

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**“MECANISMOS DE ACCIÓN ANTITUMORAL DEL METABOLITO
FÚNGICO GALIELLALACTONA Y SUS DERIVADOS
SEMISINTÉTICOS”**

Víctor García González

TESIS DOCTORAL

Córdoba, 2017

TITULO: *MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DEL METABOLITO
FUNGICO GALIELLALACTONA Y DERIVADOS SEMISINTÉTICOS*

AUTOR: *Víctor García González*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

**“MECANISMOS DE ACCIÓN ANTITUMORAL DEL METABOLITO
FÚNGICO GALIELLALACTONA Y SUS DERIVADOS
SEMISINTÉTICOS”**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biomedicina por

Víctor García González

Directores

Eduardo Muñoz Blanco y Marco Antonio Calzado Canale

Córdoba, 2017



TÍTULO DE LA TESIS: Mecanismos de acción antitumoral del metabolito fúngico Galiellalactona y sus derivados semisintéticos

DOCTORANDO/A: Víctor García González

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El doctorando Víctor García González ha realizado un importante trabajo de investigación durante el periodo de tiempo de desarrollo de su Tesis Doctoral. Su trabajo ha estado centrado en el estudio del mecanismo de acción antitumoral de la Galiellalactona, un metabolito de origen fúngico. Además ha realizado estudios de metabolómica y proteómica con el objetivo de identificar marcadores de respuesta al tratamiento con GL. Su trabajo se ha publicado en dos artículos científicos en las revistas Journal of Biological Chemistry (Q1) y en Oncotarget (Q1), siendo primer autor en este último. También es coautor de otros 3 artículos relacionados con compuestos naturales y señalización en cáncer. Un último artículo de su Tesis está en fase escritura.

Durante este periodo también ha presentado su trabajo en congresos internacionales y nacionales, en donde ha presentado sus resultados como primer autor.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, __21__ de __Junio__ de __2017__

Firma del/de los director/es

Fdo.: Eduardo Muñoz Blanco

Fdo.: Marco Antonio Calzado Canale

D. Eduardo Muñoz Blanco, Catedrático del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, y **D. Marco Antonio Calzado Canale**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

CERTIFICAN

Que **D. Víctor García González** ha realizado en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología bajo su dirección el trabajo titulado **“Mecanismos de acción antitumoral del metabolito fúngico Galiellalactona y sus derivados semisintéticos”** y que a nuestro juicio reúne los requisitos necesarios para optar al grado de doctor.

Y para que conste, firmamos el presente, en Córdoba a 24 de Junio de 2017.

“Hay, en verdad, dos cosas diferentes: saber y creer que se sabe. La ciencia consiste en saber; en creer que se sabe está la ignorancia”. Hipócrates

“El cerebro no es un vaso por llenar, sino una lámpara por encender”. Plutarco

“En la vida no existe nada que temer, sino cosas que comprender”. Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a Eduardo, mi director de tesis, por haberme dado la oportunidad de poder llevar a cabo este trabajo en un área de investigación tan fascinante como es el cáncer, por tu visión práctica, por tu esfuerzo al guiarme científicamente en los momentos más fáciles pero sobre todo en los más complicados, y también por contar conmigo para formar parte del grupo GC04.

Gracias a mi codirector de tesis, Marco, por todo lo que me has enseñado, por ayudarme a resolver cuestiones científicas, por tu participación e implicación en el trabajo desarrollado que queda plasmado en la presente tesis.

De forma global, quería destacar que ha sido muy gratificante coincidir con un equipo de trabajo como el GC04 y que, sin duda alguna, esta tesis no habría sido lo mismo sin su ayuda. La relación comenzó como meros compañeros de trabajo, pero con el tiempo se ha consolidado una gran amistad, formando parte de mi familia cordobesa y aportándome momentos memorables dentro y fuera del laboratorio.

Como olvidar los primeros meses en los que Juan Antonio me estuvo enseñando a manejarme por el laboratorio, aunque a veces te pongas muy exquisito, te doy las gracias por tu ayuda, por hacerme sentir integrado en el grupo y por tu sentido del humor.

A Irene, gracias por estar siempre predispuesta a ayudarme con lo que fuera necesario, por tu paciencia, por los momentos tan buenos que tuvimos con los ratones...y por las partidas de *risk* en las que también ha “colaborado” Raúl.

Gracias a Carmen Navarrete por hacer siempre un hueco para ayudarme, por transmitir tu sabiduría como veterana del grupo, por tus conversaciones en cultivos y también por ser partícipe de los buenos ratos que hemos pasado.

Gracias a Carmen Del Río, mi compi de poyata del laboratorio que aunque nos separe la barrera siempre hay comunicación, por aportar esa alegría al grupo, por tu ayuda con los ratones con esos momentos de gran tensión al extraer sangre y lo sé...te debo unas mallas nuevas que también han sufrido los daños colaterales de esta tesis.

Agradecer a Maribel por su predisposición a ayudarme, por ser amigos de “botellón” en la UAM sin saberlo y por compartir todos los momentos de la tesis que hemos pasado a la vez. También a Carla, por sus bromas que compensan las mías y que junto con Maribel son mis compañeras de *Western* y de sala. Gracias por los momentos que hemos compartido en la oscuridad con la máquina de revelado, las conversaciones en la sala y los buenos ratos que hemos pasado fuera del trabajo.

A Belén, que aunque sea un poco despistada, sabe aportar su granito de arena al buen ambiente de este grupo y he recibido tu ayuda siempre que la he necesitado.

Gracias a Paloma, por tu compañerismo, tú positividad y porque contigo es imposible aburrirse porque siempre hay algún tema de que hablar.

A Juan, porque enseñarte en la medida que he podido, ha sido un placer, por tu carácter y por transmitir ese buen rollo al grupo.

A Vero, por su bondad y carácter, que ha conseguido que estrechemos lazos con América y le hemos enseñado las costumbres *made in Spain*.

Agradecer la frescura que han traído Rosario y Jessica, así como al resto de compañeros que han pasado por el GC04: Curro, Rafa, Paula, Nieves, Maribel, Carmen y Miguel que han dejado su huella, he aprendido de ellos y han dejado buenos momentos.

Agradecer a Rosario su amabilidad, su cercanía y porque siempre te recibe con una sonrisa.

También quiero destacar la ayuda recibida por parte del equipo de Proteómica del IMIBIC, Nacho y Edu, por enseñarme el mundo de la proteómica y por su disponibilidad y paciencia para explicarme lo concerniente a ésta.

Agradecer al equipo de InnoHealt group: Eduardo, Carolina y en especial, a Noel y Martín por ese gran acogimiento por su parte y su dedicación por ayudarme a analizar y desenmarañar esa enorme cantidad de datos de proteómica y metabolómica.

Gracias al Dr. Olov Sterner por su colaboración con nuestro grupo y por la ayuda prestada para poder llevar a cabo este trabajo.

Agradecer al Dr. Raul M. Luque, y especialmente a Juanma por su colaboración en el aporte de algunas de las líneas celulares utilizadas en esta tesis.

A Esther, por transmitir sus conocimientos de microscopía y citometría y ayudarme en la realización de estas técnicas. A Antonio, por su experiencia y su dedicación para enseñarme la parte de Histología.

Gracias a Patxi por tus consejos y tú forma de ver la ciencia. Y también al resto de compañeros del IMIBIC que de alguna forma han ofrecido su colaboración y su compañerismo durante mi tesis, especialmente a los compañeros de Fisiología.

A la Dra. Yolanda Loarce, por sus consejos, su conocimiento y por la bondad y el cariño que me has transmitido siempre.

En el ambiente no académico, quería agradecer a todos mis amigos por todas las buenas experiencias pasadas que hemos compartido juntos y que sin duda mi vida no hubiera sido tan divertida sin ellos. A los amigos de Sanfer, Coslada, del Joyfe, al equipo

brains del máster, a los amigos de Nicaragua y en especial a los de la Universidad de Alcalá (Sergio, Pichona, Irene, Cris, Helen, Lourdes, Germán, Luisen, Forni, Emi, Mery, Raquel, Sandra, Natalia, Miki, Héctor y Kike así como Chechu y Richo que ya os considero del grupo de Biología). En especial, gracias a Ric, Cris, Sabri, Salgu, Lidia, Jorge, Lore y Bego por su amistad y por haberme hecho sentir un poquito más cerca de los amigos madrileños.

Gracias por el acogimiento y el cariño que he recibido por parte de mi familia política Mari Carmen, Pepe y Sus por hacerme sentir uno más de la familia, y también, de Manoli, Satur, Loli, Iván y las peques Jara y Celia, así como los primos *granaiños* Isa y Martín. Gracias a todos por hacerme participe de los buenos momentos que hemos pasado juntos.

A mis abuelos, Auri y Felipe, porque sois geniales; gracias por saber y querer cuidarme cuando era pequeño...y no tan pequeño, por vuestra forma de ser y vuestra sonrisa.

A Dianita, la mejor hermana del mundo que he podido tener, gracias por animarme en la adversidad y por compartir y regalarme tan buenos momentos de mi vida, por ser un ejemplo a seguir y por estar tan unidos siempre. Gracias a Manu por saber instruirnos a toda la familia en los juegos de mesa y por formar parte de nuestra familia.

Gracias a Estrella, mi pequeña alma gemela, a pesar de compartir casi las 24 horas del día juntos, en lo personal y en lo laboral, siempre me sabe a poco. Esta tesis también es fruto de tu apoyo y ayuda. Gracias por ser tan especial, por aguantarme en los malos momentos, por ayudarme fuera y dentro del laboratorio, por cuidarme y dejar que te cuide, por todos los momentos increíbles que hemos pasado y por los que nos depara el futuro. Caminar junto a ti es una de las cosas maravillosas de esta vida.

Por último a mis padres, Miguel Ángel y María Pilar, os estaré eternamente agradecido porque gracias a vosotros soy como soy y he podido llegar hasta aquí. Gracias por enseñarme los valores importantes de la vida, por ayudarme incondicionalmente cuando lo he necesitado y cuando no, por estar siempre apoyándome, por los buenos momentos tan felices que me habéis aportado y porque aun estando un poco lejos de vosotros siempre conseguís que os sienta cerca. Me siento afortunado de teneros como padres y por eso, un pedacito de esta tesis también es vuestra.

Gracias a todos los que habéis hecho que mis sueños se hagan realidad.

ÍNDICE

Agradecimientos	11
Abreviaturas	21
Resumen	25
I. Introducción	31
1. Cáncer de próstata	33
1.1 Conceptos generales y prevalencia	33
1.2 Mecanismos moleculares implicados en cáncer de próstata	34
1.3 STAT3 en cáncer de próstata	39
1.4 NF- κ B en cáncer de próstata	42
1.5 Ciclo celular y cáncer	47
2. Quimioterapia en cáncer	52
2.1 Tipos de quimioterápicos empleados en cáncer de próstata	52
2.2 Inducción del daño al ADN	54
3. Marcadores y nuevas dianas moleculares en cáncer de próstata	56
3.1 Necesidad de nuevos marcadores y dianas terapéuticas	56
3.2 Metabolómica en cáncer de próstata	57
3.3 Proteómica en cáncer de próstata	60
4. Galiellalactona	65
4.1 Definición y mecanismo de acción	65
II. Objetivos	69
III. Materiales y métodos experimentales	73
1. Líneas celulares	75
2. Análisis del ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo	76
3. Detección de proteínas por <i>Western blot</i>	76
4. Ensayo de viabilidad por MTT	79
5. Inmunocitoquímica	79
6. Medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno	79
7. Ensayo de cicatrización de la herida	80
8. Electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)	80
9. Modelo animal de xenoinjertos con células DU145 de cáncer de próstata .	81
10. Inmunohistoquímica	82
11. Producción de lentivirus e infección de células hospedadoras	83

12. Experimentos de silenciamiento y sobreexpresión de proteína	84
13. Ensayos de actividad transcripcional	85
14. Análisis de proteómica	86
15. Análisis de metabolitos en plasma de ratones xenoinjertados	88
16. Librería de análogos de Galiellalactona.....	89
17. Análisis estadístico	91
IV. Resultados	95
1. Efectos antitumorales del metabolito fúngico GL en cáncer de próstata	97
1.1 GL inhibe la actividad de NF- κ B y STAT3 a nivel transcripcional ...	99
1.2 GL detiene la progresión del ciclo celular en la fase G ₂ /M en las células DU145 de cáncer de próstata	100
1.3 La parada de ciclo celular en G ₂ /M inducida por GL afecta principalmente a las líneas celulares andrógeno-independientes de cáncer de próstata	102
1.4 GL también induce la parada de ciclo celular en líneas celulares tumorales derivadas de otros tipos de cáncer	103
1.5 El tratamiento con GL no causa mielodepresión ni altera el ciclo celular en células no tumorales	104
1.6 Reducción de la viabilidad celular e inducción de la apoptosis dependiente de caspasas tras el tratamiento con GL en células de cáncer de próstata andrógeno-independientes	105
1.7 GL desestabiliza los microtúbulos del citoesqueleto e inhibe la migración en las células DU145	109
1.8 La parada de ciclo celular en G ₂ /M causada por la GL es independiente de los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B	112
1.9 Efecto de la GL sobre la expresión de proteínas implicadas en la regulación de la fase G ₂ /M del ciclo celular	115
2. Estudio de la señalización molecular implicada en la parada de ciclo celular promovida por GL	119
2.1 La mutación de la proteína p53 no es responsable de la alteración del ciclo celular provocado por la GL	121

2.2	GL activa la ruta de señalización de DDR a través de ATM/ATR CHK1	122
2.3	La inhibición de la ruta de señalización de ATM/ATR revierte la parada de ciclo celular en fase G ₂ /M inducida por la GL.....	124
2.4	N-acetil cisteína (NAC) previene la parada de ciclo celular y la apoptosis causada por la GL	126
3.	Estudio del efecto antitumoral de la GL en los ratones xenoinjertados con células DU145 y análisis de su perfil metabolómico en el plasma .	129
3.1	La inhibición de STAT3 y NF-κB con shARN o GL reduce el crecimiento tumoral de xenoinjertos de células de cáncer de próstata <i>in vivo</i> , y además la GL induce la fosforilación de H2AX	131
3.2	El tratamiento temprano con GL bloquea el inicio del desarrollo tumoral en el modelo animal de cáncer de próstata	133
3.3	Cambios metabolómicos en el plasma del modelo animal con xenoinjertos de células de cáncer de próstata con una inhibición de STAT3 y NF-κB, mediante el uso de shARNs o con el tratamiento farmacológico con GL	134
4.	Análisis proteómico para la identificación de proteínas responsables de la respuesta diferencial a GL y estudio de análogos semisintéticos derivados de ésta	139
4.1	El tratamiento con GL altera la expresión de proteínas asociadas a funciones nucleares y mitocondriales en células DU145	141
4.2	GL modifica la expresión de proteínas con función mitocondrial en células LNCaP	144
4.3	LNCaP y DU145 presentan numerosas diferencias de expresión en el perfil proteómico	146
4.4	Las células DU145 muestran resistencia dependiente de la confluencia al tratamiento con GL	150
4.5	La confluencia en las células DU145 provoca cambios en la expresión proteica	151
4.6	Estudio de las proteínas candidatas: ZYX, NUSAP1 y TAGLN como dianas de GL	153
4.7	Estudio de las actividades de interés en los compuestos semisintéticos derivados de GL	157

V. Discusión	161
VI. Conclusiones	177
VII. Referencias bibliográficas	181

ABREVIATURAS

ADT	Terapia de privación de andrógenos
AR	Receptor de andrógenos
ARE	Elemento de respuesta a andrógenos en la región promotora
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia-telangiectasia and RAD3 related</i>
AURKA	Aurora quinasa A
BHP	Hiperplasia benigna prostática
CDK	Quinasa dependiente de ciclina
CKI	Inhibidores de CDK
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
CSCs	Células madre cancerosas
DDR	Respuesta al daño en el ADN
DHT	5 α -dihidrotestosterona
EGCG	Galato de epigallocatequina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EIF	Factores de iniciación eucariotas
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
FSH	Hormona folículo estimulante
GL	Galiellactona
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GSH	Glutación
HIF	Factor 1 inducible por hipoxia
hMSC	Células madre mesenquimales humanas
HNDFs	Fibroblastos dérmicos normales humanos

I κ B	Inhibidor de κ B
IFN	Interferón <i>gamma</i>
IKK	Complejo I κ B quinasa
IL-6	Interleuquina-6
IPA	Software <i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
JAK	Janus quinasas
KEAP1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
LH	Hormona luteinizante
MMPs	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
NAC	N-acetil cisteína
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras <i>kappa</i> de las células B activadas
NRF2	Factor de transcripción nuclear eritroide-2
NUSAP1	<i>Nucleolar and spindle associated protein 1</i>
PARP	Poli ADP-ribosa polimerasa
PIKK	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PSA	Antígeno prostático específico
RBMX	Proteína con el motivo de unión a ARN codificado en el cromosoma X
ROS	Especies reactivas de oxígeno
shARN	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	ARN de silenciamiento
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TAGLN	Transgelin
TBHP	Hidroperóxido de tert-butilo
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UCHL1	Ubiquitina C-terminal hidrolasa

VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ZVF	Z-VAD-FMK (inhibidor de caspasas)
ZYX	Zixina

RESUMEN

El cáncer de próstata continúa siendo uno de los cánceres más frecuentes diagnosticados en varones, aunque si es detectado en estadios tempranos el éxito de curación y la esperanza de vida a largo plazo son muy elevadas. Uno de los grandes retos de la medicina actual, es la búsqueda de una mejora en el tratamiento que posibilite la curación de aquellos pacientes con cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), ya que supone un estadio de la enfermedad muy agresivo y mortal.

La Galiellalactona (GL) es un metabolito fúngico que presenta actividades antitumorales en cáncer de próstata. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral muestran que esta molécula es capaz de impedir el crecimiento de las células de cáncer de próstata independientes de andrógenos, que se emplean como aproximación *in vitro* del CRPC, mediante la inducción de una parada del ciclo celular en fase G₂/M, muerte celular a través de un proceso de apoptosis dependiente de caspasas, alteración de la organización de los microtúbulos y una disminución de la motilidad celular. La GL no causa rupturas en el ADN, sin embargo, sí que induce la ruta de señalización de respuesta a daño al ADN a través de la activación de ATM/ATR-CHK1, siendo necesaria para llevar a cabo los efectos a nivel de ciclo celular y apoptosis. Además, dicha molécula es capaz de reducir el crecimiento de tumores, inducir la expresión de γ H2AX y modular la expresión de metabolitos alterados en plasma en modelos animales con xenoinjertos de células DU145 de cáncer de próstata.

Por otro lado, se ha observado una respuesta diferencial a la GL en determinadas líneas celulares de cáncer de próstata y en condiciones de confluencia. Encontrar la base molecular de estas diferencias es clave para entender los mecanismos subyacentes a esta enfermedad, y también para saber qué firma molecular tiene que presentar el cáncer para que sea eficaz el tratamiento con este quimioterápico. Para ello, se han realizado diversos estudios proteómicos encontrándose perfiles distintos de expresión de proteínas, en los que se han barajado varias de ellas como candidatas potenciales a explicar dicha respuesta diferencial. Asimismo, el estudio de derivados semisintéticos análogos de la GL son los cimientos para la identificación de farmacóforos responsables de cada una de las actividades de la GL para la síntesis dirigida de nuevas moléculas más potentes y selectivas.

En definitiva, los datos aportados añaden nuevos conocimientos acerca de los mecanismos de acción promovidos por GL y hacen que se postule como un agente antitumoral prometedor para el tratamiento del CRPC.

ABSTRACT

Prostate cancer is one of the most common cancers diagnosed in men, although if it is detected in early stages the successes of healing and long-term life expectancy are very high. One of the challenges of medicine is the discovery of new treatments against castration-resistant prostate cancer (CRPC), since it is an aggressive and lethal stage of the disease.

