</sup>*, explica que el tratamiento de las células Jurkat T con 91 nM Daunorubicina culmine en la muerte de las células por apoptosis y necrosis (Figura R14), destino final de las células senescentes (Figura R7), al menos en fibroblastos humanos (Seluanov et al., 2001). Estos resultados confirman que, a diferencia de la apoptosis, la principal diana transcripcional de p53 durante los procesos de senescencia celular es el gen *p21<sup>WAF1</sup>* (Chen et al., 2000; Donehower, 2002). Por otro lado, la sobreexpresión del gen *N-Ras* se ha relacionado con la senescencia celular (Chang et al., 1999a; Ferbeyre et al., 2002; Ferbeyre et al., 2000). La principal diferencia entre los tratamientos con dosis diferentes de Daunorubicina son los cambios en los niveles transcripcionales de los genes correspondientes a las ciclinas D3 y E, así como su regulador, la proteína p16 (Figura D1 y Anexo I). El tratamiento con la dosis IC<sub>75</sub> para la Daunorubicina aumenta los niveles de los transcritos correspondientes a la *ciclina E*, mientras que la expresión de *p16* se reduce (véase Anexo I). La pérdida de la actividad de la ciclina E, junto con el aumento de los niveles de p53 y ATM concuerda con la parada de las células en la fase G<sub>1</sub>/S y la muerte rápida por apoptosis (Figuras R3 y R14). Por el contrario, el tratamiento con la dosis IC<sub>50</sub> provocó el aumento de los niveles de RNA de las *ciclinas D3 y E*, y la disminución de su inhibidor, la proteína *p16*, cambios que junto al aumento de los niveles de *p53*, *ATM*, *N-Ras* y *p21<sup>WAF1</sup>*, *Rb* y *cdc25A* (véase Anexo I), pueden explicar la progresión a través de la fase G<sub>1</sub>/S, la parada de tipo senescente en G<sub>2</sub>/M y la muerte de las células por necrosis y apoptosis (véase Resultados) y (Chen et al., 2000; Ferbeyre et al., 2002; Schmitt et al., 2002).

El tratamiento de las células Jurkat T con la dosis IC<sub>75</sub> para la WP631 reduce los niveles de mRNA correspondientes a los genes *c-myc* y *p53* (Figura D1 y Anexo I). Este resultado coincide con experimentos de *Northern blot* que demuestran que la WP631 induce la reducción de los niveles de mRNA de *c-myc* y *p53* en células Jurkat T

(Villamarín et al., 2002), así como con los resultados obtenidos mediante RT-PCR semicuantitativa (Figura R17). Confirmamos que los cambios a nivel de RNA de los genes *c-myc* y *p53* se traducen en cambios a nivel de proteína (Figura R18). La acumulación de las células en la fase G<sub>2</sub>/M en respuesta a antitumorales está asociada a la reducción de la expresión de *c-myc* aunque, en última instancia, son los niveles de *p53* los que determinan la duración de la parada y la apoptosis (Chen et al., 1996; Enoch and Norbury, 1995). La reducción de la actividad de *p53* junto con el aumento de los niveles de la ciclina D y la reducción de su inhibidor, *p21<sup>WAF1</sup>*, así como el aumento de la expresión de los genes *Rb*, *E2F*, *p130* y *N-Ras* (Figura D1 y Anexo I) explica que la WP631 induzca la catástrofe mitótica en las células Jurkat T (Figuras R3, R9, R13 y R14) y (Bunz et al., 1998; Shay and Wright, 2004; Villamarín et al., 2002; Villamarín et al., 2003). Nuestros resultados demuestran que la WP631 reduce los niveles de mRNA y de proteína *p53* en las células Jurkat T haciendo que se comporten como células *p53<sup>-/-</sup>*, hecho que encaja con la idea de que la pérdida de *p53* juega un papel central en la catástrofe mitótica (Roninson et al., 2001). Probablemente la reducción del RNA correspondiente a *c-myc* se debe al efecto directo de la WP631 sobre la unión del factor de transcripción Sp1 a su promotor (Vaquero and Portugal, 1998; Villamarín et al., 2002). Se ha descrito que c-Myc es una proteína transactivadora del promotor de *p53*, que carece de lugares de unión para Sp1 (Reisman et al., 1993; Tuck and Crawford, 1989; Villamarín et al., 2002), por lo que la inhibición de la transcripción de *p53* puede ser un efecto indirecto derivado de la reducción de los niveles de c-Myc (Villamarín et al., 2002).

Se ha demostrado claramente que la WP631 es un inhibidor muy potente de la transcripción activada por Sp1 *in vitro* (Martín et al., 1999). Sin embargo, la eficiencia de algunos fármacos se reduce conforme las condiciones del ensayo son más complejas (Chiang et al., 1998; White et al., 2002), así como la interpretación de los resultados que se obtienen. Aunque un promotor contenga un sitio de unión para Sp1, es prácticamente imposible predecir el efecto de la WP631 sobre un gen en concreto. Los resultados obtenidos con los *arrays* de cDNA son un buen ejemplo de esta situación (Anexo I), ya que el tratamiento con WP631 no reduce la expresión de todos los genes regulados por Sp1 presentes en las membranas. Por otro lado se observan casos de genes regulados por Sp1 cuya expresión se reduce en presencia de la Bisantraciclina (como, por ejemplo, *c-myc*), aumenta (caso del gen *p21<sup>WAF1</sup>*) o no varía (como el gen constitutivo *GAPDH*,

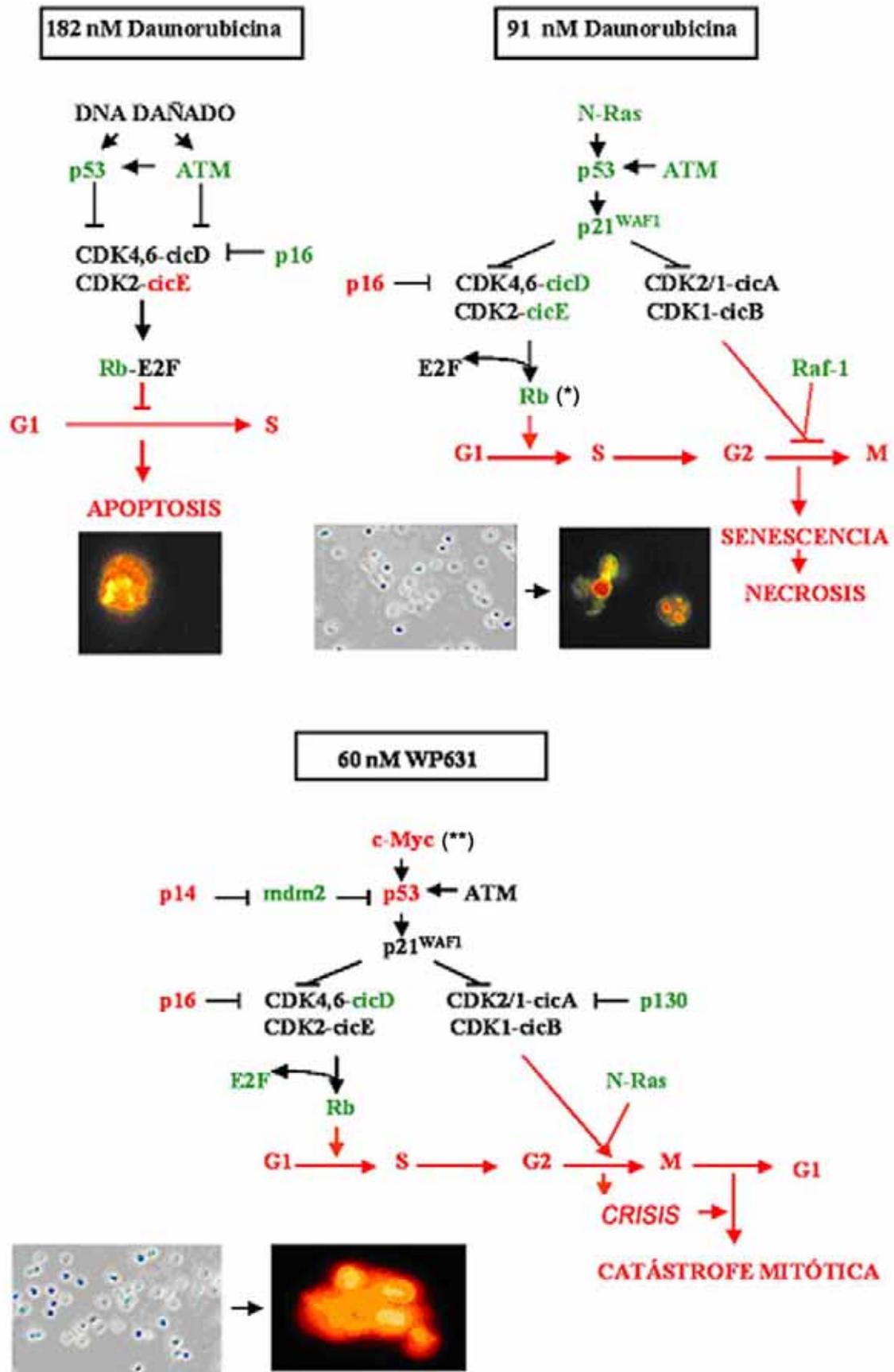
por ejemplo), así como genes que no están regulados por Sp1, como por ejemplo *p53*, pero que su expresión disminuye en presencia de WP631. Hemos considerado que la capacidad de la WP631 de inhibir la transcripción dependiente de Sp1 en un gen concreto está determinada por los siguientes parámetros:

(i) La posición del sitio de unión de Sp1 con respecto al lugar de inicio de la transcripción.

(ii) La secuencia concreta del sitio de unión de Sp1 en ese gen. Aunque el factor Sp1 reconoce la secuencia consenso 5' (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' (Briggs et al., 1986; Martín et al., 1999), el factor de transcripción reconoce dianas degeneradas. La efectividad de la WP631 desplazando a la proteína Sp1 de su lugar de unión en el DNA depende de la presencia en esos sitios de la composición de las secuencias ricas en CG, donde la Bisantraciclina puede unirse con diferentes afinidades (Fox et al., 2004; Leng et al., 1998). Se ha demostrado que la WP631 es un inhibidor muy potente de la transcripción cuando el lugar de unión del factor Sp1 contiene la secuencia canónica de 6 pb con CG en sus extremos, de alta afinidad para la Bisantraciclina (Gaidarova and Jiménez, 2002; Mansilla et al., 2004). Sin embargo, la WP631 es también un potente inhibidor de la transcripción dependiente de Sp1, incluso en ausencia de lugares canónicos de 6 pb (Botella et al., 2001; Inge et al., 2002; Martín et al., 1999). Estos resultados sugieren que la unión de la Bisantraciclina a secuencias de más de 6 pb con CG en sus extremos, podría estar facilitada por la torsión en el DNA que provoca la unión del factor Sp1 (Marco et al., 2003; Martín et al., 1999; Sjøttem et al., 1997). Por otro lado, la WP631 puede monointercalarse en secuencias CG e interferir con la unión del factor Sp1 a su diana génica aunque con una afinidad mucho menor (Fox et al., 2004; Leng et al., 1998). La Figura D2 esquematiza diferentes situaciones en las que la unión de la WP631 a secuencias ricas en CG (con diferentes afinidades), provoca el desplazamiento del factor Sp1 de su lugar de unión en el DNA.

---

**Figura D1.** Tres rutas que relacionan los perfiles de expresión génica diferencial de células Jurkat T tratadas con 182 nM Daunorubicina (su  $IC_{75}$ ), 91 nM Danorubicina (su  $IC_{50}$ ) ó 60 nM WP631 (su  $IC_{75}$ ), con las respuestas celulares observadas: apoptosis, senescencia y catástrofe mitótica (véase Resultados). Las rutas están basadas en los cambios en los perfiles de expresión génica observados, tras el análisis de los *arrays* de cDNA (véase Anexo I) y la capacidad de las diferentes Antraciclinas y dosis de provocar lesiones en el DNA (Tabla R7). +, activación; -, inhibición. Los genes que no se encuentran presentes en las membranas Human Oncogene and Tumor Suppressor Atlas Arrays (Clontech) o, cuyos cambios han quedado fuera de los criterios de exclusión (véase materiales y Métodos), se indican entre paréntesis. (\*), cambio validado mediante RT-PCR semicuantitativa (véase Mansilla et al., 2003); (\*\*), cambio validado mediante RT-PCR semicuantitativa y *Northern blot* (véase Resultados y Villamarín et al., 2002).



(iii) La tasa transcripcional del gen. La tasa transcripcional de los genes constitutivos, como la *GAPDH*, es muy alta de manera que su expresión no se ve afectada por la presencia de WP631 (Villamarín et al., 2002).

(iv) La presencia de rutas génicas en el interior de las células. Por ejemplo, la WP631 redujo la transcripción del gen *c-myc*, que está regulado por Sp1, y cuyo producto controla positivamente la transcripción de *p53* (Reisman et al., 1993), que carece de sitios Sp1 en su promotor (Tuck and Crawford, 1989; Villamarín et al., 2002)

(v) El desconocimiento de la totalidad de factores involucrados en la regulación transcripcional de todos los genes. Para solventarlo utilizamos el programa de predicción TESS (véase Materiales y Métodos) para determinar los sitios potenciales de unión del factor de transcripción Sp1 en las regiones promotoras analizadas. Nos encontramos el problema de que, dependiendo de la astringencia aplicada, el número de lugares Sp1 potenciales era altamente variable.