Galiellalactone (GL) is a fungal metabolite that presents antitumor activities on prostate cancer. The results obtained in this doctoral thesis show that this molecule inhibits tumor growth in androgen-insensitive prostate cancer cell lines, as an *in vitro* model of CRPC. GL induces cell cycle arrest in G₂/M phase, caspase-dependent apoptosis, destabilization of microtubules and inhibits cell motility. GL do not induce DNA breaks, but activates the ATM/ATR-CHK1-mediated DNA damage response which it is necessary for inducing cell cycle and apoptosis effects. Furthermore, this compound reduces tumor growth, induces the expression of γ H2AX and modulates the expression of altered metabolites in plasma of DU145 cell xenografts mouse model.

Moreover, we observed a differential response to GL in certain prostate cancer cell lines and in confluence conditions. It is essential to find the molecular basis to understand the underlying mechanisms of this disease and also to know which molecular signature has to present the cancer to be effective treatment with this chemotherapeutic agent. We found different protein expression profiles in our proteomic assays and we propose several candidate proteins for explaining this differential response. Likewise, the study of semisynthetic analogues of GL is relevant to find in which part of the molecule is associated with each activity and also obtain improved molecules with respect to GL.

In conclusion, this study reports for the first time new mechanisms of action for GL and validates GL as a promising antitumor agent for treatment of CRPC.

I. Introducción

Introducción

1. Cáncer de próstata

1.1 Conceptos generales y prevalencia

La próstata es una glándula del aparato reproductor masculino, situada debajo de la vejiga y en frente del recto, cuya función fisiológica principal es producir parte de los componentes que constituyen el líquido seminal. Sin embargo, cuando las células prostáticas proliferan de forma descontrolada pueden dar lugar al desarrollo de cáncer. El cáncer de próstata es una enfermedad heterogénea que en la mayor parte de los casos se origina en la zona periférica de la próstata, suele ser multifocal y alrededor del 95% de éstos son adenocarcinomas.

La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) estima que al menos 1,1 millón de hombres fueron diagnosticados con cáncer de próstata a nivel mundial en 2012, siendo el segundo tipo de cáncer más frecuente en varones. La prevención y mejora en los métodos de detección explica que la incidencia sea mucho más notable en países desarrollados, como es el caso de España, donde este tipo de cáncer ocupa la primera posición en cuanto a incidencia se refiere con 27.853 nuevos casos anuales, según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Con respecto a la mortalidad, el cáncer de próstata supuso la quinta causa de muerte por cáncer en hombres, provocando 307.000 muertes anuales en todo el mundo. A pesar de esto, generalmente el crecimiento del tumor suele ser lento, esto hace que sea el cáncer más prevalente en varones puesto que la tasa de supervivencia relativa a los 5 años para los hombres diagnosticados es muy elevada (Ferlay y cols., 2015).

Actualmente se desconoce la etiología exacta del cáncer de próstata, no obstante, entre los principales factores de riesgo relacionados con una mayor incidencia de esta patología (Patel y Klein, 2009), están: edad, etnia y factores hereditarios.

Tradicionalmente el cáncer de próstata se diagnostica mediante una biopsia prostática, previa detección del antígeno prostático específico (PSA) y/o tacto rectal anómalos. En función de estos parámetros y teniendo en cuenta el tamaño del tumor, la afectación de ganglios linfáticos y metástasis; el cáncer de próstata se puede clasificar en 4 estadios siguiendo el denominado sistema TNM (Tabla 1). Establecer esta estadificación es indispensable para llevar a cabo los criterios de tratamiento más adecuados para cada paciente.

Estadios	T1	El tumor no es palpable por tacto rectal pero hay evidencias de células cancerosas en biopsia	T1a	PSA normal y el tejido canceroso representa menos del 5%
			T1b	PSA normal y el tejido canceroso representa más del 5%
			T1c	PSA anómalo
	T2	El tumor está confinado en la próstata	T2a	Afectación de un lóbulo prostático
			T2b	Afectación de ambos lóbulos de la próstata
	T3	El tumor se extiende más allá de la próstata	T3a	La extensión afecta a la cápsula prostática, pero no a otros tejidos
			T3b	La extensión afecta a las vesículas seminales
	T4	El tumor ha invadido otros tejidos y órganos		

Tabla 1. Estadificación del cáncer de próstata.

1.2 Mecanismos moleculares implicados en cáncer de próstata

Fisiológicamente, el receptor de andrógenos (AR) desempeña una función importante en el crecimiento y supervivencia de las células de la próstata. No obstante, también se ha vinculado con en el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata. El gen del AR se localiza en el cromosoma X en el locus Xq11-Xq12, consta de 8 exones y codifica para una proteína de 919 aminoácidos. El AR pertenece a la familia de receptores nucleares y presenta 3 dominios: Un dominio N-terminal denominado NTD (1-555 residuos), el dominio DBD o de unión al ADN (555-623) y el LBD (665-919) que es el dominio C-terminal de unión al ligando, el cual conecta con el DBD a través de una región bisagra (623-665) (Tan y cols., 2015).

La síntesis de andrógenos se regula mediante el eje hipotálamo-hipofisario-gónadas. Concretamente, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es sintetizada y liberada en las neuronas hipotalámicas dirigiéndose a la adenohipófisis, donde estimula la secreción de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). A su vez, la LH actúa principalmente en las células de Leydig de los testículos donde promueve la síntesis de andrógenos, que son hormonas esteroideas cuya función más destacable es el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos. Además, hay que tener en cuenta que en las glándulas suprarrenales y en los tejidos periféricos también tiene lugar una síntesis de andrógenos que representa el 10% del total (Zhu y García, 2013).

La testosterona es el andrógeno más abundante y tras su síntesis es transportada a sus tejidos diana incluyendo la próstata. Para ejercer su función, la testosterona es

metabolizada intracelularmente a través de la enzima 5 α -reductasa a 5 α -dihidrotestosterona (DHT), siendo éste último mucho más potente que la propia testosterona. A continuación, el DHT se une con una alta afinidad al AR, situado en el citoplasma, desplazando a las proteínas de choque térmico (HSP) a las que está previamente unido. La unión DHT-AR provoca un cambio conformacional en la estructura del receptor favoreciendo su fosforilación, activación y translocación al núcleo donde forma dímeros que se unen a elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en los promotores de genes diana, promoviendo su transcripción (Heinlein y Chang, 2004) (Figura 1).

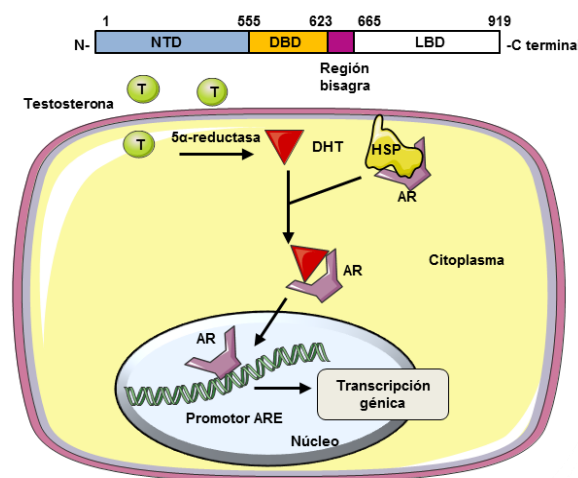


Figura 1. Estructura del receptor de andrógenos y su mecanismo de señalización celular en células de la próstata. Modificado de Tan y cols., 2015.

En el cáncer de próstata, al igual que sucede en el resto de cánceres, hay una descompensación en favor de las células que proliferan con respecto a las que mueren. Fue el médico Charles Brenton Huggins, el que demostró como la privación de andrógenos realizada mediante orquiectomía causaba una regresión del cáncer de próstata (Huggins y Hodges, 2002). Desde entonces hasta la actualidad se ha puesto de manifiesto la relevancia de los andrógenos y su receptor como promotores del crecimiento tumoral (Schweizer y Yu, 2015).

En las etapas iniciales del cáncer de próstata, aproximadamente entre el 80-90% de los casos, el crecimiento tumoral depende de la presencia de andrógenos. Este es el motivo por el que en pacientes con un estado avanzado de la enfermedad que no han respondido a otros tratamientos, se lleva a cabo una terapia de privación de andrógenos (ADT) con el objetivo de reducir los niveles de éstos en el suero y, por tanto, inhibir los

Introducción

AR. De esta forma, con dicho tratamiento hay una reducción patente del crecimiento del cáncer. Sin embargo, esta remisión de la enfermedad es transitoria y la mayoría de los pacientes sufren una recaída a los 2-3 años posteriores al tratamiento, dando lugar a un fenotipo de la enfermedad más agresivo y letal que no responde a la ADT denominado cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), el cual se caracteriza por su rápida diseminación y crecimiento independiente de la presencia de andrógenos (Chandrasekar y cols., 2015).

En el CRPC se han detectado células sin expresión del AR y también otras en las que los niveles del AR persisten así como su actividad, sugiriendo que la falta de respuesta a la ADT que conduce al CRPC se debe principalmente a los siguientes mecanismos:

- Amplificación génica/sobreexpresión del AR
- Biosíntesis intracrina de andrógenos
- Mutaciones y variaciones por *splicing* en los AR
- Alteración de coactivadores/represores del AR
- Activación mediada por factores de crecimiento o citoquinas
- Alteración en rutas de señalización celular dependientes y/o independientes de la regulación de andrógenos

Amplificación génica/sobreexpresión del AR

La amplificación génica del AR oscila en torno al 0-5% en pacientes con cáncer de próstata en estadios tempranos, mientras que, en pacientes con CRPC después de someterse a la ADT este porcentaje se eleva hasta el 30%. El aumento de copias del gen del AR en las células tumorales favorece su activación en presencia de niveles de andrógenos muy bajos o residuales, permitiendo su proliferación (Waltering y cols., 2012).

Biosíntesis intracrina de andrógenos

A pesar de la disminución de andrógenos circulantes post-ADT, las mediciones realizadas en pacientes con cáncer de próstata después de 6 meses del tratamiento demuestran que continúa habiendo un 25% de DHT en comparación con los niveles anteriores a la terapia, y éstos serían suficientes para inducir la proliferación de las células tumorales. Una posible explicación, es que tras la ADT se promueve la síntesis

de testosterona y DHT a partir de la conversión de precursores de andrógenos adrenales y del colesterol en las propias células tumorales de la próstata. En concordancia con esto, en el CRPC se han detectado altos niveles de expresión de enzimas implicadas en la conversión a andrógenos que pueden ser las responsables de la resistencia a la ADT (Locke y cols., 2008; Armandari y cols., 2014).

Mutaciones y variaciones por splicing en los AR

Otro de los mecanismos responsables de la CRPC son determinadas mutaciones en el AR que participan en la activación persistente de esta vía de señalización. Las mutaciones identificadas se encuentran mayoritariamente en los dominios LBD y NTD (Eisermann y cols., 2013). Por un lado, las mutaciones en el dominio LBD pueden producir diferentes efectos: conferir a las células tumorales hipersensibilidad a andrógenos, es decir, un aumento de la capacidad de activar el AR con niveles muy bajos o ausentes de andrógenos; provocar la pérdida de especificidad y selectividad por el ligando, activándose a través de otras hormonas esteroideas como estrógenos, progesterona y glucocorticoides; incluso los ligandos que se comportan como antagonistas del AR pueden adquirir capacidad agonista, como ocurre con la mutación T877A o la H875Y, explicando la pérdida de eficacia que se observa en el 15-30% de los pacientes tratados con los antagonistas del AR flutamida y nilutamida (Fenton y cols., 1997; Ozers y cols., 2007). Por otro lado, las mutaciones en el dominio NTD facilitan el reclutamiento de coactivadores que mantienen activado al AR, mejorando su estabilidad y retención nuclear en respuesta a DHT (Chen y cols., 2005; Callewaert y cols., 2006).

En algunos casos, la existencia de variantes del AR que fundamentalmente carecen de alguna parte o de todo el dominio LBD, se han asociado a la resistencia a la terapia y peor prognosis en cáncer de próstata. Hay 12 variantes descritas del AR en cáncer de próstata primario y se han encontrado hasta 23 en CRPC, otorgando algunos de ellos la capacidad de activarse de forma independiente de ligando pudiendo evadir la ADT (Coutinho y cols., 2016).

Alteración de coactivadores/represores del AR

Otro de los mecanismos que se postulan como responsables del CRPC son, por un lado, el aumento de expresión o actividad de los coactivadores y por otro lado la

Introducción

pérdida de expresión o actividad de los correpresores, que activan o inhiben el AR, respectivamente (Linja y cols., 2004). Por ejemplo, los coactivadores SRC-1, SRC-2 y SRC-3 del receptor de andrógenos presentan una expresión aberrante en el CRPC y según un estudio realizado en un modelo murino, la sobreexpresión continuada de SRC-2 en las células epiteliales de la próstata es suficiente para provocar un adenocarcinoma (Agoulnik y cols., 2005; Qin y cols., 2014). En el CRPC también se ha observado una desregulación de la expresión de FOX1A y GATA2 que, aunque no son coactivadores clásicos, sí que facilitan la unión del AR al ADN causando una mayor actividad de éste en ausencia de andrógenos (Wang y cols., 2009; Grasso y cols., 2012; He y cols., 2014). Por el contrario, los correpresores nucleares NCOR1 y 2 pierden su actividad en el cáncer de próstata, sobre todo en el CRPC, dejando de competir con los coactivadores y por ende, de reprimir la actividad transcripcional del AR.

Activación mediada por factores de crecimiento o citoquinas

Los factores de crecimiento y algunas interleuquinas son producidos desmesuradamente en numerosos tipos de cáncer, incluyendo el de próstata. Además, éstos consiguen aumentar la actividad del AR ante niveles muy reducidos de andrógenos circulantes a través de las rutas de señalización de PI3K y MAPK, contribuyendo al desarrollo del fenotipo de CRPC (Yang y cols., 2003; Joshi y cols., 2015).

Alteración en rutas de señalización celular dependientes y/o independientes de la regulación de andrógenos

La proteína PTEN es un inhibidor de la ruta de señalización PI3K/Akt que promueve la degradación del AR. Se estima que en el 80% de los casos de CRPC hay una pérdida de expresión de PTEN, resultando en un aumento de la actividad del AR a pesar de los niveles reducidos de andrógenos, una mayor proliferación y una disminución de la apoptosis (Whang y cols., 1998; Davies y cols., 1999; Hu y cols., 2015).

Los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B también son capaces de incrementar la actividad transcripcional del AR. El primero se ha observado que coinmunoprecipita con el AR en células tratadas con interleuquina-6 (IL-6), y el segundo es capaz de unirse al dominio NTD del AR facilitando el reclutamiento de

coactivadores y su translocación al núcleo (Chen y cols., 2000; Nadiminty y cols., 2010). No obstante, en los apartados posteriores se tratará en detalle la participación de dichos factores de transcripción en el cáncer de próstata, al margen de su relación con el receptor de andrógenos.

El AR puede ser activado en ausencia de andrógenos a través de la activación de la proteína quinasa A que, a su vez, es activada en presencia de elevados niveles intracelulares de AMPc. También hay altos niveles de expresión de la Aurora A quinasa (AURKA) en CRPC, esta proteína aparte de desempeñar un papel relevante en la regulación de la división celular también interacciona con el AR induciendo su transcripción (Heinlein y Chang, 2004; Lonergan y Tindall, 2011; Schweizer y Yu, 2015).

1.3 STAT3 en cáncer de próstata

El transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) es un factor de transcripción codificado por el gen localizado en el cromosoma 17q21 y que pertenece a la familia de proteínas STAT en la cual se incluyen 7 miembros: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6. Inicialmente, STAT3 fue descrito como un factor de respuesta a fase aguda debido a su capacidad de unión a promotores de genes que inducen una respuesta en fase aguda en células hepáticas frente a la inflamación (Akira y cols., 1994).

Estructuralmente, STAT3 presenta un dominio N-terminal, un dominio de unión al ADN, un dominio de bobina enrollada en espiral, un dominio de enlace, un dominio SH2 y un dominio de transactivación C-terminal. Además, hay 2 variantes descritas: la más abundante es la isoforma α que consta de 770 aminoácidos, mientras que la isoforma β carece de la secuencia de aminoácidos comprendida entre la posición 723 a 770 funcionando como un regulador negativo de STAT3 (Caldenhoven y cols., 1996) (Figura 2).

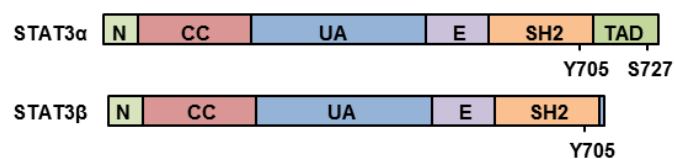


Figura 2. Isoformas de STAT3. N: dominio N-terminal; CC: dominio de bobina enrollada en espiral; UA: dominio de unión de al ADN; E: dominio de enlace; dominio SH2 y TAD: dominio de transactivación. Modificado de Zhang y Lai, 2014.

Introducción

La ruta de señalización clásica de STAT3 se inicia cuando citoquinas como la IL-6, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) interactúan con sus respectivos receptores de superficie de la membrana celular. A consecuencia de la interacción ligando-receptor, se induce la dimerización y autofosforilación de residuos de tirosina de las quinasas Janus (JAK1 y JAK2) y Src, provocando que se unan las moléculas inactivas de STAT3 al sitio de acoplamiento de dichas quinasas. La unión JAK-STAT3 produce la fosforilación de la tirosina situada en el residuo 705 (pY705) lo que desencadena la dimerización de los monómeros fosforilados de STAT3 (p-STAT3) y la activación del factor (Darnell, 1997). Asimismo, se ha descrito que la fosforilación en la serina 727 (pSer727) también interviene en el proceso de activación (Wen y cols., 1995). Acto seguido, los homodímeros de p-STAT3 se translocan al interior del núcleo donde se unen a elementos de respuesta al ADN de promotores de genes específicos implicados en los procesos de supervivencia celular y proliferación, regulando su transcripción (Figura 3).

Actualmente, también hay descritas rutas de señalización alternativas que intervienen en otros procesos biológicos y cuya activación es independiente de la fosforilación de STAT3 (Subramaniam y cols., 2013; Zhang y Lai, 2014).

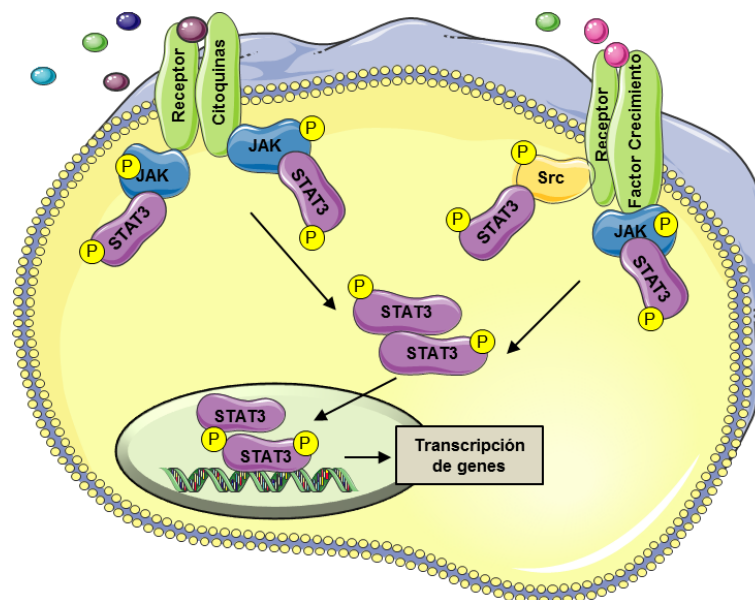


Figura 3. Mecanismo molecular clásico de la ruta de señalización de activación de STAT3. Modificado de Siveen y cols., 2014.