(vi) La competencia entre muchos factores de transcripción por la misma secuencia de unión o por regiones solapadas en el DNA. Por ejemplo, la proteína Sp3 se considera un factor de transcripción bifuncional porque puede actuar como activador transcripcional y como represor de la transcripción activada por Sp1, compitiendo por la misma secuencia de unión en el DNA (Hagen et al., 1994; Majello et al., 1994; Udvardi et al., 1993). En el último caso se sabe, por ejemplo, que la relación Sp1/Sp3 intracelular modula la transcripción del promotor GLUT1 durante la miogénesis (Fandos et al., 1999; Viñals et al., 1997).

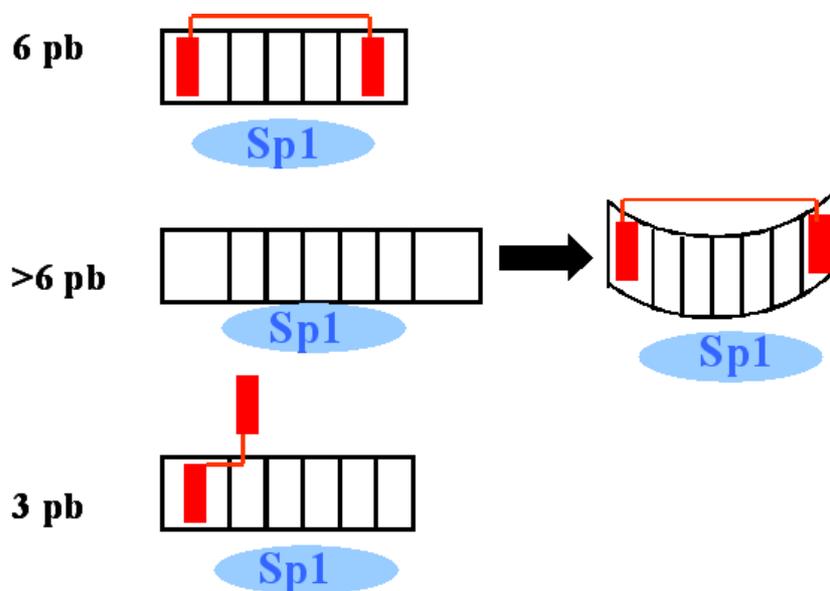
En esta memoria hemos demostrado alguno de los efectos específicos de los factores Sp1 y Sp3, y la Bisantraciclina WP631 sobre el promotor GLUT1 silvestre (wtGLUT1) y sobre un promotor mutado (mut2GLUT1). Para diseccionar el efecto de la Bisantraciclina sobre la transcripción dependiente de Sp1 y Sp3 (ver Figura R28), hemos aprovechado que el promotor mutado carece del lugar de unión para Sp3 (Fandos et al., 1999) y contiene la secuencia CGATCG, de alta afinidad para la WP631 (Fox et al., 2004; Hu et al., 1997; Robinson et al., 1997).

Hemos analizado la actividad transcripcional dirigida por los promotores wtGLUT1 y mut2GLUT1 en las células Jurkat T, en diferentes condiciones (Sp1 y Sp3 endógenos, y Sp1 y Sp3 sobreexpresados) (Figura R28). Se ha descrito que Sp1 es un factor de transcripción muy abundante en las células Jurkat T (Noti et al., 2000), hecho que puede limitar la respuesta de las células a la presencia de Sp1 adicional

(sobrexpresado), a pesar de que 24 horas después de haber realizado las transfecciones, el incremento del factor Sp1 fuera de un 12% (Figura R27). Por este motivo, no observamos un incremento de la actividad CAT dirigida por el promotor GLUT1wt al sobreexpresar la proteína Sp1 (Figura R28, ver barras wt y a). Se decidió modificar la relación Sp1/Sp3 intracelular en las células Jurkat T, mediante la transfección de plásmidos de expresión (ver Figura R28), para crear diferentes escenarios de actividad transcripcional (Sp1>Sp3, Sp1=Sp3, Sp1<Sp3). Cuando se sobreexpresó el factor Sp3 se redujo la relación Sp1/Sp3, inhibiéndose la transcripción del promotor wtGLUT1, incluso en presencia de Sp1 sobreexpresado (Figura R28, ver barras e e i). Este resultado coincide con observaciones previas que demuestran que el estado transcripcional del promotor GLUT1 está mediado por la proporción de las proteínas Sp1 y Sp3 presentes en las células (Fandos et al., 1999; Okamoto et al., 2001; Viñals et al., 1997). Hemos demostrado claramente que la unión de Sp1 o Sp3 a regiones solapadas en el DNA, no sólo depende de las concentraciones relativas de los factores en el interior de las células, sino que la competencia también viene determinada por la afinidad de las proteínas a sus regiones de unión en el DNA. Por ejemplo, la sobreexpresión del factor Sp1 aumentó la actividad transcripcional del promotor mut2GLUT1 con respecto a la activación basal (Figura R28, ver barras mt y c), resultado que está de acuerdo con que el factor Sp1 se une “peor” a la secuencia mutada (Figura R29). Por otro lado, el cambio de secuencia en el promotor mutado implica la pérdida de la capacidad de unión del factor Sp3 (Fandos et al., 1999), hecho que explica porqué la sobreexpresión del factor Sp3 no tuvo ningún efecto sobre el promotor mut2GLUT1 (Figura R28, ver barras mt y k).

La efectividad de la WP631 depende de dos parámetros: las concentraciones relativas de los factores Sp1 y Sp3 en el interior de las células, y la afinidad, tanto de los factores de transcripción, como de la Bisantraciclina, por su sitio de unión en el DNA, que es diferente en los promotores wtGLUT1 y mut2GLUT1 (ver Figura R28). Se ha demostrado que la WP631 se une “mejor” al promotor mut2GLUT1 (Figura R29), que contiene una secuencia de unión de alta afinidad para la Bisantraciclina (Figura M8). Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio demuestran la fuerte capacidad de la WP631 para desplazar al factor de transcripción Sp1, incluso en ausencia de lugares canónicos de 6 pb (Martín et al., 1999), lo que sugiere que la unión de la Bisantraciclina al DNA estaría facilitada por la torsión en el DNA que provoca la unión

del factor Sp1 (Sjøttem et al., 1997). Por este motivo, se necesitan concentraciones más elevadas de WP631 para desplazar la unión del factor Sp1 del promotor wtGLUT1 (Figura R29).

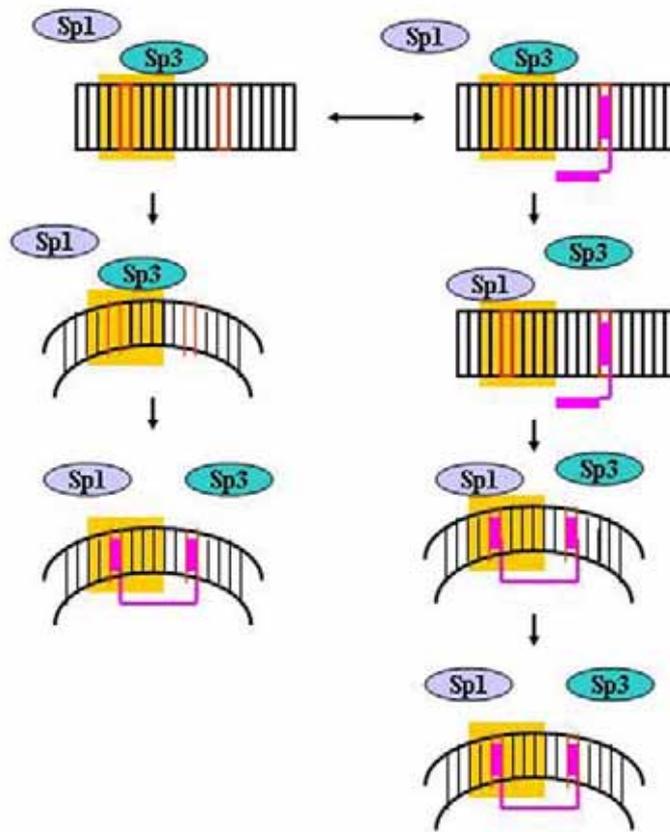


**Figura D2.** Modelos esquemáticos que ilustran modos alternativos de interacción de la WP631 con el DNA, y su capacidad de competir con el factor de transcripción Sp1. En el primer modelo, la WP631 se bisintercala con alta afinidad en la secuencia canónica de 6 pb con CG en sus extremos, y compite con el factor de transcripción Sp1. En el segundo modelo, la unión del factor Sp1 al DNA provoca la curvatura del DNA por el surco mayor, facilitando la bisintercalación de la WP631 en secuencias de más de 6pb. Cuando la WP631 se bisintercala en el DNA, desplaza al factor Sp1 de su lugar de unión. En el tercer modelo, la WP631 se une al DNA por monointercalación en secuencias CG, aunque con una afinidad mucho menor, interfiriendo con la unión del factor Sp1 a su secuencia.

Los experimentos realizados con el promotor wtGLUT1, cotransfectando Sp1 y Sp3, demuestran que en esta condición, la WP631 no es capaz de suprimir la actividad transcripcional (Figura R28, ver barras i y j). Estos resultados indican que la presencia de WP631 y Sp3 en exceso no ejercen un efecto sinérgico, inhibiendo completamente la actividad transcripcional del promotor wtGLUT1, sino que se establece una competencia entre el factor de transcripción y el fármaco, por el lugar de unión en el DNA. En la Figura D3 se propone un modelo para explicar esta situación. La unión de Sp3 al surco mayor podría provocar la torsión del DNA, facilitando la unión de la WP631 y el desplazamiento del factor de transcripción (Figura D3). Este modelo está basado en observaciones previas sobre la formación de los complejos Sp1-WP631-DNA

(Martín et al., 1999). En cualquier caso, la torsión que provoca en el DNA la unión de los factores Sp1 y Sp1 depende de la secuencia concreta (Marco et al., 2003). La WP631 es una molécula flexible y puede monointercalarse en secuencias CG, aunque con menor afinidad que cuando se bisintercala en secuencias de 6 pb con CG en sus extremos (Leng et al., 1998). La Figura D3 ilustra la situación en que la WP631 se monointercala en las secuencias CG adyacentes al lugar de unión de Sp3, presentes en el promotor wtGLUT1 (ver Figura M8). La monointercalación de la WP631 provoca el desenrollamiento del DNA (Hu et al., 1997), pudiendo alterar la afinidad del factor Sp3 por su lugar de unión. Esto permitiría la unión de Sp1 al DNA, con mayor afinidad que Sp3. En este modelo, la bisintercalación de la WP631 estaría favorecida por la interacción del factor Sp1 con el DNA (Martín et al., 1999).

Merece la pena remarcar que la WP631 se ha comercializado como inhibidor del factor Sp1, gracias a los experimentos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio (Martín et al., 1999). La WP631 se puede obtener actualmente en las casas comerciales Alexis (número de catálogo ALX-380-074), Calbiochem (número de catálogo 681700), Sigma (número de catálogo W3763) y AG Scientific (número de catálogo W1024). Aunque a partir del momento de su comercialización, numerosos resultados experimentales demostraron que la WP631 también es un inhibidor de la transcripción dependiente de Sp1 *in vivo* (Botella et al., 2001; Gaidarova and Jiménez, 2002), en este trabajo hemos demostrado por primera vez que WP631 compite con los factores de transcripción Sp1 y Sp3, e inhibe la transcripción dependiente de Sp1 *in vivo* (Figura R28), a las mismas concentraciones capaces de inducir la catástrofe mitótica en las células Jurkat T (Figuras R3, R9 y R13 y R14). La dosis usada, 60 nM (IC<sub>75</sub> en las células Jurkat T) es la misma que inhibe el 50% de la transcripción activada por Sp1 *in vitro* (Martín et al., 1999). Nuestros resultados confirman que parte los efectos celulares de la WP631 observados en la líneas Jurkat T (véase Resultados) dependen de la interferencia con el factor de transcripción Sp1.



**Figura D3.** Modelo esquemático que ilustra los efectos de la WP631 sobre la actividad transcripcional del promotor wtGLUT1 cuando se sobreexpresan los factores de transcripción Sp1 y Sp3, basado en los resultados presentados en la Figura R28 (compárense los resultados de las barras i, j y a). Hemos considerado que la unión de los factores Sp1 y Sp3 provoca la torsión del DNA (Sjøttem et al., 1997) y cambia la estructura del DNA, permitiendo la bisintercalación de la WP631. La WP631 desplaza a los factores Sp1 y Sp3 porque, como consecuencia de la intercalación, se desenrolla el DNA, cambiando la afinidad de Sp1 y Sp3 por sus secuencias de unión.