STAT3 desempeña funciones de gran importancia vital puesto que su supresión en embriones de ratón es letal y en modelos *knockout* para esta proteína causa

alteraciones graves en el desarrollo y en la diferenciación de tejidos como piel, hígado, sistema inmune, timo y sistema nervioso (Levy y Lee, 2002). En condiciones fisiológicas, STAT3 se encuentra estrictamente regulado y se activa de forma transitoria participando en procesos de embriogénesis, inflamación, diferenciación y crecimiento celular. No obstante, hay numerosas evidencias que demuestran que STAT3 se encuentra activado de forma constitutiva en distintos tipos de cáncer, incluido el de próstata, observándose altos niveles de expresión de pSTAT3 en muestras de pacientes y en líneas celulares derivadas de cáncer de próstata (Dhir y cols., 2002; Mora y cols., 2002; Don-Doncow y cols., 2017). Se conocen al menos 4 mecanismos que podrían explicar la expresión aberrante de STAT3 en cáncer: la pérdida de expresión de reguladores negativos de STAT3, una activación desmesurada debido a alteraciones en otras proteínas que regulan su actividad, un bucle de retroalimentación positiva que provoca su activación continua y mutaciones somáticas que desencadenan la hiperactivación de este factor de transcripción (Zhang y Lai, 2014).

Diferentes estudios han confirmado que la activación permanente de STAT3 causa un incremento de la proliferación y la supervivencia celular, fomentando la progresión del cáncer. En concordancia con esto, el uso de inhibidores químicos o ARN de silenciamiento (siRNA) para bloquear STAT3 conlleva un aumento de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de próstata (Barton y cols., 2004; Lee y cols., 2004). Además, la activación de este factor de transcripción está implicado en la iniciación de la formación del tumor en cáncer de próstata, como han evidenciado experimentos, en los que el uso de inhibidores irreversibles de la activación de STAT3 producen un decrecimiento de la subpoblación de células madre cancerosas (*cancer stem cells*, CSCs) las cuales podrían ser las responsables de la formación del tumor, progresión y resistencia a la quimioterapia (Kroon y cols., 2013; Han y cols., 2014).

Para la progresión del tumor es imprescindible la formación de nuevos vasos sanguíneos que aportan oxígeno y nutrientes a éste. En este contexto, se ha observado que STAT3 es un activador de la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 α) lo que favorece la angiogénesis. Por tanto, la inhibición de STAT3 disminuye los niveles de expresión de VEGF y HIF-1 α en cáncer de próstata, revirtiendo el crecimiento del tumor (Bishop y cols., 2014).

Introducción

Las muestras de pacientes con cáncer de próstata presentan altos niveles de STAT3 en el 77% de los ganglios linfáticos y el 67% de las metástasis óseas. En relación con esto, el xenoinjerto de células de cáncer de próstata DU145 infectadas previamente con adenovirus con la forma silvestre de STAT3 (AdWTSTAT3), en ratones atímicos desnudos, incrementó la formación de metástasis en los pulmones en 33 veces con respecto a los controles (Abdulghani y cols., 2008). Además, la expresión de AdWTSTAT3 en células DU145 y PC-3, ambas de cáncer de próstata, condujo a la modificación de los microtúbulos y filamentos de actina del citoesqueleto aumentando la capacidad de migración de dichas líneas celulares. Por consiguiente, queda patente que la activación del factor de transcripción STAT3 también está implicado en el proceso de metástasis en cáncer de próstata (Azare y cols., 2007).

Los datos clínicos registrados en pacientes con cáncer de próstata sometidos a prostatectomía o terapia hormonal, muestran que la presencia de niveles de expresión de STAT3 elevados están asociados con una peor prognosis de la enfermedad y una supervivencia menor (Tam y cols., 2007; Liu y cols., 2012). Además, los pacientes con CRPC también presentan altos niveles de expresión de este factor de transcripción (Santoni y cols., 2015).

Tomando en conjunto todas las referencias existentes que ponen de relieve la importancia del papel que juega STAT3 en la oncogénesis del cáncer de próstata, hace que sea una diana terapéutica prometedora. Para ello, se han desarrollado distintas estrategias para bloquear STAT mediante el uso de compuestos naturales que inhiben STAT3 (paclitaxel, curcumina, capsaicina o ácido cafeico), moléculas pequeñas que inhiben STAT3 (STA-21, Stattic), inhibidores de las quinasas JAK1/2 (AZD1480 o AG-490), uso de anticuerpos frente al receptor de citoquinas como la IL-6 (Sant7) o el uso de siRNA u oligonucleótidos. A pesar de que hay bastantes inhibidores de STAT3 descritos que ejercen efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo*, solo unos pocos muestran eficacia y están teniendo éxito en ensayos clínicos en pacientes (Siveen y cols., 2014).

1.4 NF- κ B en cáncer de próstata

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) debe su nombre a la primera función descubierta que se le atribuyó en 1986 (Sen y Baltimore, 1986). Con el tiempo ha quedado patente que está presente en la mayor parte de las células del organismo, regulando la expresión de una amplia

gama de genes cuyas proteínas intervienen en procesos biológicos claves como son: respuesta inmune, inflamación, desarrollo, proliferación y supervivencia celular. Esta familia de factores de transcripción está constituida por 5 miembros denominados p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF-κB1 y NF-κB2 (May y Ghosh, 1998).

En cuanto a su estructura su refiere, todos los integrantes de esta familia de proteínas se caracterizan por poseer un dominio de homología Rel necesario para la dimerización y unión al ADN, pero solo los miembros p65, RelB y c-Rel presentan un dominio de transactivación (Xiao y Fu, 2011). Además, los factores NF-κB1 y NF-κB2 se sintetizan como precursores inactivos, sufriendo un proceso de proteólisis que genera las formas activas p50 y p52, respectivamente (Figura 4). Cada uno de los miembros de esta familia puede formar homo o heterodímeros combinándose entre ellos. Curiosamente, si se forman dímeros entre p50/p52 y se unen a elementos de respuesta de promotores de NF-κB, actúan como represores de la transcripción al no tener el dominio de transactivación. Por el contrario, cuando están interaccionando con cualquiera de los otros componentes de la familia que tienen dicho dominio, sí promueven la transcripción (Hayden y Ghosh, 2012). La complejidad en la regulación de la transcripción llevada a cabo por NF-κB es tal, que hay genes que solo se activan ante alguna combinación concreta de dichos dímeros. Es importante resaltar, que la señalización celular de la ruta de NF-κB se encuentra inactiva cuando estos dímeros se encuentran unidos a los denominados inhibidores de κB (IκB), produciéndose su retención en el citoplasma.

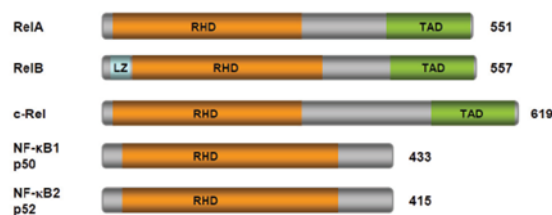


Figura 4. Estructura de los integrantes de la familia NF-κB. RHD: Dominio de homología Rel; TAD: dominio de transactivación. Modificado de Xiao y cols., 2011.

Aunque de forma minoritaria hay descritos formas adicionales de activación de la ruta de señalización de NF-κB en determinados casos, los dos mecanismos principales de activación son los que se detallan a continuación:

La vía de activación canónica o clásica

La activación de la ruta se inicia ante una amplia variedad de citoquinas pro-inflamatorias y antígenos, tales como la interleuquina 1 (IL-1), el lipopolisacárido (LPS) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que interactúan con sus respectivos receptores y desencadenan la activación del complejo I κ B quinasa (IKK). El complejo IKK consiste en dos subunidades catalíticas denominadas IKK α e IKK β y al menos una subunidad reguladora denominada modulador esencial de NF- κ B (NEMO o IKK γ). Una vez activado el complejo IKK, éste produce la fosforilación de las serinas Ser32 y Ser36 de I κ B produciendo su ubiquitinización y degradación a través del proteosoma. De esta manera, los homo o heterodímeros son liberados y activados, translocándose al núcleo donde regulan la transcripción de sus genes diana (Hoesel y Schmid, 2013).

La vía no canónica o alternativa

Esta ruta tiene lugar cuando los ligandos CD40, el factor activador de células B (BAFF) o la linfoxina β (LT β) se unen a sus receptores específicos de membrana, se activa la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) que a su vez induce la fosforilación y activación del complejo IKK, reclutando a NF- κ B2 para su ubiquitinación y proteólisis generándose p52. La unión de p52 a otro miembro de la familia NF- κ B forma un dímero que se dirige al interior del núcleo, regulando la transcripción (Xiao y Fu, 2011; Hoesel y Schmid, 2013).

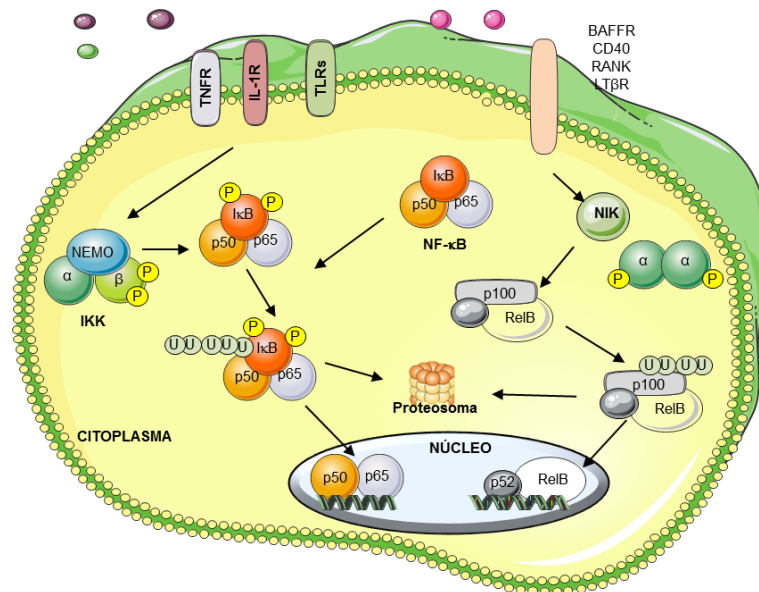


Figura 5. Activación de las rutas de señalización clásica y alternativa de NF- κ B. Modificado de Hoesel., 2013).

A pesar de que ambas rutas están bien diferenciadas, cabe destacar que hay comunicación entre ellas a distintos niveles ya que la activación de una de ellas puede facilitar la activación o represión de la otra dependiendo del contexto celular. Además, ambas rutas cooperan en las funciones que desempeñan, pudiendo ejercer su actividad reguladora sobre los mismos genes (Figura 5).

De forma análoga a lo que ocurre con STAT3, también NF- κ B se encuentra muy regulado en condiciones fisiológicas y es activado de forma temporal. La desregulación y activación aberrante de NF- κ B ocasiona consecuencias perjudiciales al provocar inflamación aguda o shock séptico a nivel celular, o bien, un crecimiento celular o supervivencia anómalo que conduce al desarrollo de cáncer (Gilmore, 2006; Baud y Karin, 2009).

NF- κ B tiene un papel paradójico en cáncer debido a que, por un lado, su activación promueve la respuesta inmune al incrementar la actividad de células inmunes citotóxicas cuyo objetivo es eliminar las células cancerosas. Por otro lado, la activación constitutiva de NF- κ B fomenta el comienzo y desarrollo de procesos pro-tumorales en distintos tipos de cáncer. Apoyando el papel dañino o beneficioso que puede ejercer NF- κ B dependiendo del contexto celular, está el hecho de que tanto los pacientes inmunodeprimidos como aquellos con enfermedades inflamatorias crónicas presentan un riesgo más elevado de padecer cáncer (Smyth y cols., 2006; Disis, 2010).

El incremento de la actividad de NF- κ B en un tumor se puede deber a factores extrínsecos o intrínsecos. Los primeros, ocurren cuando hay mutaciones de genes que participan en la señalización y/o regulación de NF- κ B. Esto ocurre principalmente en linfomas, aunque también se ha observado en cáncer de próstata con fusiones génicas como la de IKK2 y TNPO1 (transportina-1) lo que genera una expresión elevada de IKK2, o la fusión entre el promotor dependiente de andrógenos del gen TMPRSS2 y el gen ERG en la cual se ha detectado un incremento de la actividad de NF- κ B (Pflueger y cols., 2011; Wang y cols., 2011). Los segundos, se deben a una liberación de citoquinas desmesurada procedentes del microambiente tumoral que da lugar a una activación constitutiva de la ruta de señalización (Perkins, 2012).

NF- κ B interacciona con otros factores de transcripción implicados en la regulación del ciclo celular y la apoptosis lo que da cuenta de la complejidad del papel

Introducción

que desempeña en cáncer. Uno de ellos es STAT3 el cual interacciona físicamente con NF- κ B, facilitando su reclutamiento hacia promotores de NF- κ B y viceversa (Grivennikov y Karin, 2010). Por otra parte, NF- κ B es retenido en el núcleo y activado de forma constitutiva cuando es modificado post-transcripcionalmente debido a su interacción con la acetiltransferasa p300 (Lee y cols., 2009). Otra interacción es la que tiene lugar entre NF- κ B y el promotor de p53, induciendo su transcripción, de tal forma que éste último ejerce una regulación negativa sobre NF- κ B (Webster y Perkins, 1999). Si bien, es frecuente en cáncer la presencia de mutaciones en p53 que causan la pérdida de su función y por tanto, se pierde el control de la regulación sobre NF- κ B facilitando su activación (Schneider y cols., 2010; Vaughan y cols., 2012).

La transcripción de genes anti-apoptóticos que se lleva a cabo por la activación constitutiva de NF- κ B supone una ventaja para las células tumorales, al verse incrementada su supervivencia celular. De hecho, experimentos realizados en líneas celulares de cáncer de próstata demuestran que NF- κ B aumenta la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL y survivina) cuyos niveles decrecen cuando se tratan con inhibidores de dicho factor de transcripción, incrementando la apoptosis (Catz y Johnson, 2001; Li y Sarkar, 2002). Además, NF- κ B es capaz de mantener activa la población de CSCs, inhibiendo la apoptosis, promoviendo la proliferación y creando un ambiente pro-inflamatorio que facilita el crecimiento tumoral y la resistencia a la quimioterapia (Vazquez-Santillan y cols., 2015).

Cuando NF- κ B está activado, se favorece el proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT) y por ende, el proceso de metástasis debido a la inducción de la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) y del VEGF que se encargan de degradar la matriz extracelular y promover la angiogénesis, respectivamente (Huber y cols., 2004; Shukla y cols., 2004).

También se ha detectado un aumento de la activación de NF- κ B en el cáncer de próstata con metástasis en comparación con el que se encuentra localizado en la glándula prostática (Ismail y cols., 2004). Los pacientes con cáncer de próstata avanzado desarrollan normalmente metástasis ósea. Según un estudio, la activación de NF- κ B aumenta la expresión de genes que incrementan la osteoclastogénesis contribuyendo a la metástasis ósea en esta patología (Jin y cols., 2013). La inyección de

células tumorales de cáncer de próstata C4-2B y PC-3 con altos niveles de NF- κ B en el hueso de ratones, produce la expresión de genes inductores de osteoclastos (PTHrP y RANKL) mientras que la inhibición de NF- κ B en estas células impide la formación de tumores en el hueso. Por el contrario, en células de cáncer de próstata LNCaP, con bajos niveles de NF- κ B activado, los tumores crecen con dificultad en el tejido óseo, sin embargo, se vuelve a favorecer la proliferación en hueso cuando se activa dicho factor de transcripción (Jin y cols., 2013).

Las líneas celulares y xenoinjertos de cáncer de próstata insensibles a andrógenos tienen una actividad NF- κ B mayor en comparación con las sensibles. De acuerdo con esto, se ha demostrado que la secreción de proteínas neuroendocrinas activa NF- κ B de forma constitutiva y, a su vez, incrementa la expresión nuclear de los receptores de andrógenos permitiendo un crecimiento independiente de la presencia de andrógenos. Por todo ello NF- κ B puede ser, al igual que STAT3, una diana atractiva para el desarrollo de terapias para el tratamiento del CRPC (Jin y cols., 2008).

1.5 Ciclo celular y cáncer

El ciclo celular consiste en una serie de eventos que acontecen en la célula eucariota y conducen al crecimiento celular, duplicación del material genético localizado en los cromosomas y los componentes celulares, segregándolos de forma precisa para su división en dos células hijas genéticamente idénticas entre sí. El ciclo celular consta de las siguientes fases:

- **Interfase:** Es el periodo que hay entre dos mitosis consecutivas y el de mayor duración del ciclo celular, abarcando el 90% de éste. Dentro de la interfase se engloban la fase G_1 (*GAP 1*) en la que la célula aumenta su tamaño y sintetiza la maquinaria necesaria para la síntesis de ADN; la fase S, en la que ocurre la replicación del ADN pasando de tener una carga diploide ($2n$) a tetraploide ($4n$); y la fase G_2 (*GAP 2*) en la cual la célula se prepara para entrar en mitosis.
- **Fase M:** Esta etapa comienza con la división del núcleo celular (mitosis), seguida del proceso de separación y segmentación del citoplasma (citocinesis). A su vez, la mitosis se divide en 5 fases: Profase, prometafase, metafase, anafase y telofase (Salaun y cols., 2008).

Introducción

Cabe destacar que cuando las células del organismo no se están dividiendo, abandonan el ciclo celular en fase G_1 y entran en la denominada fase G_0 o de reposo. Algunas células se encuentran en un estado de quiescencia durante largos periodos de tiempo pudiendo reincorporarse al ciclo para volver a dividirse, o incluso permanecer en este estado de forma indefinida, éste es el caso de las células que están completamente diferenciadas. También las células senescentes entran en la fase G_0 para ser eliminadas mediante apoptosis.

La progresión del ciclo celular por cada una de las fases descritas anteriormente, está regulada a través de serina/treonina quinasas conocidas como quinasas dependientes de ciclina (CDKs). Los estudios realizados en levaduras fueron los que demostraron por primera vez la presencia de una única CDK denominada Cdc28 o Cdc2, dependiendo de la especie de levadura, como responsable de promover la transición entre las diferentes fases del ciclo celular a través de su interacción con otras proteínas reguladoras denominadas ciclinas (Beach y cols., 1982; Russell y Nurse, 1986).

Las CDKs se encuentran inactivas cuando están fosforiladas en determinados residuos, por ejemplo, en el caso de CDK1 son las quinasas WEE1 y MYT1 las que llevan a cabo su fosforilación en los residuos Thr14 y Tyr15 (Schafer, 1998). Mientras que la activación de las CDKs y su especificidad por un sustrato depende de la interacción con las distintas ciclinas cuyos niveles de expresión van fluctuando a lo largo de cada una de las fases del ciclo celular, controlando la actividad de las CDKs (Malumbres y Barbacid, 2005). Además, también se requiere para la activación de las CDKs la desfosforilación de los residuos Thr14 y Thr15 llevado a cabo por fosfatasa de la familia de proteínas CDC25, así como la fosforilación del residuo Thr160 a través de la quinasa activadora de CDK (CAK). A su vez, cuando las CDKs están activadas van a fosforilar sustratos claves para la síntesis del ADN y la progresión de la mitosis (Lim y Kaldis, 2013).