**Apoptosis, senescencia o catástrofe mitótica como mecanismos de muerte celular inducida por Antraciclina**

Durante mucho tiempo se ha aceptado que los fármacos antitumorales que actúan uniéndose al DNA, inducen la muerte de las células cancerosas lesionando el DNA y activando el programa de apoptosis dependiente de *p53* (Brown and Attardi, 2005; Brown and Wouters, 1999). Por este motivo, se ha tendido a considerar que aquellas células tumorales que puedan evadir la apoptosis, por ejemplo porque el gen *p53* está mutado, son resistentes a la quimioterapia. Sin embargo, durante los últimos años esta hipótesis se ha puesto en entredicho, dado que numerosos resultados experimentales demuestran que la sensibilidad de los tumores no siempre puede correlacionarse con el estatus funcional de *p53* ni el grado de apoptosis (Brown and Attardi, 2005; Brown and

Wouters, 1999). A lo largo de esta memoria hemos demostrado que las Antraciclínas pueden ejercer su actividad citotóxica a través de mecanismos diferentes a la apoptosis. Nuestros resultados indican que la ausencia de apoptosis no protege a las células cancerosas de la muerte inducida por Antraciclínas, sino que éstas deben superar varias “barreras” para ser resistentes a los tratamientos, y que, según la línea celular, el descenso de la tasa de apoptosis puede compensarse con el aumento de la fracción de células senescentes o que mueren por catástrofe mitótica (véase Resultados) (Brown and Attardi, 2005; Brown and Wouters, 1999; Roninson et al., 2001). Aunque la apoptosis es un mecanismo de muerte celular rápido y la pérdida de funcionalidad de *p53* puede asociarse a una mayor agresividad en los tumores (Brown and Wouters, 1999), hemos demostrado que la ausencia de apoptosis no afecta a la sensibilidad de las células a los tratamientos. Las células pueden responder a los tratamientos induciendo senescencia o catástrofe mitótica, fenómenos que a diferencia de la apoptosis, pueden ser independientes de *p53* (véase Resultados) y (Roninson, 2002; Roninson et al., 2001).

Senescencia y catástrofe mitótica pueden suponer una alternativa a la hora de abordar nuevas terapias antitumorales, especialmente en el tratamiento de tumores sólidos, dado que la mayoría de ellos tienen defectos en la vía de la apoptosis (Brown and Wouters, 1999; Roninson et al., 2001). Mientras que se han identificado numerosas proteínas que forman parte de la vía de la apoptosis, hoy en día aún no se conocen genes específicos involucrados en las vías de la senescencia acelerada y la catástrofe mitótica, más allá de algunas proteínas cuya función primordial es la regulación de los puntos de control celular (Roninson et al., 2001). En este sentido, las publicaciones científicas sobre el papel de *p53* y *p21<sup>WAF1</sup>* en estos procesos son escasas y, a menudo, contradictorias, así como el papel de las caspasas durante la catástrofe mitótica (véase Introducción).

Dada esta controversia, y con tal de unificar entre sí las teorías propuestas por los diferentes grupos y situarlas en el contexto de nuestros resultados, en la Figura D4 se presentan las diferentes situaciones que podrían explicar las respuestas celulares observadas. Nuestros resultados indican que, en el fondo, senescencia y catástrofe mitótica engloban un conjunto de procesos que culminan en la muerte de las células, y cuya diferencia radica seguramente en la combinación de los puntos de control funcionales, del tipo celular y del estímulo que los desencadena (véase Resultados). Según este modelo, cuando se lesiona el DNA de las células en interfase y los genes

ATM, p53 y de sus dianas son funcionales, la activación de ATM y p53 puede inducir la apoptosis o la senescencia celular desde G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub> (Brown and Wouters, 1999; te Poele et al., 2002). Hemos demostrado que el tratamiento de las células Jurkat T con 182 nM Daunorubicina induce la apoptosis, mientras que la mitad de la dosis, 91 nM, induce mayoritariamente la senescencia celular (véase Resultados). Hemos comprobado que las dos dosis de Daunorubicina inducen la activación de p53 y ATM (véase Anexo I, Tabla R6 y Figura D1), pero sólo la dosis menor se asocia al aumento de los niveles de p21<sup>WAF1</sup> (Anexo I y Figura R18A). Nuestros resultados encajan con la idea de que la principal diferencia entre apoptosis y senescencia son las dianas transcripcionales de p53; mientras que durante la apoptosis activa la transcripción de *Bax*, la principal diana de p53 durante la senescencia es el gen *p21<sup>WAF1</sup>* (Bree et al., 2002; Donehower, 2002).

Se ha descrito que el hecho de que las células induzcan apoptosis o senescencia depende de la dosis de fármaco usada (Bladier et al., 1997; Chang et al., 1999b). Posiblemente esto está relacionado con la intensidad de las lesiones que se producen en el DNA y está de acuerdo con la capacidad de las diferentes dosis de Daunorubicina de producir lesiones en el DNA (Tabla R7). Hemos comprobado que las células senescentes mueren con el tiempo por necrosis (véase Resultados) de acuerdo con resultados previos (Bree et al., 2002; Seluanov et al., 2001). Si bien se ha descrito que las células senescentes pueden morir también por catástrofe mitótica (Chang et al., 1999a; Roninson et al., 2001), nosotros no hemos encontrado ningún ejemplo de esta situación en las líneas celulares estudiadas en presencia de Antraciclinas. La Figura D4 ilustra también las respuestas celulares que se pueden producir cuando las lesiones en el DNA se producen durante la mitosis. El punto de control de salida de la mitosis se activa en respuesta a genotóxicos, parando las células en metafase (Castedo et al., 2004a; Huang et al., 2005). Esta parada es transitoria y parece no estar mediada por ATM, p53 ni p21<sup>WAF1</sup> (Castedo et al., 2004a). Después de la parada en metafase, las células que no han segregado los cromosomas ni han realizado la citocinesis, salen de la mitosis y entran en catástrofe mitótica (Castedo et al., 2004a; Huang et al., 2005). En este caso la catástrofe mitótica se caracteriza por la presencia de células con dos núcleos y una dotación 4n, que quedan permanentemente paradas en la fase G<sub>1</sub>, mediado por la activación de p53 y/o p21<sup>WAF1</sup>, que evita la progresión de las células con DNA dañado (Castedo et al., 2004a; Huang et al., 2005). Dado que p53 y p21<sup>WAF1</sup> son reguladores positivos de la senescencia (Chang et al., 2002; Roninson, 2002; Roninson et al., 2001),

la Figura D4 muestra que éste puede ser el destino final de las células tras la catástrofe mitótica (Huang et al., 2005), o alternativamente, cuando las lesiones en el DNA son muy severas, las células pueden morir por apoptosis (Huang et al., 2005; Lock and Stribinskiene, 1996), necrosis (Huang et al., 2005) o a través de micronucleación (Barboule et al., 1997). Cabe remarcar que en este trabajo no hemos encontrado ningún ejemplo que ilustre esta situación.

La Figura D4 muestra diferentes situaciones que se pueden dar cuando la funcionalidad de las vías de ATM y p53 está comprometida y se lesiona el DNA de las células en interfase o en mitosis. Hemos demostrado que el tratamiento de las células MDA-MB-231 con 2  $\mu$ M Doxorubicina induce la parada en G<sub>2</sub>/M de la mayoría de las células y la muerte desde la mitosis, que cursa con la activación de la caspasa-2 y la caspasa-3 (Tablas R4 y R5). Dado que la línea MDA-MB-231 carece de p53 funcional (D'Assoro et al., 2004) y que el tratamiento provoca la reducción de los niveles de mRNA y proteína p21<sup>WAF1</sup> (Figuras R17 y R19B), el tratamiento con Doxorubicina induce la acumulación transitoria de las células en G<sub>2</sub>/M y la entrada prematura en mitosis (Figura R3) y (Bunz et al., 1998; Roninson et al., 2001). Nuestras observaciones concuerdan con los resultados de Castedo y colaboradores, que han demostrado que después de la parada transitoria en G<sub>2</sub>, la catástrofe mitótica se produciría durante la mitosis, consecuencia de la activación de la caspasa-2 de manera independiente de p53, la salida del citocromo c de la mitocondria, y activación general de las caspasas (Castedo et al., 2004a; Castedo et al., 2004b). Éste es un ejemplo en que la catástrofe mitótica representa un caso especial de apoptosis independiente de p53 (Castedo et al., 2004a; Castedo et al., 2004b).

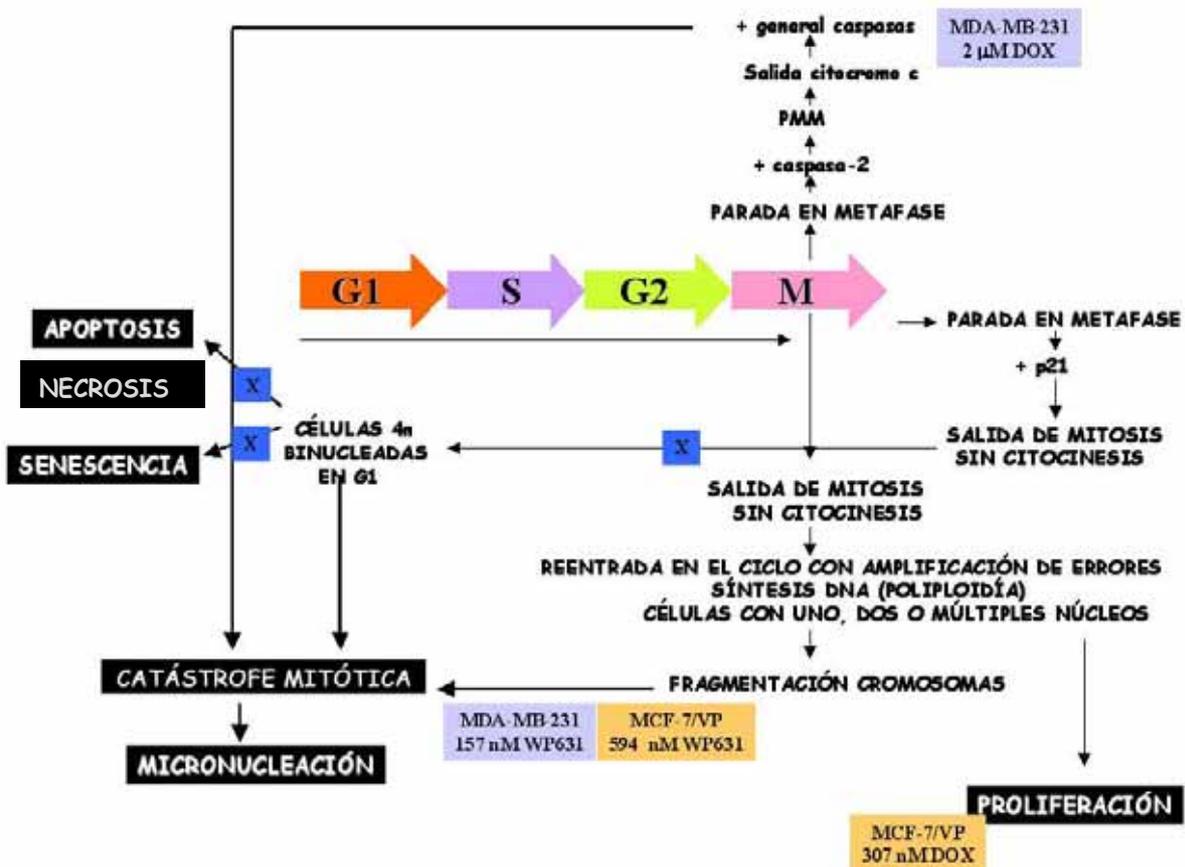
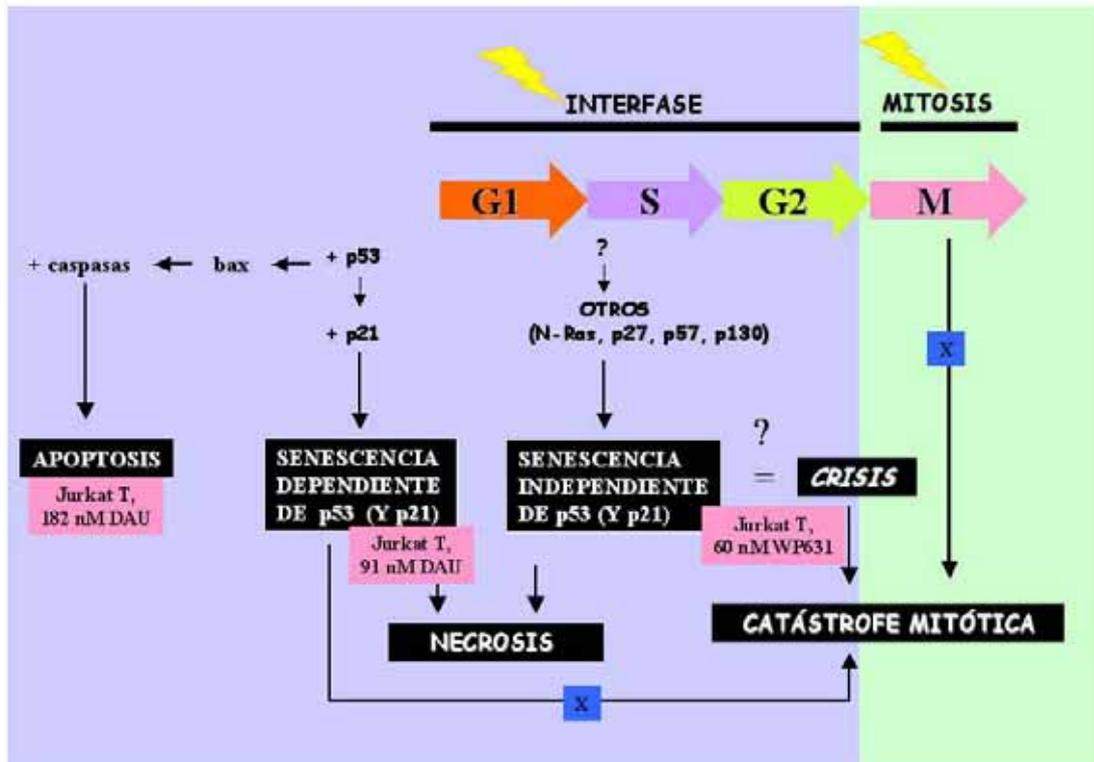
El tratamiento de las células MDA-MB-231 con 157 nM WP631 (IC<sub>75</sub>) provoca la reducción de los niveles de mRNA y proteína p21<sup>WAF1</sup> (Figuras R17 y R19B), lo que explica la acumulación transitoria de las células en G<sub>2</sub> (Figura R3) y (Bunz et al., 1998; Roninson et al., 2001). A diferencia del tratamiento con Doxorubicina, la WP631 no induce la activación de las caspasas-2 y -3 en las células MDA-MB-231 (Tablas R4 y R5), lo que favorece la salida de la mitosis sin haber segregado los cromosomas ni completado la citocinesis, resultando en la acumulación de células tetraploides en G<sub>1</sub> (Huang et al., 2005). La ausencia de p53 (D'Assoro et al., 2004) y la reducción de los niveles de p21<sup>WAF1</sup> (Figuras R17 y R19B) en las células MDA-MB-231 tratadas con WP631, se puede asociar a la reentrada en el ciclo celular, la síntesis de DNA, la