En humanos hay descritas 13 CDKs que interactúan con al menos 29 ciclinas o proteínas relacionadas con ciclinas, sin embargo, solo algunas de ellas están implicadas directamente en el control del ciclo celular (Malumbres y Barbacid, 2009). Según el modelo clásico, la interacción específica de determinadas CDKs/ciclinas van guiando a la célula por las distintas fases del ciclo celular. Concretamente, la ciclina D se une y

activa preferentemente a las CDK4 y CDK6 durante la fase G₁, preparando a la célula para comenzar con la síntesis de ADN. Esta interacción provoca la inhibición de las proteínas p107 y p130 permitiendo la expresión de ciclina E que, a su vez, activa a la CDK2. El complejo ciclina E-CDK2 es esencial para la transición entre las fases G₁ y S (Malumbres y Barbacid, 2009). Posteriormente, al final de la etapa de replicación del ADN, se produce la interacción de la ciclina A con CDK2 lo que permite la transición a la fase G₂. Al final de la interfase se produce la interacción entre la ciclina A con la CDK1, entrando la célula en mitosis. Acto seguido, tras la disolución de la membrana nuclear, tiene lugar la degradación de ciclina A facilitando la interacción de la CDK1 a la ciclina B, permitiendo la mitosis de la célula (Malumbres y Barbacid, 2005). Por último, la disminución de CDK1 es necesaria para que ocurra la descondensación de los cromosomas, reaparición de la envoltura nuclear y la citocinesis (Figura 6).

Aunque este modelo está ampliamente aceptado, experimentos genéticos realizados durante el desarrollo de embriones de ratón han revelado que la presencia de CDK1 es esencial para la división celular, siendo suficiente para llevar a cabo la división de la mayor parte de los tipos celulares, al menos, hasta la mitad de la gestación (Santamaria y cols., 2007). Por el contrario, las CDK4 y CDK6 solo son necesarias para la proliferación de células β del páncreas y células de la línea eritroide, respectivamente, puesto que su carencia impide el desarrollo de éstas (Rane y cols., 1999; Malumbres y cols., 2004); mientras que con la ausencia de CDK2 no se observa ninguna alteración aparente en la división mitótica pero sí en la meiosis (Ortega y cols., 2003). Por lo tanto, se sugiere que estas CDKs podrían estar involucradas en funciones adicionales de control de la proliferación en cada una de las fases del ciclo celular.

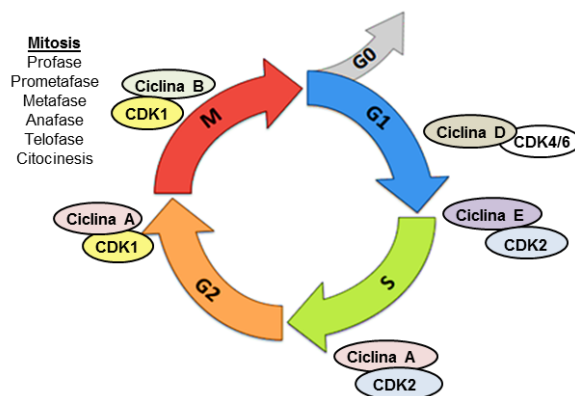


Figura 6. Modelo clásico de regulación del ciclo celular. Se encuentran representadas las distintas fases del ciclo celular, así como las CDKs y ciclinas específicas que regulan cada etapa. Modificado de Malumbres y Barbacid, 2005.

Introducción

Otra forma de modular la actividad quinasa de las CDKs es a través de los inhibidores de CDKs (CKIs) que ante condiciones desfavorables para la célula, paran la progresión del ciclo celular. Hay dos grupos de CKIs: los pertenecientes a la familia INK4 (INK4A, INK4B, INK4C e INK4D) y la familia Cip/Kip (p21, p27 y p57) (Sherr y Roberts, 1999).

Existe otro mecanismo que asegura el correcto funcionamiento del ciclo celular mediante los denominados puntos de control o *checkpoints*, los cuales se activan si se detectan errores en el proceso de replicación, daño al ADN, una inadecuada segregación de cromosomas o simplemente que la célula no tiene el tamaño necesario para dividirse (Barnum y O'Connell, 2014). Cualquiera de éstos, puede desencadenar una parada de ciclo celular para permitir la reparación de los defectos encontrados y asegurar que la división celular se lleve a cabo satisfactoriamente. No obstante, si los defectos no son reparados la célula podría entrar en senescencia o apoptosis.

Hay numerosas evidencias que respaldan la relevancia de la desregulación del ciclo celular en el cáncer. Las células tumorales se caracterizan por tener, en primer lugar, una proliferación no programada que ocurre a consecuencia de una activación constitutiva de señales mitogénicas o la supresión de señales anti-mitogénicas. En segundo lugar, presentan una inestabilidad cromosómica debido a alteraciones cromosómicas. Y en tercer lugar, adquieren una inestabilidad genética debido a mutaciones adicionales. Estos 3 defectos contribuyen a la progresión del tumor y están mediados por la desregulación de las CDKs-ciclinas de forma directa o indirecta (Vermeulen y cols., 2003; Kops y cols., 2005).

La gran cantidad de proteínas y mecanismos que intervienen en la progresión del ciclo celular y en su regulación, hace posible que haya una amplia variedad de alteraciones involucradas en el desarrollo y progresión del cáncer. Entre otros, hay estudios que ponen en relieve que líneas celulares tumorales de glioblastoma y osteosarcoma son muy dependientes de la CDK2, por lo que su inhibición impide la proliferación de dichas células. También se ha demostrado que la sobreexpresión de las CDK1, CDK4 y CDK6 observada en diferentes tipos de cáncer promueve la proliferación, e incluso, la presencia de mutaciones en la CDK4 (Arg24Cys) bloquea su unión a los inhibidores INK4 (Vax y cols., 2003). Otros experimentos indican que la activación del complejo CDK4-ciclina D es requerido para el desarrollo tumoral

dependiendo de la señal oncogénica. Por ejemplo, experimentos realizados en ratones que carecen de ciclina D o está mutada, y por tanto no activan CDK4, previene el desarrollo de tumores de mama inducidos por ERBB2, sin embargo, esto no ocurre si son inducidos por los protooncogenes Myc o Wnt-1 (Yu y cols., 2001; Landis y cols., 2006).

Como se ha comentado anteriormente, la familia de proteínas CDC25, representada por las isoformas CDC25A, CDC25B y CDC25C, están implicadas en la activación de las CDKs en la progresión del ciclo celular regulando la transición de las fases G₁/S y G₂/M. No obstante, también son esenciales en la activación del *checkpoint* frente al daño en el ADN produciendo la detención del ciclo celular. Teniendo en cuenta las funciones relevantes que desempeñan en el ciclo celular, las CDC25 están fuertemente reguladas en condiciones fisiológicas; si bien, se ha detectado una fuerte sobreexpresión en numerosos tipos de cáncer. De hecho, en cáncer de próstata, hay estudios que reflejan incrementos de los niveles de las isoformas CDC25B y CDC25C (Ngan y cols., 2003; Ozen y Ittmann, 2005). Esta sobreexpresión se achaca bien a mutaciones, o bien, a la desregulación en las proteínas que modulan su actividad. En cualquier caso, la desregulación de las proteínas CDC25 promueve la inestabilidad genética y un aumento de la proliferación celular, contribuyendo a la progresión de la enfermedad (Boutros y cols., 2007; Sur y Agrawal, 2016).

Otro mecanismo que atañe a reguladores del ciclo celular y están asociados a un peor pronóstico en cáncer es el silenciamiento de los CKIs, p21 y p27 (Abukhdeir y Park, 2008). A pesar de esto, hay cierta controversia con respecto al papel que juega p21 en cáncer ya que dependiendo del contexto celular, actúa como supresor de tumores deteniendo el crecimiento del tumor, o bien, puede comportarse como un oncogén ejerciendo efectos anti-apoptóticos, tal y como ocurre en el cáncer de próstata donde está sobreexpresado (Abbas y Dutta, 2009).

La alteración a nivel de los *checkpoints* del ciclo celular es otro fenómeno común en cáncer que contribuye a la progresión de la enfermedad. Generalmente, las células tumorales presentan alteraciones en proteínas implicadas en los mecanismos de reparación, esquivándolos. Esto conlleva a una mayor proliferación celular, inestabilidad genética y cromosómica. Un caso bien conocido es el de la proteína supresora de tumores p53, dado que más del 50% de los cánceres presentan mutaciones

en el gen que la codifica (Soussi y Wiman, 2007). En condiciones normales, esta proteína tiene bajos niveles de expresión al asociarse con la proteína Mdm2 y degradarse vía proteosoma. Mientras que, frente a situaciones de estrés celular de distinta índole, p53 se activa y a su vez, activa una plétora de rutas señalización que tienen como finalidad la parada de ciclo celular para reparar el daño o inducir la apoptosis, si éste no puede ser reparado. Sin embargo, las mutaciones de p53 en los distintos tumores producen su disfunción, otorgándole propiedades oncogénicas al facilitar la generación de nuevas mutaciones y cambios de expresión en proteínas que favorecen el crecimiento del tumor, angiogénesis y resistencia a quimioterapia (Meek, 2004; Teodoro y cols., 2007; Ozaki y Nakagawara, 2011).

2. Quimioterapia en cáncer

2.1 Tipos de quimioterápicos empleados en cáncer de próstata

En el cáncer de próstata localizado se puede optar por distintos tratamientos teniendo en cuenta determinados criterios como son el estadio de la enfermedad, la edad, el estado de salud y las preferencias del paciente. Estos tratamientos pueden ir desde la vigilancia activa, en la cual se lleva a cabo un seguimiento del paciente para evaluar la evolución del cáncer y normalmente se suele hacer en personas de avanzada edad con un crecimiento del tumor lento para evitar una pérdida en su calidad de vida; la prostatectomía radical, que consiste en la extirpación de la glándula prostática y las vesículas seminales; hasta la radioterapia.

A diferencia de la mayoría de tumores sólidos, la quimioterapia no es el principal tratamiento empleado para el cáncer de próstata avanzado ya que tradicionalmente el foco de interés se ha centrado en el desarrollo y uso de las terapias ADT debido a la efectividad que han mostrado. La ADT se puede llevar a cabo mediante orquiectomía o farmacológicamente. En este último caso se emplean agonistas (Leuprolide, goserelin) o antagonistas (Degarelix) de la GnRH, antiandrógenos que bloquean el AR (Flutamida, bicalutamida, nilutamida, enzalutamida) e inhibidores enzimas implicadas en la síntesis de andrógenos como la CYP17 (Acetato de abiraterona) (Perlmutter y Lepor, 2007; Tan y cols., 2015; Fakhrejehani y cols., 2017).

No obstante, ante la falta de respuesta a la ADT que se produce en el CRPC, el tratamiento con quimioterápicos es esencial en esta fase de la enfermedad,

extendiéndose su uso, e incluso, ha resultado ser efectiva en estadios más tempranos de forma individual o en combinación con la ADT (Hurwitz, 2015).

El uso de la quimioterapia en cáncer se inició con el uso del gas mostaza y antagonistas del ácido fólico que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos. En cuanto al cáncer de próstata, el primer quimioterápico aprobado fue la estramustina como tratamiento del CRPC. La estramustina está constituida por un agente alquilante y estradiol, aunque posteriormente se ha comprobado que no presenta ninguna de estas dos actividades y que realmente su actividad anti-neoplásica reside en la unión y despolimerización de microtúbulos (Dahllof y cols., 1993). Más adelante, se aprobó el uso de la mitoxantrona cuya actividad se basa en su unión de forma irreversible al ADN impidiendo la proliferación celular (Tannock y cols., 1996; Kantoff y cols., 1999). En la actualidad ambos quimioterápicos simplemente se utiliza como tratamiento paliativo debido a que mejoran la calidad de vida del paciente pero no incrementa su supervivencia.

El principal avance en el uso de quimioterapia en el cáncer de próstata ha tenido lugar con los taxanos, fármacos procedentes de la corteza del tejo común (*Taxus brevifolia*). Los principales taxanos son el paclitaxel, docetaxel y cabazitaxel cuya actividad antitumoral reside en la estabilización de los microtúbulos impidiendo su despolimerización, lo que conlleva un bloqueo de la mitosis al afectar al huso mitótico, promoviendo la apoptosis (Blagosklonny y cols., 1996; Jordan y Wilson, 2004). Diferentes ensayos clínicos muestran que el docetaxel incrementa la supervivencia en unos meses así como la calidad de vida de los pacientes con CRPC con respecto a otros tratamientos anteriores. Para superar la resistencia al docetaxel que muestran algunos pacientes, se ha desarrollado una segunda generación de taxanos. Entre ellos, está el cabazitaxel, que mejora la supervivencia en pacientes con CRPC resistente al tratamiento con docetaxel (Cassinello y cols., 2016).

Los agentes intercalantes al ADN que inhiben la división celular, como los quimioterápicos ciclofosfamida o carboplatino, pueden ser aplicados en pacientes que no responden a otros tratamientos debido a que suelen ser bien tolerados, aunque su uso no mejora las expectativas de supervivencia de éstos (Handy y Antonarakis, 2016; Teply y Hauke, 2016).

2.2 Inducción del daño al ADN

Las células están sometidas al ataque constante de agentes genotóxicos exógenos y endógenos como sustancias químicas, radicales libres, radiaciones ionizantes, luz ultravioleta, productos del metabolismo celular o fármacos, entre los que se incluyen los quimioterápicos. Las lesiones provocadas van desde rupturas en una sola hebra del ADN (SSBs), rupturas en las dos hebras (DSBs), formación de aductos, desapareamiento de bases, inserciones y deleciones, hasta la alquilación de bases (Helleday y cols., 2014).

En presencia de dichos agentes genotóxicos la célula induce una serie de mecanismos complejos y coordinados conocidos como respuesta al daño en el ADN (*DNA damage response*, DDR) cuyo objetivo primordial es reparar el daño y mantener la integridad genómica de la célula. Los *checkpoints* junto con los mecanismos de reparación y apoptosis, están integrados en un circuito que va a determinar la respuesta final de la célula dependiendo de la naturaleza y gravedad del daño ocasionado en el ADN (Harper y Elledge, 2007).

La DDR se inicia cuando los complejos MNR (proteínas MRE11, NSB1 y Rad50) y RPA (proteína de replicación A), que actúan como sensores, detectan las lesiones en el ADN, reclutando a proteínas de la familia de las quinasas relacionadas con las fosfatidilinositol 3-quinasa (PIKKs). Concretamente, las PIKKs que son activadas y acuden al sitio donde se ha producido el daño al ADN son: las proteínas ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*), ATR (*Ataxia-telangiectasia and RAD3 related*) y la DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*); resultando en un aumento de la fosforilación de la histona H2AX (γ H2AX), que es un marcador de daño al ADN (Karanika y cols., 2015). Para amplificar la señal de la DDR, las proteínas ATM/ATR activadas disparan la activación de la proteína p53 y las quinasas CHK1 y CHK2, que actúan de efectores de la señal. Por un lado, la fosforilación de las serinas Ser317 y Ser345 en CHK1 y por el otro, la que ocurre en la treonina Thr68 en el caso de CHK2, van a desencadenar la inactivación de las proteínas de la familia CDC25 a través de su fosforilación y retención en el citoplasma para ser degradadas vía proteosoma (Smith y cols., 2010).

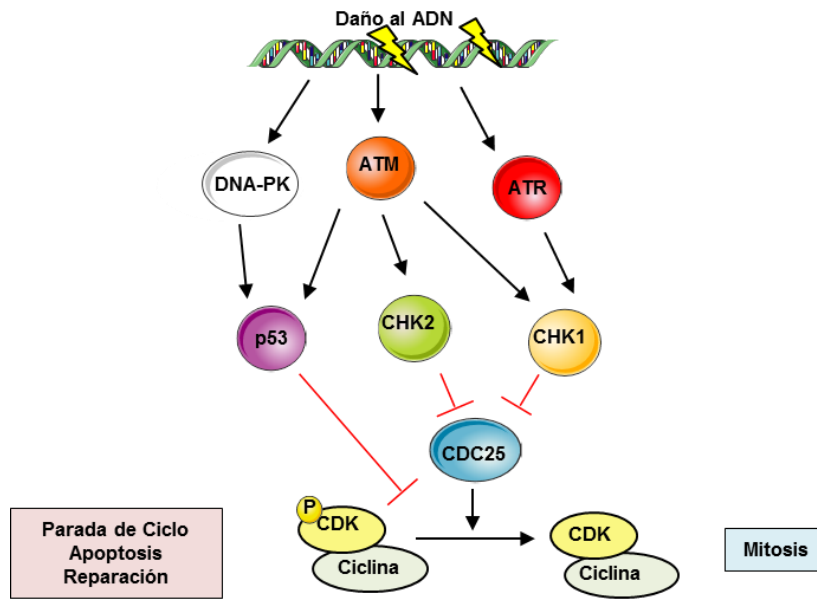


Figura 7. Principales rutas de señalización implicadas en la respuesta al daño al ADN.

Clase	Quimioterápico	Actividad bioquímica	Efecto biológico
Antimetabolitos	5-Fluorouracilo	Análogos de nucleósidos de pirimidina	Alteración de la síntesis de ADN y ARN
	Gemcitabine		
	Metotrexato	Inhibidor de la dihidrofolato reductasa	Reducción de folatos requeridos para la síntesis de ADN
Agentes alquilantes	Ciclofosfamida	Añaden grupos alquilo al ADN	Inhibición de la replicación de ADN
	Melfalán		
Antraciclinas	Doxorrubicina	Se intercalan entre los pares de bases de los ácidos nucleicos	Inhibe la síntesis de ADN y ARN
Agentes antimicrotúbulos	Vinblastina	Se une a la tubulina, impidiendo su polimerización	Detiene el ciclo en mitosis al bloquear el ensamblaje de microtúbulos
Componentes basados en el platino	Cisplatino	Forman aductos en el ADN	Inhibe la replicación y transcripción del ADN
	Oxaliplatino		
Taxanos	Docetaxel	Se unen a la tubulina, estabilizando los microtúbulos e impide su despolimerización	Inhibe la mitosis
	Paclitaxel		
Inhibidores de topoisomerasas	Irinotecan	Interfiere con las topoisomerasas tipo I, induciendo rupturas en el ADN	Parada de ciclo celular y apoptosis
	Etopósido	Interfieren con las topoisomerasas tipo II, induciendo rupturas en el ADN	
	Mitoxantrona		

Tabla 2. Bioquímica y propiedades biológicas de algunos anti-neoplásicos convencionales. Modificado de Bracci y cols., 2014.

Los efectos finales de la activación de la DDR son la parada del ciclo celular y la reparación del ADN. En el primer caso, si la parada del ciclo celular tiene lugar en el *checkpoint* G₁/S se inactivan los complejos ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2, mientras que si la detención sucede en la fase G₂/M, se impide la activación del complejo ciclina B-CDK1 (Wang y cols., 2015). En el segundo caso, la reparación del ADN es mediada, principalmente, por los siguientes mecanismos: reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide excision repair*, NER), reparación por escisión de bases (*Base excision repair*, BER), reparación por desapareamientos (*Mismatch repair*, MMR), recombinación homóloga (*Homologous recombination*, HR) y unión de extremos no homólogos (*Non-homologous end joining*, NHEJ) (Hoeijmakers, 2001) (Figura 7).

Si la inestabilidad genética causada por el daño en el ADN no es reparada puede desencadenar carcinogénesis ligada bien a la activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores. Paradójicamente, la inducción del daño al ADN mediada por los quimioterápicos supone un pilar fundamental para el tratamiento del cáncer en clínica (Bracci y cols., 2014). De hecho, la mayoría de ellos ejerce su toxicidad sobre las células tumorales mediante la inducción de daño en el ADN, inhibiendo el crecimiento del tumor e induciendo la apoptosis (Tabla 2). Por ejemplo, los quimioterápicos basados en el platino como el cisplatino y carboplatino forman aductos mediante el establecimiento de enlaces covalentes entre el ADN y el platino.