poliploidización y la inestabilidad cromosómica, así como la formación de células poliploides con dos o más núcleos (Figuras R3 y R10) y (Bunz et al., 1998; Castedo et al., 2004a; Huang et al., 2005). Esta observación concuerda con el hecho de que el tratamiento de las células MDA-MB con WP631 indujera con el tiempo la reducción del pico de células en G<sub>2</sub> y el aumento de la fracción de células poliploides (Figura R3). Posiblemente la muerte de las células MDA-MB-231 tratadas con WP631 se produce como consecuencia de la reentrada en el ciclo celular, que conduce a la amplificación de lesiones en el DNA, tras sucesivas mitosis. En este sentido, nuestros resultados conciben con ejemplos de catástrofe mitótica, que cursan con la fragmentación de los cromosomas y la formación de micronúcleos como resultado de la inestabilidad cromosómica que se produce después de varias mitosis aberrantes (Huang et al., 2005). Hemos observado que el tratamiento de las células MCF-7/VP con 594 nM WP631 también induce la acumulación de células tetraploides y poliploides (Figura R3). Por otra parte, hemos demostrado que este tratamiento se asocia al aumento de los niveles de mRNA y de proteína p21<sup>WAF1</sup> (Figuras R17 y R19B). Se ha descrito que la activación de p21<sup>WAF1</sup> favorece la salida de la mitosis de las células MCF-7 con DNA dañado y su acumulación en la fase G<sub>1</sub> con contenido en DNA de 4n (Barboule et al., 1997), resultado que encaja con nuestras observaciones. Hemos confirmado que los niveles de mRNA correspondientes al gen *p53* son elevados en las células MCF-7/VP (véase Resultados). Dado que los niveles de p53 son elevados en las células tumorales cuando el gen está mutado (te Poele et al., 2002), y aunque la línea MCF-7 contiene p53 funcional (D'Assoro et al., 2004; Gewirtz et al., 2000), es frecuente que durante los procesos de selección se produzcan mutaciones inactivadoras en el gen, como por ejemplo en las células MCF-7/Adr, seleccionadas con concentraciones crecientes de Doxorubicina (Robinson et al., 2004; Robinson and Shewach, 2001). Por este motivo y a partir de nuestros resultados, inferimos que probablemente el gen *p53* tampoco es funcional en la línea MCF-7/VP. El hecho de que las células MCF-7/VP tratadas con 594 nM WP631 no tuvieran las características fenotípicas de la senescencia (véase Resultados) encaja con la pérdida de p53 y la existencia de mecanismos de activación de p21<sup>WAF1</sup> independientes de p53 (Barboule et al., 1997). Hemos observado que, con el tiempo, la mayoría de las células MCF-7/VP tratadas con 594 nM WP631 pasan a ser poliploides (Figura R3), resultado que se puede correlacionar con que la activación de p21<sup>WAF1</sup> no puede compensar la pérdida de función de p53 (Bunz et al., 1998). Por este

motivo la parada de las células MCF-7/VP en G<sub>2</sub> (4n) es sólo transitoria y, dado que la ausencia de p53 favorece la síntesis de DNA (Bunz et al., 1998), se forman células poliploides (Figura R3). Estas células pueden realizar sucesivas divisiones aberrantes, que culminan en la fragmentación de los cromosomas y la muerte de las células (Huang et al., 2005).

Se ha descrito que en algunos casos la inestabilidad cromosómica no culmina en la muerte de las células, sino que favorece la proliferación y la oncogénesis (Castedo et al., 2004b), en una situación equivalente a nuestros resultados obtenidos con las células MCF-7/VP tratadas con 307 nM Doxorubicina (dosis IC<sub>50</sub>) (véase Resultados). Esta situación se esquematiza en la Figura D4. El tratamiento de las células MCF-7/VP con Doxorubicina induce la acumulación de células 4n y células poliploides multinucleadas (Figuras R3 y R12). Sin embargo, la mayoría de las células consigue completar la mitosis después de una semana de haber retirado el fármaco del medio de cultivo y siguen proliferando con normalidad (Figuras R3, R4 y R5, y Tablas R2 y R3).

El tratamiento de las células Jurkat T con 60 nM WP631 induce reducción de los niveles de c-Myc y p53 (Figuras R17 y R18), y la acumulación de células en G<sub>2</sub>/M con actividad SA-β-galactosidasa lisosomal a pH 6.0 (Figura R7), proceso que culmina con la muerte de las células por catástrofe mitótica (véase Resultados). Tal y como ilustra la Figura D4, se han descrito ejemplos de senescencia inducida en células tumorales sin p53 o p21<sup>WAF1</sup> funcionales (Chang et al., 1999a; Chang et al., 2002; Chang et al., 1999b; Wang et al., 2003). Desafortunadamente, se suele utilizar la tinción SA-β-galactosidasa lisosomal a pH 6.0 como único marcador de senescencia, pudiéndose confundir senescencia con *crisis* celular (véase Introducción). Hemos demostrado que las células Jurkat T tratadas con WP631 sintetizan DNA (Figura R8), confirmando que este tratamiento no induce senescencia, sino *crisis*, fenómeno que se relaciona con la pérdida de función del gen *p53* y que culmina con la muerte de las células por catástrofe mitótica (Donehower, 2002; Shay and Wright, 2004). En este caso, no se detectó la activación de las caspasas -2 y -3 durante la catástrofe mitótica (Tabla R4).



A partir de nuestros resultados, se puede concluir que las células con ploidía  $4n$  que hemos detectado (Figura R3) pueden ser células en  $G_2$ , en mitosis, o células en  $G_1$  después de una mitosis aberrante (Andreassen et al., 2001). También cabe considerar que las células  $4n$  pueden corresponder a células que están sufriendo catástrofe mitótica durante la metafase, o bien, ser el resultado de la fragmentación de las células poliploides tras la muerte por catástrofe mitótica.