Por otro lado, la doxorubicina o etopósido son agentes que se intercalan en el ADN inhibiendo las enzimas topoisomerasas, bloqueando el proceso de replicación del ADN. En todos ellos, hay una inducción de la DDR a través de la activación de la proteína ATM (Kurz y cols., 2004; Tanaka y cols., 2007).

3. Marcadores y nuevas dianas moleculares en cáncer de próstata

3.1 Necesidad de nuevos marcadores y dianas terapéuticas

El biomarcador ideal sería aquel capaz de detectar la enfermedad y su progresión, identificar los individuos de alto riesgo, predecir la recurrencia y permitir la monitorización de los tratamientos. Además, debe tener un coste asequible, ser preciso, fácilmente cuantificable y permitir la obtención de los resultados mediante pruebas no invasivas.

Hasta la fecha el marcador por excelencia empleado en el diagnóstico del cáncer de próstata es el PSA. En células sanas el PSA es secretado por las células epiteliales prostáticas y es un componente del fluido seminal, mientras que en el cáncer de próstata la ruptura de las células basales permite su liberación a la circulación, dando lugar a elevados niveles de PSA en suero. Desde su descubrimiento y uso como marcador en cáncer de próstata, el número de diagnósticos se ha disparado y también se ha reducido la mortalidad de la enfermedad.

Tradicionalmente los valores de PSA superiores a 4ng/ml se consideraban anómalos. A pesar de esto, los niveles de PSA por encima de dicho umbral no necesariamente es indicativo de cáncer de próstata debido a que se han encontrado niveles elevados en otros supuestos como la hiperplasia benigna de próstata, prostatitis, con el uso de determinados fármacos así como variaciones en cuanto a la raza se refiere. Por tanto, el PSA tiene una baja especificidad lo que da lugar a identificar falsos positivos (Madu y Lu, 2010; Velonas y cols., 2013). En este sentido, se estima que sólo el 30% de los pacientes con niveles inusuales de PSA (superiores a 4ng/ml) son finalmente diagnosticados con cáncer de próstata, determinando un sobretratamiento de pacientes con cáncer de próstata de bajo riesgo y la realización de biopsias y prostatectomías innecesarias (Qu y cols., 2014). Aunque el PSA tiene una alta sensibilidad, también se han encontrado niveles de PSA inferiores a 4ng/ml en pacientes con cáncer de próstata (Leibovici y cols., 2007). Por lo que actualmente no hay un consenso claro acerca del umbral óptimo del PSA para llevar a cabo una biopsia.

A tenor de lo expuesto anteriormente, es prioritaria la búsqueda de biomarcadores pronósticos precisos para distinguir entre pacientes sanos, pacientes con un cáncer de bajo riesgo y de alto riesgo (metástasis y CRPC). Además, dada la inexistencia de biomarcadores predictivos en el CRPC, urge su desarrollo para poder identificar la probabilidad del beneficio de una terapia específica en el paciente.

3.2 Metabolómica en cáncer de próstata

La metabolómica tiene como objeto de estudio los patrones y las concentraciones de metabolitos pequeños, tales como: intermediarios metabólicos, productos finales resultantes de las reacciones bioquímicas que suceden en la célula, metabolitos secundarios, hormonas y otras moléculas de señalización cuya masa oscila entre los 80-1000 Dalton. La búsqueda de marcadores específicos del cáncer de próstata

Introducción

que superen los inconvenientes del PSA descritos anteriormente, ha fomentado el desarrollo de estudios metabolómicos con esa finalidad.

La presencia en las células tumorales de cambios metabólicos así como en los requerimientos energéticos, no es un hecho novedoso. Desde el siglo pasado se conoce el denominado efecto *Warbug*, en el que se describe como las células tumorales incrementan la producción de lactato a partir de la glucosa, incluso en condiciones no hipóxicas, para satisfacer la demanda energética de éstas (Koppenol y cols., 2011).

El auge del interés por el estudio del perfil metabolómico y su aplicación para la búsqueda de marcadores en el cáncer de próstata, llegó de la mano de un estudio en el que se señaló a la sarcosina (metabolito intermediario del metabolismo de la glicina) como un prometedor indicador de la progresión del cáncer de próstata. Se detectó su presencia en orina aunque no hubo una fuerte discriminación entre pacientes con biopsia positiva con respecto a los de biopsia negativa. Sin embargo, a diferencia de las muestras de tejido benigno, sí encontraron que los niveles de sarcosina están incrementados en el 79% de las muestras de tejido de pacientes con metástasis y en el 42% de las muestras de tejido de cáncer de próstata localizado (Sreekumar y cols., 2009). Estos resultados fueron apoyados por experimentos *in vitro*, en los que se encontraron niveles más altos de sarcosina en líneas celulares de cáncer de próstata en comparación con células epiteliales normales y además, el silenciamiento de la enzima encargada de la conversión de glicina a sarcosina, la glicina-N-metiltransferasa, consiguió reducir la capacidad de invasión celular en las células tumorales DU145 (Sreekumar y cols., 2009). Por otro lado, niveles citoplasmáticos elevados de dicha enzima se han relacionado con una puntuación de Gleason superior y con una menor supervivencia (Song y cols., 2011).

El hallazgo de la sarcosina como marcador en cáncer de próstata ha dado lugar a numerosos estudios para intentar verificar este resultado. En un ensayo posterior analizaron la presencia de este metabolito en muestras de orina de pacientes sanos y con cáncer de próstata, llegando a la conclusión de que la sarcosina no es un biomarcador adecuado, al no encontrar diferencias significativas en ambos grupos (Jentzmik y cols., 2010). A partir de aquí, hay bastante controversia en la literatura y no se ha conseguido dilucidar si la sarcosina es un indicador adecuado para esta enfermedad (Cao y cols., 2011; Khan y cols., 2013).

Otro metabolito que ha suscitado interés es el citrato (metabolito intermediario del ciclo de Krebs) cuya concentración en el líquido prostático es mucho mayor que en plasma, gracias a la elevada cantidad de zinc que inhibe a la enzima aconitasa encargada de su oxidación (Costello y cols., 1997). En cáncer de próstata los transportadores de zinc están inhibidos, habiendo una reducción de los niveles intracelulares de éste. Como consecuencia, hay una activación de la aconitasa catabolizándose el citrato, lo que supone una fuente de energía adicional (Mycielska y cols., 2009). En concordancia con lo expuesto anteriormente, perfiles metabolómicos en secreciones prostáticas muestran una clara disminución de los niveles de citrato en pacientes con cáncer de próstata respecto a los sanos (Serkova y cols., 2008). Del mismo modo, la disminución de citrato en cáncer se ha relacionado con la agresividad del mismo (Giskeodegard y cols., 2013; McDunn y cols., 2013).

Las poliaminas, espermidina y espermina, son sintetizadas a partir de la arginina y S-adenosilmetionina e intervienen en funciones relacionadas con el crecimiento y diferenciación celular (síntesis de ADN, regulación de la transcripción, etc.). El tratamiento con andrógenos en líneas celulares de cáncer de próstata altera el metabolismo de aminoácidos y componentes del metabolismo del nitrógeno, encontrándose altos niveles de espermina y espermidina lo cual, indica un incremento de la utilización de aminoácidos requeridos en los estadios tempranos del desarrollo del tumor (Putluri y cols., 2011). Sin embargo, la espermina podría funcionar como un inhibidor del crecimiento del cáncer de próstata, puesto que la detección de bajos niveles de dicho metabolito en tejido y secreciones de pacientes con cáncer de próstata avanzado, indican que puede ser un candidato como marcador de agresividad (Serkova y cols., 2008; Giskeodegard y cols., 2013; McDunn y cols., 2013).

Otro de los metabolitos susceptibles de ser empleados como biomarcadores para la prognosis del cáncer de próstata es la colina y los metabolitos derivados de ésta. En condiciones fisiológicas, la colina es un metabolito esencial para la síntesis de las membranas celulares, el metabolismo de fosfolípidos y como donador de grupos metilo. El aumento de los niveles de colina en cáncer se ha asociado a una mayor actividad de los transportadores involucrados en su captación así como un incremento de la síntesis endógena. La colina fomenta la proliferación al facilitar la síntesis de membranas celulares, altera la señalización celular mediada por fosfolípidos derivados y afecta a la metilación y mecanismos de reparación del ADN (Zeisel y da Costa, 2009). El análisis

metabolómico de tejidos de pacientes con cáncer de próstata con respecto a tejidos benignos muestra altos niveles de fosfolípidos, entre los que se encuentran algunos derivados de la colina como la fosfocolina y la glicerofosfocolina. Dichos metabolitos permiten la discriminación entre individuos con una baja puntuación de Gleason respecto a los de mayor puntuación, siendo más elevados en éstos últimos (Keshari y cols., 2011; Awwad y cols., 2012).

Por último, en estadios avanzados de la enfermedad aparecen otros cambios significativos del perfil metabolómico destacables. Este es el caso de los altos niveles de colesterol encontrados en pacientes con cáncer de próstata con metástasis ósea en comparación con los pacientes sin afectación ósea, cuya medición podría ser útil para discernir el estadio de la enfermedad (Thysell y cols., 2010).

La metabolómica es un área en expansión que se postula como una herramienta prometedora para incrementar el conocimiento, mejorar el diagnóstico y el tratamiento frente al cáncer. Como se ha descrito con anterioridad, actualmente el foco principal está puesto en la búsqueda y validación de metabolitos de muestras obtenidas mediante técnicas no invasivas (suero u orina), que sirvan de biomarcadores para el cáncer de próstata. Además, su uso se puede extender con vistas a mejorar la estadificación del cáncer y la caracterización de la eficacia de un tratamiento específico (Trock, 2011; Vermeersch y Styczynski, 2013).

3.3 Proteómica en cáncer de próstata

El desarrollo de la genómica ha hecho posible la secuenciación del genoma humano, estimando el número total de genes que codifican proteínas en torno a los 20.000 (Ezkurdia y cols., 2014). Dado que un gen puede codificar más de una proteína, es esperable que el proteoma humano esté constituido por una cifra mucho mayor al del genoma. La existencia de esta abrumadora cantidad de genes y proteínas ha desplazado el centro de interés de los métodos tradicionales de caracterización individual de genes o proteínas, hacia el desarrollo de nuevas metodologías capaces de analizar el máximo número de componentes posibles.

La proteómica se encarga del análisis y cuantificación del conjunto de proteínas codificadas por el genoma, incluyendo las isoformas, las modificaciones post-traduccionales y también las interacciones entre ellas. Similarmente a lo que sucede con

la metabolómica, los objetivos actuales de la proteómica están derivando hacia el estudio de las proteínas y sus variaciones en diversas condiciones fisiológicas y patológicas como el cáncer, con el fin de desarrollar nuevos biomarcadores más precisos y encontrar dianas terapéuticas (Pin y cols., 2013; Shruthi y cols., 2016). Hay una gran cantidad de publicaciones realizadas en esta área cuyos análisis se han efectuado fundamentalmente: en tejido, plasma y orina.

Análisis proteómico en tejido

En biopsias de tejido tumoral el perfil proteómico revela un mayor número de alteraciones que las que se pueden encontrar en fluidos biológicos. Por lo que aumenta la posibilidad de encontrar algún cambio de patrón proteico capaz de emplearse como biomarcador y, además, contribuye al conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo y progresión del cáncer. En la proteómica de poblaciones celulares aisladas de muestras de tejido (mediante microdissección por captura láser seguido de la espectrometría de masas), apareció la proteína PCa-24 expresada en el 94% de las muestras de cáncer de próstata, mientras que en las muestras normales y con hiperplasia benigna prostática (BHP) no se detectó (Zheng y cols., 2003). Otros autores han identificado la proteína GDF15 en el 60% de muestras de cáncer de próstata, en el 40% de muestras de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y una expresión nula en muestras de tejido normal. Esto ha llevado a los autores a sugerir que GDF15 podría ser un marcador de los estadios tempranos de este tipo de cáncer (Cheung y cols., 2004). En otro ensayo proteómico en el que han comparado muestras de tejido tumoral con muestras de BHP, han hallado la desregulación en la expresión de 13 proteínas que ya estaban asociadas con cáncer en estudios proteómicos y genómicos previos, y que son: constituyentes de los filamentos intermedios (KRT8, KRT18 y DES), proteínas con un papel supresor (ARHGAP1, AZGP1, GSTM2 y MFAP4), con funciones de transporte y organizadoras de membrana (FABP5, GC y EHD2), chaperonas (FKBP4 y HSPD1) y un marcador tumoral (NME1). Además, encontraron la desregulación de 9 proteínas nuevas (CSNK1A1, ARID5B, LYPLA1, PSMB6, RABEP1, TALDO1, UBE2N, PPP1CB y SERPINB1). De tal forma que se propone que estas alteraciones proteicas podrían ser validadas como biomarcadores de inicio y progresión de la enfermedad, siendo capaces de diferenciar pacientes con cáncer de los que tienen BHP (Davalieva y cols., 2015). Otros estudios han identificado que la proteína periostina está sobreexpresada en cáncer de próstata en comparación con la BHP (Sun y cols., 2011).

Introducción

En este sentido se ha propuesto un panel de proteínas para distinguir entre la BHP y el cáncer de próstata, estableciendo que en el cáncer de próstata hay una sobreexpresión de las proteínas disulfuro isomerasa, 14-3-3, enoil-CoA hidratasa, prohibitina, β -tubulina y una inhibición de las proteínas queratina-II, desmina, HSP71, ATP sintasa- β y creatina quinasa β (Alaiya y cols., 2011).

El posible uso de las proteínas e-FABP5, MCCC2, PPA2, Ezrin y SLP2 como biomarcadores de cáncer de próstata con metástasis en los ganglios linfáticos, radica en los elevados niveles de expresión de dichas proteínas que han sido detectados en muestras de estos pacientes en comparación con los que tienen cáncer de próstata localizado. Lo contrario ocurre con las proteínas SM22 y CRPM4 que actúan como supresores de metástasis en los ganglios linfáticos (Gao y cols., 2010; Pang y cols., 2010).

Para diferenciar tumores con distinta estadificación, el estudio comparativo entre muestras de cáncer de próstata con una puntuación de Gleason 6 con respecto a otro de 8, resultó en 19 proteínas expresadas diferencialmente. Se concluyó que una de ellas, la Lamina A, podría ser un buen marcador para diferenciar tumores con alta y baja puntuación de Gleason (Skvortsov y cols., 2011). Por otro lado, el perfil proteómico de muestras de tejido de paciente y el análisis llevado a cabo en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata, muestran que las proteínas AMACR y EZH2 pueden ser unos candidatos potenciales para discriminar entre los cánceres de próstata más y menos agresivos (Yocum y cols., 2010). También se ha observado mediante técnicas proteómicas una hiperactivación de las tirosina quinasas EGFR, JAK2, ABL1 y SRC, lo que sugiere que el uso de inhibidores de dichas quinasas podría ser útil para el tratamiento avanzado del cáncer (Drake y cols., 2012).

Proteómica en fluidos biológicos

Resulta aún más atractiva la búsqueda de biomarcadores de cáncer de próstata en plasma, orina, semen y secreciones prostáticas, dada su fácil obtención sin el uso de técnicas invasivas y su bajo coste. La razón de su utilidad sería que a consecuencia del proceso tumoral, se produce la liberación de proteínas específicas a estos fluidos cambiando sus patrones de expresión proteica. La elaboración de un panel integrado por 4 proteínas (ATPasa γ , colágeno α -1 (III), colágeno α -1 (I) y SPRI) fue validado en muestras de orina de 118 pacientes con cáncer de próstata y 95 muestras de pacientes

sanos, observando que esta enfermedad fue detectada con un 89% de sensibilidad y un 51% de especificidad (Theodorescu y cols., 2008). En muestras de sangre y orina de otros 113 pacientes se ha probado otro test que incluye el análisis combinado de los niveles de las proteínas AMACR, MMP-2, GSTP1 y RASSF1A, obteniendo un incremento significativo del potencial diagnóstico en comparación con el test individual de PSA (Prior y cols., 2010). El perfil proteómico obtenido por espectrometría de masas de secreciones prostáticas ha revelado la presencia de más de 1000 proteínas, de las cuales 49 son específicas de la próstata y pueden servir para evaluar las diferencias entre individuos sanos con respecto a los que presentan cáncer (Principe y cols., 2012). Otro estudio llevado a cabo en muestras de fluido prostático muestra un perfil proteómico constituido por 34 proteínas que permiten diferenciar entre el cáncer de próstata localizado y el extra-prostático (Kim y cols., 2016). Otra proteína candidata como biomarcador de agresividad en cáncer de próstata es la β 2M, cuya expresión modula el crecimiento dependiente de andrógenos en las células LNCaP e interviene en la EMT promoviendo la formación de metástasis *in vivo*, encontrándose altos niveles de expresión en secreciones prostáticas y en sueros de pacientes con cáncer de próstata con metástasis (Gross y cols., 2007). Un ejemplo más, son los altos niveles de la proteína ZAG detectados en el plasma seminal de pacientes con cáncer de próstata con respecto al de donantes sanos. En relación a este hallazgo, también se han detectado niveles más elevados en pacientes con cáncer con una alta puntuación de Gleason (Byrne y cols., 2009).

La proteómica no solo está restringida a la búsqueda de biomarcadores, sino también a encontrar nuevas dianas terapéuticas y proteínas responsables de resistencia a los tratamientos frente al cáncer. Por ejemplo, en células PC-3 sensibles al tratamiento con docetaxel y resistentes a éste, se han identificado como responsables de la resistencia a las proteínas MIC-1 y ARG2 encontrándose sobreexpresada e inhibida, respectivamente. Los resultados de MIC-1 han sido extrapolados a muestras de plasma de pacientes cuyo análisis muestra niveles más elevados de dicha proteína después de recibir un ciclo de quimioterapia, asociándose con una progresión de la enfermedad y una supervivencia menor después del tratamiento (Zhao y cols., 2009). Algunos estudios proteómicos han permitido hallar nuevas proteínas candidatas como dianas terapéuticas del CRPC, como las proteínas CAV1 y 2, puesto que los niveles de expresión en el plasma de pacientes con CRPC son significativamente mayores que en

Introducción

aquellos que no lo tienen. Además, resultados similares en modelos celulares confirman los niveles elevados de dichas proteínas en la línea celular PC-3 con respecto a las células LNCaP (Sugie y cols., 2015).

La proteómica también se ha interesado en el estudio de los prostasomas, los cuales son microvesículas extracelulares liberadas por parte de las células normales y tumorales a los fluidos biológicos. Su función es transportar a células vecinas proteínas, micro-ARN y ARN. La importancia de los prostasomas en cáncer radica en que se ha encontrado un mayor nivel de éstos en sangre de pacientes con cáncer de próstata con respecto a pacientes sanos y con biopsias benignas. Además, dichos resultados permiten discernir entre pacientes con unas puntuaciones de Gleason altas de las bajas, reflejando la agresividad de esta patología (Tavoosidana y cols., 2011). Los análisis de prostasomas en muestras de orina en pacientes con cáncer de próstata contienen las proteínas LAMTOR y TM256, reflejando su potencial uso en el diagnóstico al aumentar la sensibilidad y especificidad a porcentajes cercanos al 100% (Overbye y cols., 2015). No obstante, uno de los inconvenientes de analizar los fluidos biológicos es que contienen una mezcla de microvesículas de diferentes tipos celulares, lo que dificulta la interpretación de los resultados. El estudio de prostasomas en experimentos *in vitro*, como los liberados por la línea tumoral PC-3, ha identificado entre otras: proteínas implicadas en el transporte de vesículas, del citoesqueleto, chaperonas e integrinas que solapan en un 35% con el proteoma de microvesículas de células de cáncer de colon o vejiga. No obstante, se ha propuesto como biomarcadores específicos del cáncer de próstata a las proteínas CD151 y CDCP1 contenidas en dichos prostasomas (Sandvig y Llorente, 2012).

En definitiva, el desarrollo de la proteómica ha demostrado que el uso de un solo biomarcador es insuficiente para realizar un diagnóstico y pronóstico preciso, apuntando hacia el desarrollo de paneles de biomarcadores. A pesar del amplio número de proteínas candidatas identificadas, estas tienen que ser aún validadas y aprobadas para su utilización en clínica.

4. Galiellalactona

4.1. Definición y mecanismo de acción

La Galiellalactona (GL) es un metabolito fúngico que presenta propiedades antitumorales y anti-inflamatorias. La GL se aísla del hongo *Galiella rufa* (cepas A75-86 y A111-95), perteneciente a la división *Ascomycota*, que se caracteriza por crecer en forma de racimos en la madera en zonas de Norteamérica y Malasia. No obstante, también se ha descrito su producción de forma sintética (Johansson y Sterner, 2002).

Los estudios iniciales con la GL se llevaron a cabo en un área muy diferente al cáncer, puesto que se describió como un inhibidor débil de la fitohormona ácido giberélico en semillas de trigo. Posteriormente, se observó que la GL es capaz de inhibir la ruta de señalización celular IL-6/JAK/STAT3 en la línea celular de carcinoma de hígado HepG2, al interferir en la unión del factor de transcripción STAT3 activado a sus sitios de unión específicos al ADN (Weidler y cols., 2000).

Más adelante, las investigaciones con la GL han focalizado su interés en estudiar su actividad y mecanismo de acción frente al cáncer de próstata. Experimentos *in vitro* llevados a cabo en las líneas tumorales DU145 y PC-3, han demostrado que el tratamiento con la GL reduce la proliferación celular e incrementa la apoptosis en dichas líneas celulares (Hellsten y cols., 2008). Como se ha descrito previamente, la activación constitutiva de STAT3 está altamente relacionada con el cáncer y, en este contexto, el tratamiento con GL ha mostrado ejercer un efecto inhibitorio sobre STAT3 en líneas celulares de cáncer de próstata, cuyos niveles de este factor de transcripción activado son elevados (Hellsten y cols., 2008). El mecanismo específico por el cual la GL bloquea la transcripción llevada a cabo por STAT3, se debe a su capacidad de unirse y modificar covalentemente a las cisteínas en la posición Cys367 y Cys468 localizadas en el dominio de unión al ADN, así como la Cys-542 del dominio de enlace de STAT3, evitando su unión al ADN sin verse afectada su fosforilación (Don-Doncow y cols., 2014).

Además, se ha demostrado que la GL es capaz de promover la apoptosis y reducir la población de CSCs presentes en líneas celulares tumorales de cáncer de próstata, con niveles de STAT3 fosforilado elevados (Hellsten y cols., 2011).

Introducción

En correlación con los resultados *in vitro*, se ha constatado el papel antitumoral de la GL *in vivo*. Concretamente, la administración intraperitoneal en modelos de ratón inmunodeprimidos con xenoinjertos de células DU145 y PC-3, provoca una disminución del volumen del tumor en comparación con el grupo control (Hellsten y cols., 2008; Canesin y cols., 2016).

La GL también tiene otros efectos en otras rutas importantes de señalización celular en cáncer. Por un lado, la GL es capaz de antagonizar los efectos angiogénicos y metastásicos que promueve el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) *in vitro*. En este caso, la GL estaría bloqueando específicamente la unión al ADN de las proteínas SMAD 2/3 que median en la respuesta a TGF β y, por ende, en el proceso de transcripción (Rudolph y cols., 2013). Por otro lado, la GL también se une al miembro de la familia de NF- κ B, p65, impidiendo la asociación con la importina α 3 y evitando su translocación al núcleo. Por tanto, esta molécula actúa como un potente inhibidor de la actividad transcripcional promovida por NF- κ B (Perez y cols., 2014).

Cabe destacar que la GL también presenta interesantes efectos biológico en otros modelos no tumorales. Así, este metabolito fúngico es eficaz en un modelo murino de asma al inducir un cambio en las poblaciones de células dendríticas pulmonares debido a la inhibición de STAT3 (Hausding y cols., 2011). Recientemente, se ha publicado otro estudio llevado a cabo en ratones que carecen de la Apolipoproteína E utilizados como modelo de arterioesclerosis, en el que refleja como la GL reduce la transcripción de genes pro-inflamatorios, la coagulación de la sangre y la adhesión de plaquetas a la pared de los vasos sanguíneos. Estos efectos anti-inflamatorios estarían mediados por la capacidad de la GL de inhibir las rutas de señalización de NF- κ B y STAT3, proponiendo que esta molécula podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Bollmann y cols., 2015).

Introducción

II. Objetivos

El cáncer de próstata es el segundo tipo de cáncer más frecuente en varones y el CRPC representa la quinta causa de muerte por cáncer en hombres. Los recientes avances en el tratamiento frente al CRPC han mejorado ligeramente la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes, no obstante, continúa siendo una enfermedad incurable y finalmente mortal. Por ello, es fundamental el desarrollo de nuevos fármacos así como el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas que aumenten las expectativas de supervivencia e incluso la curación del CRPC. Así, los objetivos del presente trabajo han sido:

- 1- Identificación de nuevos mecanismos de acción antitumoral de la GL.
- 2- Estudio de la eficacia antitumoral *in vivo* de la GL y su efecto sobre el perfil metabólico en plasma de ratones xenotransplantados.
- 3- Análisis proteómico de la respuesta del cáncer de próstata a la GL.
4. Estudio de relación estructura función de una librería de análogos de GL sobre diferentes dianas celulares y moleculares.

*III. Materiales y métodos
experimentales*

1. Líneas celulares

Las líneas celulares fueron adquiridas por la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA), con excepción de los fibroblastos dérmicos normales humanos (HNDFs) procedentes de Innoprot (Bizkaia, España) y las células madre mesenquimales (hMSC) que se obtuvieron a partir de la médula ósea procedente de 3 donantes reclutados, con su consentimiento informado, a través del Programa de Transplante de Médula Ósea del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, España). Las hMSC se identificaron mediante citometría de flujo expresando los antígenos de superficie CD105, CD73 y CD90 en aproximadamente el 99% de la población, mientras que en menos del 2% de la población se detectó la expresión de CD14, CD34 y CD45.

Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C, en una atmosfera humidificada con un 5% de CO₂, controlando que estuvieran libres de micoplasma y contaminación cruzada (Tabla 3).

Línea Celular	Descripción	Medio de Cultivo
22Rv1	Carcinoma de próstata	
A549	Carcinoma de pulmón	
DU145	Carcinoma de próstata	
HaCaT	Queratinocitos	RPMI 1640 + 10% FBS +
H1299	Carcinoma de pulmón	1%
Jurkat	Leucemia aguda de células T	Penicilina/Estreptomicina
LNCaP	Carcinoma de próstata	
PC3	Adenocarcinoma de próstata	
HEK-293T	Riñón embrionario	
HNDFs	Fibroblastos dérmicos	
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix	
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de mama	DMEM + 10% FBS + 1%
NIH3T3	Fibroblastos embrionarios	Penicilina/Estreptomicina
SK-N-SH	Neuroblastoma	
SW480	Adenocarcinoma de colon	
VCaP	Carcinoma de próstata	
RWPE-1	Epitelio normal de próstata	Queratinocitos SFM + BPE 0.05 mg/ml + EGF 5 ng/ml
MSC	Células madre mesenquimales	α-MEM + 15% FBS + Glu 2mM + bFGF 1ng/ml

Tabla 3. Líneas celulares empleadas en los ensayos experimentales.

2. Análisis del ciclo celular y apoptosis por citometría de flujo

En general las células se sembraron con una densidad celular de 4×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron todo el día para permitir su adherencia a la superficie de la placa. Al día siguiente, se aplicaron los tratamientos específicos correspondientes. Para el estudio del ciclo celular se procedió a la fijación de las células. Para ello, se despegaron las células con tripsina, se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) a 4°C. Las células se resuspendieron en 700 μ l de etanol al 70%, añadiéndolo gota a gota y mezclando en agitación suave. Tras la incubación a 4°C toda la noche se hicieron 2 lavados en PBS con sus respectivas centrifugaciones a 3500 rpm, 5 min. Por último, se eliminó el ARN de las muestras mediante el tratamiento con ARNasa A 50 U/ml y se tiñeron con yoduro de propidio (PI) 1 mg/ml, incubándose 2 horas en agitación, en oscuridad y a temperatura ambiente.

Para el ensayo de apoptosis, se empleó el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (ZVF) (40 μ M) (Enzo Life Technologies, Farmingdale, NY, EE.UU.). Las células se lavaron con PBS frío y se centrifugaron a 2500 rpm, 5 min, resuspendiéndose con 100 μ l de solución tamponada de unión a Anexina (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2.5 mM pH 7.4). Posteriormente se añadieron 5 μ l de Anexina V conjugada con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes by life technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y 2 μ l de PI (1 mg/ml), incubando durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las muestras se incubaron con 400 μ l de solución tamponada de unión a Anexina.

Tanto la distribución de las fases del ciclo celular como la apoptosis se llevó a cabo empleando el citómetro de flujo BD FACSCanto™ (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) con el software BD FACSDiva™.

3. Detección de proteínas por Western blot

Las células se despegaron mediante un rascador o tripsina y se realizaron 2 lavados con PBS previamente enfriado, obteniendo el pellet celular centrifugando 2 min, a 13000 rpm y 4°C. Los extractos celulares se obtuvieron incubando las células en solución de lisado (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, glicerol al 10% y NP-40 al 1%) suplementado con NaF 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM y los inhibidores de proteasas

leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml y PMSF saturado 1 µl/ml. Después de 15 min de incubación en hielo, se centrifugaron 15 min a 13000 rpm a 4°C y se calculó la concentración de proteínas de cada una de las muestras con el método Bradford. A continuación, se añadió solución Laemmli 1x (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, SDS al 10%, glicerol al 30%, DTT al 10% y azul de bromofenol al 0.012%) y se hirvieron 3 min a 95°C para desnaturalizar las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en gel de poliacrilamida con SDS cargando 40-60 µg de proteína/pocillo, aplicando un voltaje de 80-90 V a su paso por el gel concentrador y de 120 V por el gel separador. Las proteínas del gel se transfirieron a membranas de PVDF utilizando un voltaje de 24 V durante 30 min por membrana. Dependiendo de si la proteína está fosforilada o no, se incubaron las membranas con el tampón de bloqueo con albúmina de suero bovino al 5% en TRIS-buffer salino y Tween-20 al 0.1% (TBST), o bien, con leche en polvo sin grasa al 5%, durante 1 h en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el anticuerpo primario correspondiente incubando durante toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se hicieron 3 lavados de 10 min con TBST y se incubó 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con la peroxidasa de rábano. Finalmente, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con TBST y se reveló mediante quimioluminiscencia empleando Westar Nova 2011 (Cyanagen Srl, Bolonia, Italia) consistente en una mezcla de una solución de luminol mejorado con una solución de peróxido en un ratio 1:1 cuya señal de la proteína se capturó a través de ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EE.UU.).

Los anticuerpos fueron adquiridos a Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.), Millipore (Billerica, MA, EE.UU.), Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, EE.UU.), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.) y Proteintech Group (Manchester, Reino Unido). En todos los casos, los anticuerpos se emplearon a la dilución recomendada por el fabricante (Tabla 4).

Anticuerpo	Referencia	Fabricante	
ATM (D2E2)	2873	Cell Signaling Technology	
ATR (E1S3S)	13934		
Caspasa 3 (8G10)	9665		
CDC25A (DCS-120)	MA5-13795	Thermo Scientific	
CDC25C (5H9)	4688	Cell Signaling Technology	
CDK2 (M2)	sc-163	Santa Cruz Biotechnology	
CDK4	C8218	Sigma-Aldrich	
CHK1	2360	Cell Signaling Technology	
CHK2 clon 7	05-649	Millipore	
Ciclina A2 (BF683)	4656	Cell Signaling Technology	
Ciclina B1 (D5C10)	12231		
Ciclina D1	C7464	Sigma-Aldrich	
Ciclina E2	4132	Cell Signaling Technology	
Flag (M2)	A2220	Sigma-Aldrich	
HA	11867423001		
KEAP1	K2769		
Myt1	4282	Cell Signaling Technology	
NF-κB p65 (F-6)	sc-8008	Santa Cruz Biotechnology	
NRF2 (C-20)	sc-722		
NUSAP1	12024-1-AP	Proteintech Group	
p21 Waf1/Cip1 (12D1)	2947	Cell Signaling Technology	
p53 (DO-1)	sc-126	Santa Cruz Biotechnology	
PARP	9542	Cell Signaling Technology	
p-ATM (Ser1981) (D6H9)	5883		
p-ATR (Ser428)	2853		
p-CDC2 (Tyr15) (10A11)	4539		
p-CDC25C (Ser216)	9528		
p-CHK1 (Ser345) (133D3)	2348		
p-CHK2 (Thr68) (C13C1)	2197		
p-H2AX (Ser139) (20E3)	9718		
p-H3 (Ser10) (D2C8)	3377		
PLK1 (208G4)	5413P		
p-NF-κB (Ser536)	3031		
p-STAT3 (Tyr705) (D3A7)	9145		
p-Wee1 (Ser642) (D47G5)	4910		
RBMX/hnRNP G (D7C2V)	14794		
STAT3 (124H6)	9139		
Transgelin/SM22	10493-1-AP		Proteintech Group
UCH-L1 (C-4)	sc-271639		Santa Cruz Biotechnology
Zixina	3553	Cell Signaling Technology	
α-Tubulina	T9026	Sigma-Aldrich	
β-Actina	A5316		

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en *Western blot*, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.

4. Ensayo viabilidad celular por MTT

En placas de 96 pocillos se sembraron las células con una densidad de 1×10^4 y una vez incubadas con los tratamientos pertinentes, se incubaron 3-4 h en oscuridad con una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a 5mg/ml. A continuación se decantó el medio de cada pocillo cuidadosamente y se añadieron 100 μ l de DMSO. De esta manera, las células vivas son capaces de reducir el MTT (coloración amarilla) a formazán (color violeta), midiéndose la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm con el lector de placa TECAN (Tecan Group Ltd, Suiza).

5. Inmunocitoquímica

Las células se sembraron con una densidad celular de 5×10^4 en cubreobjetos de vidrio pre-tratados con poli-D-lisina para potenciar su adherencia. Una vez realizado los tratamientos correspondientes, las células se fijaron con para-formaldehído al 4% durante 20 min, seguido de 3 lavados en PBS. Las células se permeabilizaron mediante la incubación durante 10 min con tritón X-100 al 0.12% y se repitieron los 3 lavados en PBS. En primer lugar, se añadió el anticuerpo primario correspondiente y luego el anticuerpo secundario, incubando durante 1 h, a temperatura ambiente y en oscuridad con cada uno de ellos. A continuación, para la tinción de los núcleos celulares se empleó el medio de montaje Vectashield con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EE.UU.) y se colocó el cubreobjetos de vidrio con las células sobre el portaobjetos, dejándolo secar y sellado. Finalmente las imágenes se tomaron con el microscopio confocal de láser de barrido LSM 5 EXCITER, usando el objetivo en aceite 63x/1.40 y con el software ZEN 2008 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

6. Medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se sembraron las células en placas de 96 pocillos y se utilizó el tert-butilhidroperóxido (TBHP) 400 μ M como inductor de la producción de ROS, mientras que como inhibidor se empleó el antioxidante N-acetil cisteína 15 mM (NAC). Las células se incubaron durante 3 h con los tratamientos correspondientes en condiciones de oscuridad y a 37°C. Posteriormente se retiró el medio, y se incubaron durante 20 min a 37°C en oscuridad, con 100 μ l por pocillo de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) 1 μ M, el cual se utiliza como indicador de ROS debido a que tras la

disociación de los grupos de acetato por parte de las esterasas intracelulares y la oxidación, se transforma en 2,7-diclorodihidro fluoresceína (DCF) el cual es altamente fluorescente. La medición de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 450 nm y de 535 nm de emisión se llevó a cabo con el TECAN GENios Pro (Tecan Group Ltd, Suiza).

7. Ensayo de cicatrización de la herida

Se sembraron 5×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos, incubándose toda la noche para permitir su adherencia a la placa. Cuando se formó una monocapa celular resultante de la confluencia celular del 100%, se procedió a realizar una herida en la zona central del pocillo a través del dispositivo Wound Maker (Essen Bioscience) y las células que se levantaron, fueron retiradas tras hacer un lavado con PBS. Una vez aplicados los estímulos correspondientes junto con 5 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C (Enzo Life Technologies, Farmingdale, NY, EE.UU.), un inhibidor de la síntesis de ADN, se monitorizó el cierre de la herida durante las 24 h posteriores. Para ello, se tomaron imágenes utilizando el sistema de imagen IncuCyte ZOOM (Essen Bioscience, Hertfordshire, Reino Unido) y cuantificándolo como porcentaje de confluencia de la herida.

8. Electroforesis en gel de células individuales (Ensayo Cometa)

Las células DU145 se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 4×10^5 células por pocillo y se dejaron adhiriéndose durante toda la noche. Al día siguiente se trataron las células durante 24 h con GL y se empleó etopósido como control positivo del experimento al producir rupturas en las hebras de ADN. Las células se recogieron y se centrifugaron a 1500 x g durante 2 min, descartando el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS frío. El pellet de células se resuspendió en PBS frío y para detectar el daño al ADN se utilizó el kit OxiselectTM Comet Assay (Cell Biolabs Inc, San Diego, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se combinaron las células con agarosa de bajo punto de fusión en un ratio de 1:10 (v/v) la cual fue previamente licuada tras ser calentada a 90-95°C durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 75 μl por pocillo de esta mezcla al portaobjetos OxiselectTM Comet manteniéndose en posición horizontalmente a 4°C en oscuridad, durante 15 min. Para la lisis de las células se transfirió el portaobjetos a un recipiente con buffer de lisis 1X (NaCl 14.6 g, EDTA 20 ml, solución de lisis 10X, DMSO 10 ml)

enfriado previamente, quedando sumergido durante 45 min a 4°C, en oscuridad. Acto seguido, se introdujo en la solución alcalina pre-enfriada durante 30 min a 4°C para desnaturalizar el ADN. A continuación, se llevó a cabo la electroforesis en condiciones alcalinas (NaOH 300 mM, pH>13, EDTA 1 mM) aplicando un voltaje de 1 V/cm y 300 mA durante 30 min. Se realizaron 3 lavados de los portaobjetos con la muestra en un recipiente con agua miliQ pre-enfriada y se dejaron en etanol frío al 70% durante 5 min. Para la tinción del ADN, las muestras se incubaron con Vista Green 1X durante 15 min, a temperatura ambiente protegido de la exposición de la luz. Las imágenes se tomaron con el microscopio de fluorescencia Leica DM2500 y se cuantificó la longitud y la fracción total de ADN en la cola del cometa expresada como momento de la cola (*tail moment*) usando el software Casp (CASPlab, Wrocław, Polonia).

9. Modelo animal de xenoinjertos con células DU145 de cáncer de próstata

Se usaron un total de 30 ratones atímicos (Foxn1nu), machos de 6 semanas de edad, con condiciones de acceso libre a una dieta estándar irradiada, agua esterilizada, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, humedad relativa en torno al 40-50% y una temperatura de 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Todos los procedimientos experimentales que se llevaron a cabo han seguido las directrices de la Unión Europea y el Comité ético de la Universidad de Córdoba (2014PI/015). Antes de comenzar el experimento, los ratones estuvieron una semana de periodo de adaptación al animalario.