En este trabajo se ha demostrado a través de diferentes aproximaciones experimentales que las Antraciclinas pueden inducir la senescencia y la catástrofe mitótica en diferentes líneas tumorales, confirmando que posiblemente la mayoría de las células tumorales retienen la capacidad de inducir, como mínimo, una de las tres respuestas. Por este motivo, las células tumorales tendrían que superar varios “mecanismos de seguridad” más allá de la apoptosis para ser resistentes a los tratamientos. Seguramente la efectividad de la quimioterapia es el resultado de la combinación de factores que regulan los procesos de apoptosis, senescencia y catástrofe mitótica (Chang et al., 1999a). Se han encontrado ejemplos de senescencia y catástrofe mitótica en modelos animales tratados con antitumorales y en biopsias de tumores, por lo que no parecen ser procesos restringidos a células en cultivo (Roninson et al., 2001; te Poele et al., 2002). Consideramos, en consecuencia, que el análisis en profundidad de los mecanismos moleculares que regulan estos procesos constituye una herramienta muy útil para poder interpretar la eficacia de los tratamientos antitumorales.

---

**Figura D4.** Modelos que ilustran las respuestas celulares frente al tratamiento con antitumorales. Cuando las vías de ATM y p53 son funcionales, las células en interfase pueden activar las vías de apoptosis o senescencia, dependiendo de la dosis del estímulo. Las células senescentes pueden morir por necrosis o por catástrofe mitótica. Si las células sufren lesiones en el DNA durante la mitosis, el punto de control de la salida de mitosis se activa, forzando la catástrofe mitótica. Como consecuencia, las células salen de la mitosis sin haber realizado la citocinesis y se acumulan en  $G_1$ , por acción de p53 y p21<sup>WAF1</sup>. Estas células pueden entrar en un proceso de senescencia, o morir por apoptosis o necrosis. Cuando se lesiona el DNA de células con defectos en las vías de ATM y p53, las células pueden sufrir senescencia independiente de p53 o *crisis*, proceso que culmina con la muerte de las células por catástrofe mitótica. Alternativamente, las células pueden entrar prematuramente en la mitosis con errores en el DNA y sufrir catástrofe mitótica. La catástrofe mitótica puede producirse durante la mitosis cuando se produce una activación general de las caspasas, o bien ser el resultado de la fragmentación de los cromosomas, tras varias mitosis aberrantes. Cuando las células tumorales pierden la capacidad de inducir apoptosis, senescencia o catástrofe mitótica, adquieren potencial oncogénico. Se indican las diferentes respuestas celulares observadas en este trabajo tras el tratamiento con Antraciclinas, así como ejemplos descritos en la literatura (indicados con X). Los modelos se basan en los resultados presentados en esta memoria y su relación con lo publicado por otros autores (las fuentes se ha referenciado a lo largo del texto).

### **Dianas de unión de la WP631 en el DNA: perspectivas para el diseño racional de fármacos**

A lo largo de este trabajo hemos demostrado que la Bisantraciclina WP631 es un agente antiproliferativo más eficaz que la Daunorubicina y la Doxorubicina y que la eficacia de la WP631 se debe, al menos en gran parte, a que es un inhibidor muy potente de la transcripción dependiente de Sp1 *in vivo* (véase Resultados). Las ventajas de la WP631 sobre las Antraciclinas Daunorubicina o Doxorubicina parecen radicar en las propiedades de unión al DNA de la molécula (Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997) .

La WP631 se bisintercala en secuencias ricas en C+G de mayor longitud (6-8 pb), lo que supone el aumento de la afinidad y de la especificidad del reconocimiento (Chaires et al., 1997; Hu et al., 1997). De esta manera, la constante de unión de la WP631 es del mismo orden de magnitud que la del factor de transcripción Sp1 por su secuencia consensus en promotores (Chaires et al., 1997; Martín et al., 1999). Hemos comprobado que moléculas como la WP631, que reconocen secuencias cortas en el DNA, son capaces de interactuar específicamente con el factor de transcripción Sp1 y modular la transcripción de genes concretos, incluso a concentraciones muy bajas (rango de nanomolar). Sin embargo, aunque la WP631 modula específicamente la transcripción de genes regulados por Sp1, se observan efectos pleiotrópicos, resultado de las interacciones de los productos génicos en las diferentes cascadas celulares (véase Resultados).

La WP631 establece interacciones adicionales con el DNA, mediadas por el ligando *p-xililo*, que contribuyen a la especificidad de la WP631 por las diferentes secuencias ricas en C+G (Hu et al., 1997). La WP631 reconoce preferentemente las secuencias CGTACG~CGTACG>>CGCGCG~CGGCCG (Fox et al., 2004; Mansilla and Portugal, 2002; Robinson et al., 1997). Hemos analizado las secuencias de 26 promotores correspondientes a diversos genes implicados en el control del ciclo celular (Tabla M4) para determinar con qué frecuencia se encuentran en el genoma humano los diferentes tramos ricos en CpG, dianas potenciales de la WP631. En todos los casos, las frecuencias observadas se alejan de las frecuencias que se esperarían si los nucleótidos se encontraran distribuidos al azar en el genoma (véase Materiales y Métodos) y (Beato, 1990). Las secuencias de 6 ó 7 pb donde la WP631 podría intercalarse no se encuentran al azar, y la frecuencia media observada es mucho menor a la esperada (Figura R30). Teóricamente un fármaco ideal es aquel capaz de reconocer una diana única.

---

Dado que si los nucleótidos se encontraran distribuidos al azar se requeriría un tramo de 15-16 pb para discriminar una secuencia única en el genoma (Beato, 1990), las dificultades a la hora de diseñar fármacos que reconozcan secuencias largas en el DNA sin impedimentos estéricos ni *mismatches* es evidente (Mansilla and Portugal, 2002). Por este motivo el número de fármacos que reconocen secuencias de más de 4 pb es limitado (Chaires, 1998), siendo la WP631 un avance significativo en el diseño de moduladores específicos de la transcripción (Mansilla et al., 2004; Martín et al., 1999).

En conjunto, nuestros resultados apuntan a la posibilidad de diseñar nuevas Bisantraciclinas que puedan establecer un mayor número de enlaces adicionales en el surco menor del DNA que la WP631. Esto incrementaría la selectividad y afinidad del fármaco por su secuencia de reconocimiento, haciendo posible que se reconozcan secuencias únicas en el genoma sin que éstas sean necesariamente tan grandes como se requeriría en caso de distribución de nucleótidos al azar (Thuong and Hélène, 1993). Las ventajas técnicas a la hora de sintetizar nuevos fármacos eficaces a partir de Antraciclinas ya en uso clínico son evidentes (Priebe et al., 2001). Esta estrategia elimina la dificultad que supone la síntesis de moléculas grandes, capaces de interaccionar específicamente con tramos largos en el DNA sin impedimentos estéricos. Es factible el diseño de moléculas que tengan constantes de unión al DNA del mismo orden de magnitud que la de los factores de transcripción, y que reconozcan secuencias específicas en el genoma, idealmente, secuencias únicas presentes en los genes “responsables de la patología”.