Los ratones se repartieron aleatoriamente en 6 grupos (Tabla 5), cada uno de ellos con 5 integrantes (n=5):

Grupos experimentales
Control
DU145
DU145 shARN-STAT3
DU145 shARN-p65
DU145+GL
<u>DU145+GL (Tto. Temprano)</u>

Tabla 5. Grupos experimentales del modelo animal

Para realizar los xenoinjertos se recogieron 3×10^6 de las células específicas de cada grupo cultivadas *in vitro*, y se inyectaron subcutáneamente en el flanco derecho de los ratones. Transcurridas 4 semanas cuando los tumores estaban bien establecidos, se

comenzó a aplicar el tratamiento con GL al grupo correspondiente (DU145+GL). Concretamente, a cada uno de los ratones integrantes de este grupo se le administraron inyecciones intraperitoneales diarias de GL 3mg/kg durante 3 semanas, mientras que el resto de grupos recibieron inyecciones con el vehículo DMSO al 1% en PBS. Durante todo el proceso, se pesaron los ratones para controlar la evolución del peso corporal, así como el volumen del tumor el cual se estimó cada 3-4 días a través de un calibre Vernier empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Longitud (mm)} \times \text{ancho (mm)} \times 0.5632$$

Una vez terminado el tratamiento farmacológico con GL, todos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se llevó a cabo la extracción de sangre por punción cardíaca para el análisis del perfil metabólico y también se extirparon los tumores para su pesado en una balanza de precisión y fijación en para-formaldehído al 4% para su posterior estudio histológico.

10. Inmunohistoquímica

Los tumores extirpados de los ratones se fijaron en para-formaldehído al 4% y fueron embebidos en parafina mediante un procesador de tejidos, para su posterior cortado con el micrótopo de rotación en secciones cuyo grosor es de 5 μ M. Las secciones de tejido se colocaron en portaobjetos tratados con poli-D-lisina. A continuación, se llevó a cabo el proceso de desparafinación y rehidratación mediante incubaciones sucesivas de 5 min en xilol, etanol al 100%, etanol al 96%, etanol al 80% y agua.

Las muestras se cubrieron con el buffer citrato sódico 10 mM pH 6 y se sometieron a 98°C para producir el desenmascaramiento antigénico. Tras enfriarse, se realizaron 2 lavados de 3 min con 0.1% de PBS-Tween-20 y se bloqueó la peroxidasa endógena incubando con metanol y peróxido de hidrógeno al 0.3%, durante 30 min a temperatura ambiente. Se llevó a cabo el bloqueo de las uniones inespecíficas con una incubación de 30 min a temperatura ambiente con IHC Select Blocking Reagent (Merck Millipore, Billerica, MA, EE.UU.), seguido de la incubación durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario H2AX fosforilado (Ser139). Se hicieron 2 lavados de 3 min con 0.1% de PBS-Tween-20 y se incubó con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (Merck Millipore, MA, EE.UU.) durante 4 h a temperatura ambiente. A

continuación, se repitió el lavado con 0.1% de PBS-Tween-20 y se incubó la muestra durante 45 min con el complejo peroxidasa de rábano-estreptavidina, seguido de un nuevo lavado con 0.1% de PBS-Tween-20. Las muestras se revelaron con 3,3-diaminobencidina (DAB) (Merck Millipore, Billerica, MA, EE.UU.), se realizaron 3 lavados en 0.1% de PBS-Tween-20, se tiñeron 15 s con hematoxilina y se hicieron 2 lavados en agua destilada. Seguidamente tuvo lugar el proceso de deshidratación de la muestra que consistió en incubar durante 1 min en etanol al 80%, 2 min en etanol al 96%, 5 min en etanol al 100%, 5 min en xilol.

Finalmente, se efectuó el montaje del cubreobjetos con el medio Eukitt y se observaron y fotografiaron las secciones de tejido de los xenoinjertos con el microscopio Leica DM2500 y la cámara digital Leica DFC420c, para ser analizadas usando la herramienta ImageJ (Bethesda, MD, EE.UU.).

11. Producción de lentivirus e infección de células hospedadoras

Para la producción de lentivirus se emplearon como células empaquetadoras las células HEK-293T, sembradas a una densidad que permitió alcanzar una confluencia entre el 70-80% para poder realizar la transfección de forma óptima.

Se utilizó el sistema de producción de lentivirus de tercera generación basado en 2 plásmidos de embalaje (Rev y Gag-Pol) y el plásmido de la envuelta (VSVg) los cuales fueron obtenidos de Addgene. Para realizar la transfección, por un lado, se mezclaron 40 µl de polietilenimina (PEI) linear (Polysciences, Warrington, PA, EE.UU.) y medio de cultivo sin antibiótico ni FBS hasta 500 µl de volumen. Por otro lado, se añadieron 4 µg del plásmido Rev, 5.3 µg de Gag-Pol, 2.8 µg CMV-VSVg y 7.9 µg de uno de estos plásmido de interés:

- pLKO.1-Puro o pLKO.1-Puro-*Non-target* utilizados como controles negativos (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EE.UU.).
- shARNs (*short hairpin RNA*) para STAT3 o NF-κB (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EE.UU.) (Tabla 6).
- KEAP1 (pLenti-GIII-CMV-C-term-HA) vector lentiviral (AMB Inc., Richmond, Canadá).

Proteína diana	Nº Identificación	shARN
NF-κB p65	1	5' -CCGGCCCTTAATAGTAGGGTAAGTTCTCGAGAACTTACCCTACTATTAAGGCTTTTT - 3'
	2	5' -CCGGCGGATTGAGGAGAAACGTAAACTCGAGTTTACGTTTCTCCTCAATCCGTTTTT - 3'
	3	5' -CCGGGCAGGCTATCAGTCAGCGCATCTCGAGATGCGCTGACTGATAGCCTGCTTTTT - 3'
	4	5' -CCGGCACCATCAACTATGATGAGTTCTCGAGAACTCATCATAGTTGATGGTGTTTTT - 3'
	5	5' -CCGGCCTGAGGCTATAACTCGCCTACTCGAGTAGGGCGAGTTATAGCCTCAGGTTTTT - 3'
STAT3	1	5' -CCGGCGGATCATAAGGTCAGGAGATCTCGAGATCTCCTGACCTTATGATCCGTTTTTG - 3'
	2	5' -CCGGGCTGACCAACAATCCCAAGAAGTTCGAGTTCTTGGGATTGTTGGTCAGCTTTTTG - 3'
	3	5' -CCGGGCACAATCTACGAAGAATCAACTCGAGTTGATTCTTCGTAGATTGTGCTTTTTG - 3'
	4	5' -CCGGGCAAAGAATCACATGCCACTTCTCGAGAAAGTGGCATGTGATTCTTTGCTTTTTG - 3'
	5	5' -CCGGCATCTGAAACTACTAACTTTGCTCGAGCAAAGTTAGTAGTTTCAGATGTTTTG - 3'

Tabla 6. shARNs para STAT3 y NF-κB utilizados para la producción de lentivirus.

Las mezclas conteniendo los diferentes plásmidos y reactivos se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente, se añadieron al medio de cultivo (sin antibiótico ni FBS) donde se encontraban sembradas las células HEK-293T. Después de 72 h desde el inicio de la transfección se recolectaron los lentivirus constituidos presentes en el medio de cultivo, centrifugando previamente 5 min a 1500 rpm para eliminar las posibles células que se desprendieron.

Los virus recolectados se usaron para llevar a cabo el proceso de transducción a la línea celular hospedadora, DU145. Para ello se infectaron las células con los lentivirus dejando transcurrir 48 horas, para comenzar el proceso de selección con puromicina (2 µg/ml). Durante una semana, cada dos días, se estuvo renovando el medio de cultivo y añadiendo puromicina para seleccionar las células que han sido infectadas. Por último, se comprobó por *Western blot* los niveles de proteína específica en cada una de las líneas estables creadas por infección de lentivirus, para asegurar que el silenciamiento o sobreexpresión ha sido efectivo.

12. Experimentos de silenciamiento y sobreexpresión transitoria de proteína

Se cultivaron 2×10^5 células en placas de 6 pocillos, dejando adherirse hasta el día siguiente. Los ensayos de silenciamiento se llevaron a cabo empleando los ARN de silenciamiento (siRNA) para UCHL1 (#L-004309-00) y el control negativo (#D-001810-10) a 100 nM (GE Dharmacon, Lafayette, CO, EE.UU.). Estos siRNA, se mezclaron con 5 µl de Roti-Fect (Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) en medio de cultivo sin FBS ni antibiótico, incubándose durante 20-30 min a temperatura ambiente. Se repartió la mezcla a cada uno de los pocillos correspondientes con las células sembradas, incubándose durante 4-6 h a 37°C, permitiendo la entrada del siRNA exógeno al interior celular. Posteriormente se cambió el medio de cultivo evitando

que el agente de transfección produzca toxicidad. Se dejaron las células en el incubador durante 72 h, puesto que fue el tiempo óptimo para producir el silenciamiento de la proteína.

Para los ensayos de sobreexpresión de p53, se siguió el mismo proceso convencional de transfección descrito anteriormente para los siRNA, con la diferencia de que las células se transfectaron mezclando 1 µg del plásmido cDNA3-flag-p53 y 3 µl de Roti-Fect.

13. Ensayos de actividad transcripcional

En general y para los ensayos de actividad luciferasa se sembraron 1×10^5 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se dejaron toda la noche permitiendo su adherencia a la superficie de la placa. Los plásmidos utilizados en las transfecciones para realizar los ensayos de actividad transcripcional por luciferasa fueron: 4xM67 pTATA TK-Luc (contiene 4 copias del sitio de unión a STAT3), pNQ01-ARE-Luc y KBF-Luc (presenta 3 copias del potenciador del sitio κB del complejo mayor de histocompatibilidad fusionadas al promotor mínimo de conalbúmina).

El protocolo de la transfección transitoria se realizó siguiendo las mismas pautas descritas en el apartado anterior, con la particularidad que se llevó a cabo mezclando 0.5-1 µg del plásmido correspondiente, con 2.5 µl por pocillo de Roti-Fect o Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Una vez transcurridas las 6 h de incubación y añadido el medio de cultivo fresco, se incubaron las células toda la noche. Al día siguiente se estimularon las células con los tratamientos pertinentes y después de 6 h de incubación, se lisaron con buffer de lisis (Tris-fosfato 25 mM pH 7.8, MgCl₂ 8 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 al 1% y glicerol al 7%) durante 15 min en agitación. Se transfirieron 75 µl del lisado a tubos a los que se añadieron 50 µl de luciferina (Promega, Madison, WI, USA), midiendo inmediatamente la actividad luciferasa en unidades relativas de luz (RLU) en el luminómetro Autolumat LB9510 (Berthold Technologies GmbH, Germany). Con los 25 µl restantes del lisado se determinó la concentración de proteína mediante el método Bradford para normalizar la actividad luciferasa.

Cabe destacar que los análisis de cribado para ver la actividad STAT3, NF-κB y respuesta antioxidante de los derivados de GL, se emplearon las líneas estables HeLa-

pTATA-TK-Luc, NIH3T3-KBF-Luc y HaCaT-pNQ01-ARE-Luc, respectivamente. Por tanto, como expresan de forma constitutiva estos plásmidos, se estimularon directamente y se lisaron para medir la actividad transcripcional a través del lector de placa TriStar² Berthold/LB942 (Berthold Technologies GmbH, Alemania), siguiendo el proceso de lisis mencionado.

14. Análisis de Proteómica

Las células recolectadas se lisaron empleando la solución de lisado conteniendo NP-40 anteriormente descrito y se prepararon las muestras para el análisis por espectrometría de masas (LC-MS, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). Resumidamente, en primer lugar, se eliminaron los contaminantes de la muestra mediante precipitación de las proteínas en ácido tricloroacético al 10 % y acetona y se solubilizaron en 50 μ l de RapiGest SF al 0.2% (Waters, Milford, MA, EE.UU.) en bicarbonato amónico 50 mM. La cantidad total de proteína se cuantificó usando el kit fluorimétrico Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.), reservándose 50 μ g de proteína para la digestión con tripsina. A continuación, las proteínas se incubaron con DTT 5 mM a 60 °C durante 30 min y, posteriormente, con iodoacetamida 10 mM a temperatura ambiente y en oscuridad otros 30 min. Seguidamente, se añadió tripsina modificada de grado secuenciación (Promega, Madison, WI, EE.UU.) en un ratio tripsina/proteína de 1:40 y se incubaron las muestras a 37 °C durante 2 h y, transcurrido este tiempo, se volvió a añadir tripsina incubando durante 15 h. Para la eliminación del RapiGest, se precipitó incubando durante 1 h a 37 °C con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.5% y se separó por centrifugación. Por último, se ajustó el volumen final con agua Milli-Q y acetonitrilo (ACN) hasta una concentración de 0.5 μ g de péptido/ μ l (2.25% de ACN y 0.2% de TFA).

Para la construcción de la librería de espectros, se analizaron los péptidos mediante una aproximación basada en proteómica *shotgun* con nano LC-MS/MS. Se creó un *pool* de muestras de los que se inyectaron 2 μ l (1 μ g en columna) con un sistema de cromatografía nanoLC Ekspert nLC415 (Eksigent, Dublin, CA, EE.UU.) empleando una columna C18 Acclaim PepMap 100 (75 μ m x 25 cm, 3 μ m, 100 Å) (Thermo Fisher Scientific) con un flujo de 300 nl/min. Se empleó ácido fórmico 0.1% en agua o en ACN como solventes A y B, respectivamente, utilizando el siguiente

gradiente: de 0 a 5 min B 5%, 5 a 125 min B 5% a B 30%, a continuación 9 min B 95% y finalmente 9 min B 5% para equilibrar la columna.

Los péptidos eluidos se fueron inyectando directamente en un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo/TOF Triple TOF 5600+ (Sciex, Redwood City, CA, EE.UU.) empleando un sistema de adquisición dependiente de datos (*data dependent acquisition*, DDA) *top 65*, en modo iónico positivo. La conexión entre el sistema de cromatografía nanoLC y el espectrómetro de masas se llevó a cabo mediante la fuente de ionización NanoSpray III ESI (Sciex) aplicando un voltaje de 2600 V. La adquisición consistió en un *survey scan* de 350 a 1250 m/z , con un tiempo de adquisición de 250 ms, seguido del análisis MS/MS de los 65 iones precursores de mayor intensidad en intervalos de 60 ms, en el rango de 230 a 1500 m/z . Los precursores fragmentados se añadieron a una lista de exclusión dinámica de 15 s, excluyendo los iones de carga unitaria del análisis MS/MS. Para la identificación de péptidos y proteínas se empleó el software Protein Pilot v5.0 (Sciex) y las bases de datos SwissProt y TrEMBL, especificando el uso de iodoacetamida como agente alquilante de cisteínas. El valor máximo para la tasa de asignaciones aleatorias (FDR, *False Discovery Rate*) se estableció en 0.01 (1%), tanto para péptidos como para proteínas. Los espectros de fragmentación MS/MS de los péptidos identificados se emplearon para generar una librería de espectros para la posterior extracción de picos cromatográficos por SWATH usando la extensión MS/MS^{ALL} con adquisición SWATH MicroApp v2.0 (Sciex) de la herramienta PeakView v2.1 (Sciex).

La cuantificación relativa se llevó a cabo empleando SWATH, un método de adquisición independiente de datos (*data independent acquisition*, DIA). Cada muestra (2 μ l, 1 μ g en columna) se analizó empleando el equipo LC-MS y gradiente cromatográfico descritos para la construcción de la librería de espectros, empleando en este caso un método de adquisición basado en SWATH-MS. Este método se basó en repetir iterativamente un ciclo con una duración total de 3.5 s, consistente en un escaneo MS de 400 a 1250 m/z , con un tiempo de adquisición de 50 ms, seguido de 34 escaneos MS/MS en modo alta sensibilidad en ventanas de 25 m/z de amplitud con solapamiento de 1 m/z , con un tiempo de adquisición de 100 ms la adquisición.

La extracción dirigida de los datos de las carreras SWATH se realizó mediante PeakView v2.1, empleando la extensión MS/MS^{ALL} con adquisición SWATH

MicroApp v2.0 y la librería de espectros generada a partir de los datos de proteómica *shotgun*. Se seleccionaron hasta 10 péptidos por proteína y 7 fragmentos por péptido en base a la intensidad de la señal, excluyendo de la extracción todos los péptidos compartidos y modificados. Los tiempos de retención de los péptidos seleccionados para cada proteína se realinearon en cada carrera en relación a los péptidos iRT (Biognosys AG, Schlieren/Zürich, Suiza) que se incorporaron a cada muestra y que eluyen a lo largo de todo el cromatograma. Para cada fragmento iónico, se extrajo su cromatograma (*Extracted Ion Chromatogram*, XIC) y las áreas de los picos de los péptidos se calcularon sumando las áreas de los picos de los fragmentos iónicos correspondientes. Por otra parte, la cuantificación de proteínas se llevó a cabo sumando las áreas de los picos de los péptidos correspondientes. El software PeakView asignó una puntuación y un FDR a cada péptido utilizando los componentes espectrales y cromatográficos, excluyendo de la cuantificación de proteínas los péptidos con un FDR superior al 5%.

Para el cálculo de las veces de inducción y el análisis estadístico se aplicó el *t-test* y la corrección de Bonferroni, utilizando la versión 3.2.1 del software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Se seleccionaron las proteínas con un p-valor ≤ 0.05 y con veces de inducción ≥ 1.5 para su análisis con el software Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com), obteniéndose las funciones biológicas y un análisis enriquecido con las rutas de señalización canónicas más significativas a través del test exacto de Fisher, cuyo p-valor, determina la probabilidad de que la asociación entre las proteínas obtenidas en el análisis proteómico y cada función biológica o ruta de señalización asignada sea debido al azar.

15. Análisis de metabolitos en plasma de ratones xenoinjertados

Las muestras de sangre de los ratones xenoinjertados se obtuvieron mediante punción cardíaca y para evitar la coagulación, se añadió a cada una de ellas EDTA en PBS, quedando a una concentración final de 4.5 mM. A continuación, se mezclaron y centrifugaron a 1000 x g durante 15 min, recogiendo la fracción correspondiente al plasma.

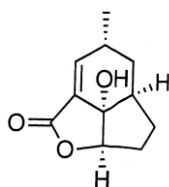
Para el análisis del perfil metabolómico del plasma se necesitaron 200 μ l, siendo realizado por Metabolon (Morrisville, NC, EE.UU.) como se ha descrito previamente (Reitman, Jin y cols., 2011). De forma resumida, se recuperó la máxima cantidad de

metabolitos y se eliminaron las proteínas mediante una extracción con metanol acuoso, dividiéndose el extracto obtenido en 3 fracciones: la primera para el análisis por cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC/MS/MS, *Ultra performance liquid chromatography/Mass Spectroscopy*) en modo positivo, la segunda para el análisis por UPLC/MS/MS en modo negativo y la tercera para el análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS). Para llevar a cabo los análisis, se eliminó el solvente orgánico en un dispositivo TurboVaP (Zymark) y, posteriormente, el solvente acuoso por liofilización.

Los datos fueron extraídos y los picos identificados usando un software de Metabolon, por comparación con una librería propia de metabolitos cuyo tiempo de retención, relación m/z y datos cromatográficos son conocidos. El análisis estadístico para la búsqueda de diferencias significativas entre los grupos experimentales se llevó a cabo a través de la prueba t de Welch's mediante el software R versión 3.2.1. (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

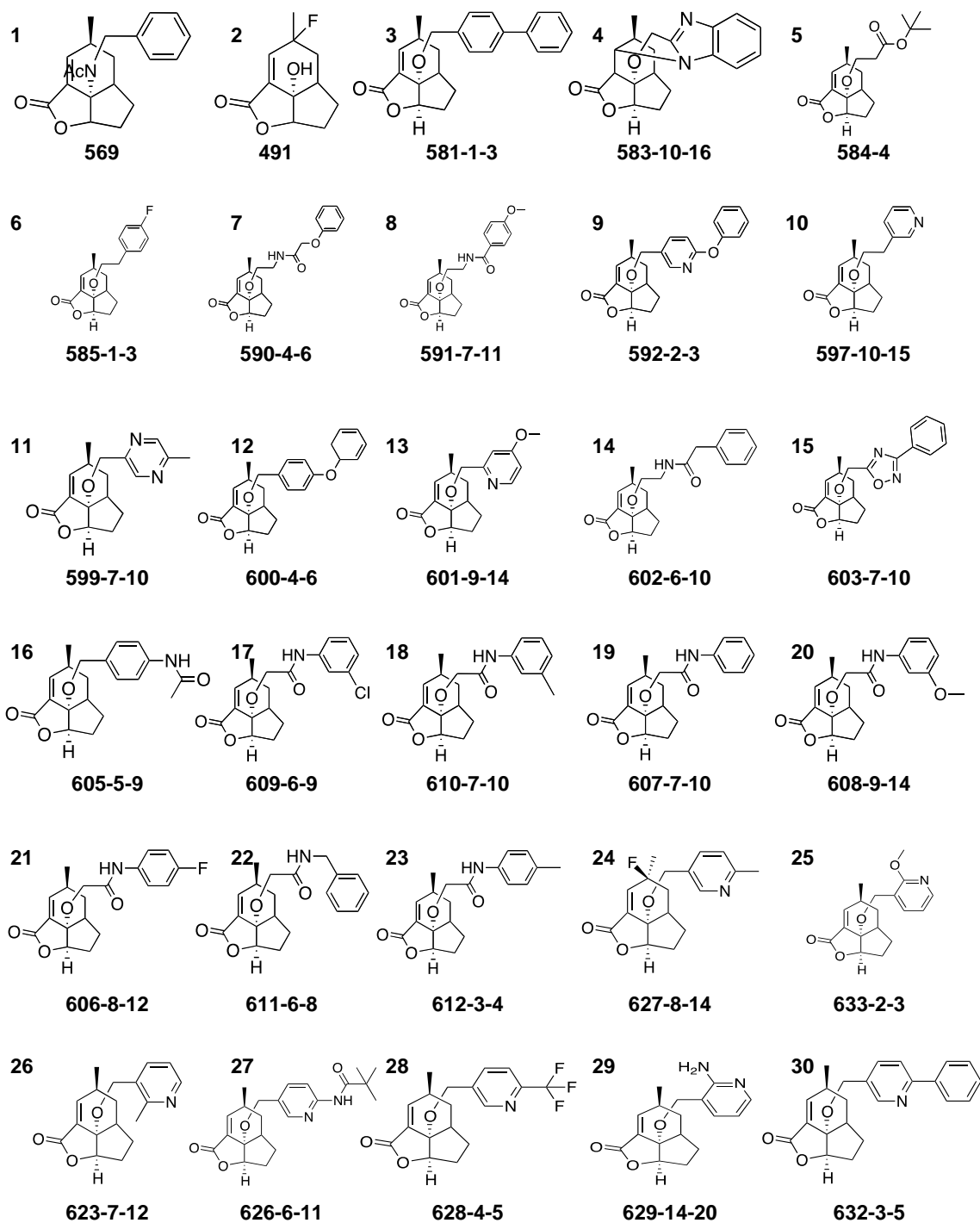
16. Librería de análogos de GL

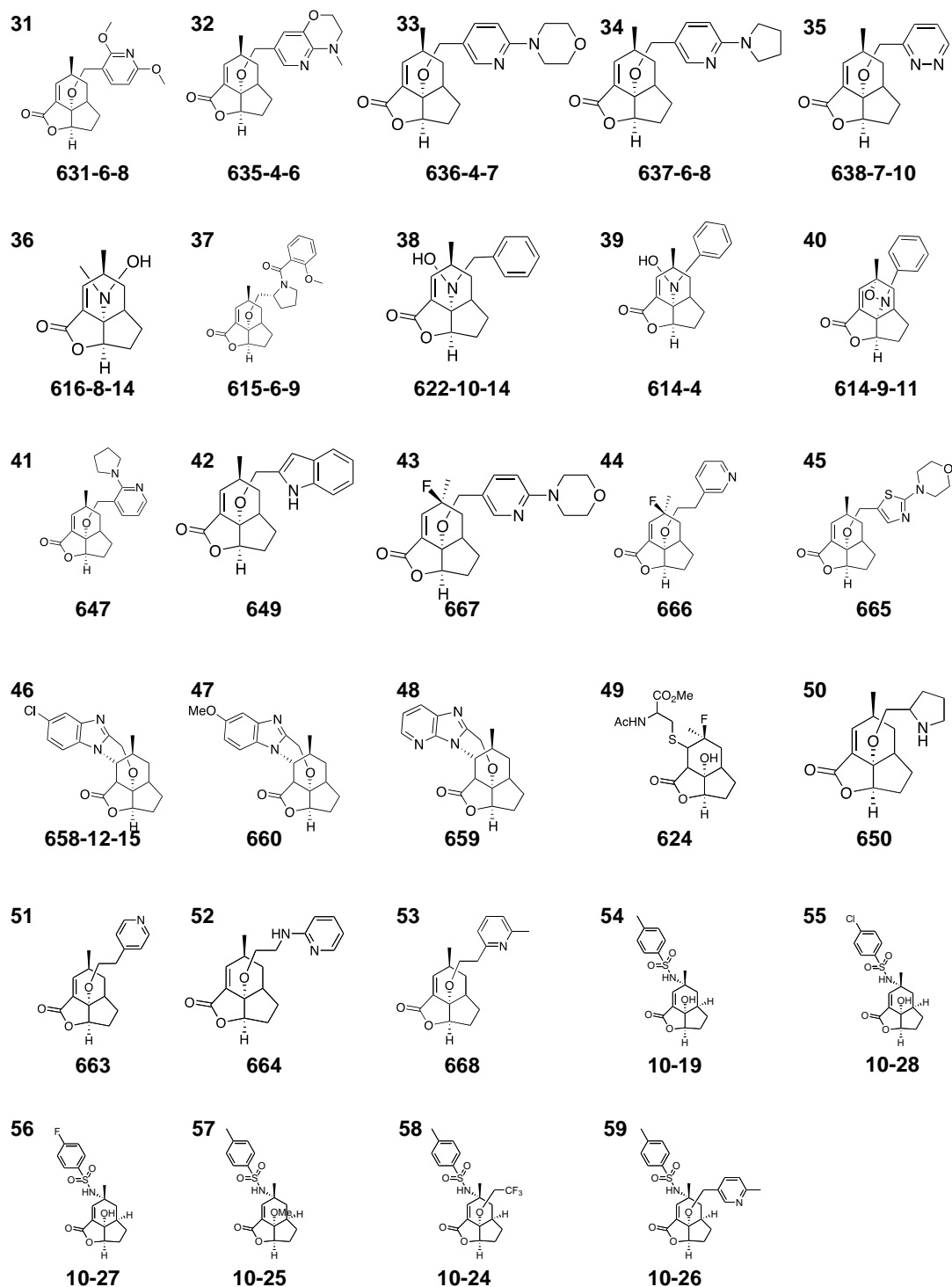
La GL y las moléculas análogas de ésta fueron sintetizadas y proporcionadas por el grupo del Dr. Olov Sterner del Centro de Análisis y Síntesis de la Universidad de Lund (Suecia). La estructura química y los nombres de identificación de la GL y de los 59 componentes que forman parte de la librería de análogos del metabolito fúngico se detallan a continuación.



Galiellalactona (GL)

Materiales y métodos experimentales





17. Análisis estadístico

Excluyendo los ensayos proteómico y metabolómico cuyo análisis estadístico se mencionan en sus respectivos apartados, para el resto de los datos el análisis estadístico se llevó a cabo empleando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EE.UU.). Los datos de los experimentos *in vitro* fueron expresados como la

Materiales y métodos experimentales

media aritmética \pm desviación estándar (DE), excepto para los ensayos de cicatrización de la herida cuyos datos se representaron como la media aritmética \pm error estándar (SE, del inglés, *standard error*). Mientras que en los experimentos llevados a cabo in vivo son expresados como la media aritmética \pm error estándar de la media (SEM, del inglés, *standard error of the mean*). Para la comparación entre dos grupos se realizó la prueba t de *Student* (t-test) y si se trataban de más grupos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida del test Newman-Keuls. Los valores con un $p < 0.05$ (*) se consideraron como significativos, los muy significativos tenían un $p < 0.01$ (**) y los altamente significativos un $p < 0.001$ (***)

IV. Resultados

Resultados

1. Efectos antitumorales del metabolito fúngico GL en cáncer
de próstata

Resultados

1.1 GL inhibe la actividad de NF- κ B y STAT3 a nivel transcripcional

Estudios previos han demostrado que la GL inhibe la actividad transcripcional de los factores NF- κ B y STAT3. En el primer caso, esta molécula es capaz de bloquear la unión de p65 con la importina α 3 impidiendo su translocación nuclear en diferentes líneas celulares tumorales (Perez y cols., 2014). En el segundo caso, la GL se une covalentemente a STAT3 impidiendo su unión con el ADN en células de cáncer de próstata (Don-Doncow y cols., 2014). Partiendo de esta base, se comprobó si el efecto inhibitorio dual que ejerce la GL sobre ambos factores de transcripción tiene lugar en la línea tumoral de cáncer de próstata DU145. Como se observa en la Figura 8 (A y B), a las 6 horas de tratamiento, la GL inhibe la actividad transcripcional llevada a cabo por ambos factores de transcripción de forma dosis dependiente, siendo significativa a partir de la concentración 10 μ M.

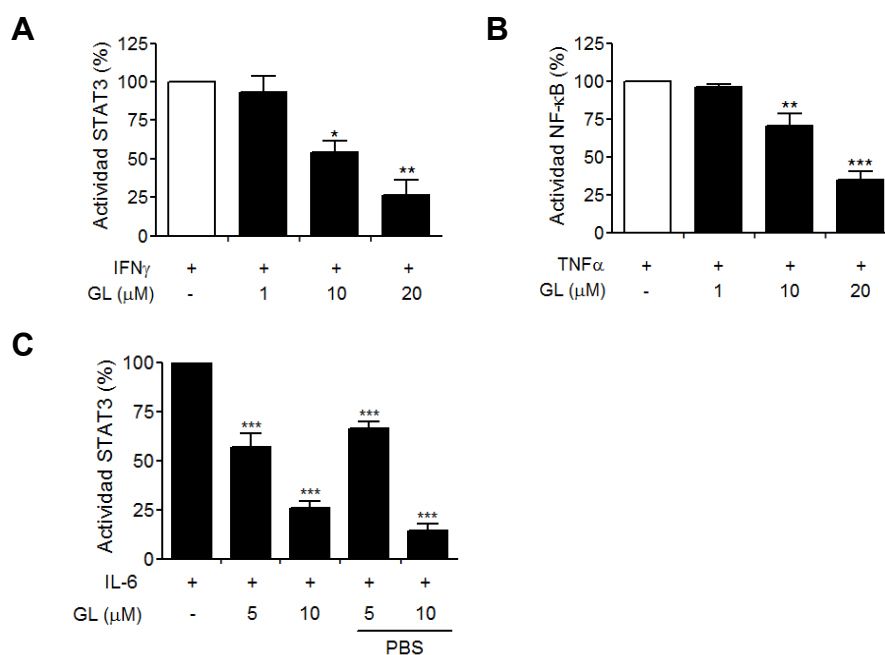


Figura 8. GL actúa como un inhibidor dual de STAT3 y NF- κ B. A y B. Las células DU145 se transfectaron con plásmidos 4xM67 pTATA-TK-Luc (STAT3) y KBF-luc (NF- κ B) que contienen sitios de unión para los factores de transcripción seguido del gen reportero luciferasa. Después de 24 h, se realizó el tratamiento con concentraciones crecientes de GL y se estimuló con IFN γ (50 U/ml) o TNF α (30 ng/ml), respectivamente. Después de 6 h de incubación, se midió la actividad luciferasa (RLU) de cada uno de los lisados celulares. C. Las células LNCaP fueron transfectadas con el plásmido 4xM67 pTATA-TK-Luc y estimuladas con GL durante 1 h a las dosis indicadas. Acto seguido, se incubaron con IL-6 (50 ng/ml) durante 6 h para inducir la activación de STAT3. Mientras que, en los experimentos de lavado tras el tratamiento indicado con GL, se realizaron 2 lavados en PBS antes de la estimulación con IL-6. Los datos muestran la media \pm DE de 3 experimentos independientes y son expresados como porcentaje de actividad para cada factor de transcripción, considerando la estimulación de TNF α o IFN γ /IL-6 como el 100% de actividad. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 indica las diferencias significativas entre el TNF α o IFN γ /IL-6 y el tratamiento con GL.

También se evaluó la actividad transcripcional para STAT3 en la línea de cáncer de próstata LNCaP, mostrando una mayor inhibición de dicha actividad a unas dosis más bajas en comparación con las células DU145. Por este motivo, se eligió la línea celular LNCaP para determinar si la unión de GL al factor de transcripción STAT3 era irreversible o no. Para ello, las células se trataron con GL seguido del estímulo de activación de la señalización de STAT3, que en el caso de esta línea tumoral fué con IL-6 ya que responden mejor a éste estímulo que al interferón *gamma* (IFN γ). A continuación, se analizó la actividad transcripcional a las 6 horas de incubación con dichos tratamientos observándose que el efecto de inhibición sobre STAT3 se mantuvo a pesar de retirar la GL del medio mediante repetidos lavados con PBS, demostrando que la unión GL-STAT3 es irreversible (Figura 8C).

1.2. GL detiene la progresión del ciclo celular en la fase G₂/M en las células DU145 de cáncer de próstata

Está ampliamente descrito en la bibliografía que los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B intervienen en funciones de regulación del ciclo celular, y como se ha explicado anteriormente, su desregulación está muy asociada con el desarrollo y progresión del cáncer. Dado que se confirmó que la GL inhibe de forma dual la actividad transcripcional de ambos factores de transcripción, el siguiente paso fue estudiar si la GL afecta de alguna manera al ciclo celular en las líneas celulares de cáncer de próstata. En consecuencia, se trataron las células DU145 con diferentes concentraciones de GL y se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular a las 6, 12 y 24 horas. No se encontró ninguna alteración significativa de la distribución celular a las 6 horas de incubación con ninguna de las dosis de GL. Sin embargo, después del tratamiento con este metabolito fúngico a las concentraciones de 10 y 20 μ M durante 12 y 24 horas, se observó un aumento muy notable del número de células que se encuentran en la fase G₂/M en detrimento de las células que están en la fase G₀/G₁. Exactamente, el incremento observado fue más significativo a las 24 horas puesto que pasó de un porcentaje del 25.5% de las células en fase G₂/M sin el tratamiento hasta elevarse al 53.9% y al 71.5% con las dosis 10 y 20 μ M, respectivamente. Por lo tanto, la GL detiene la progresión del ciclo celular en las células DU145 al producir una parada de ciclo en fase G₂/M (Figura 9A y B).

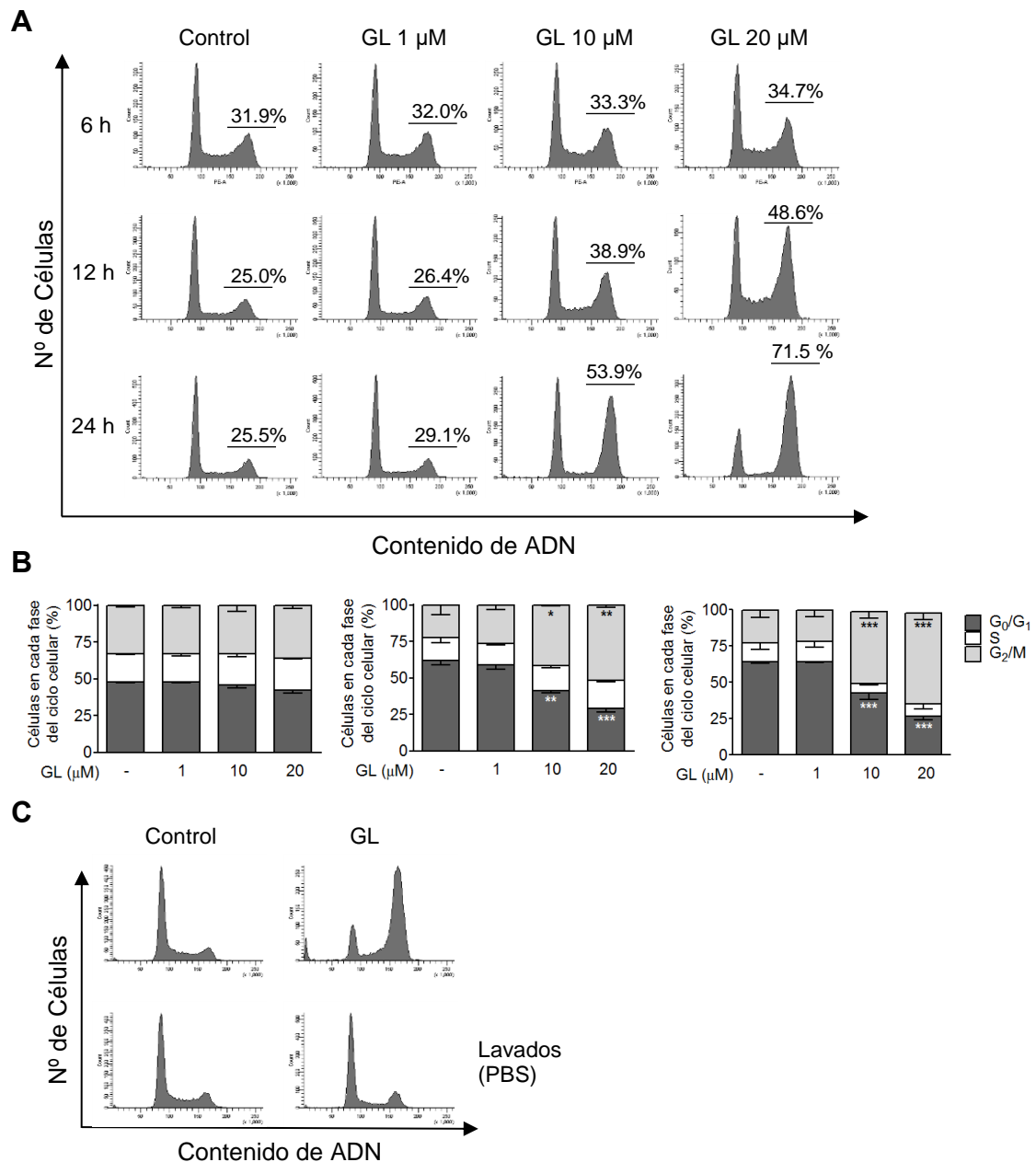


Figura 9. GL induce una parada de ciclo celular en la fase G₂/M en células DU145. La distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular se llevó a cabo mediante la tinción con PI y su posterior medición al citómetro de flujo, mostrándose los histogramas representativos. **A.** Se trataron las células DU145 con varias concentraciones de GL (1, 10 y 20 μ M) durante 6, 12 y 24 h. **B.** Cuantificación de los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo celular del experimento anterior. Los datos muestran la media \pm DE de 3 experimentos independientes. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 comparado con el grupo control. **C.** En los experimentos de lavado, después de 3 h de tratamiento con GL 20 μ M, las células se lavaron con PBS y permanecieron 24 h hasta su fijación.

Curiosamente, a diferencia de lo que ocurría con la actividad transcripcional de STAT3, la parada de ciclo celular en fase G₂/M resultante del tratamiento con GL 20 μ M (24 horas) se pierde tras los lavados con PBS a las 3 horas de tratamiento. Esto pone de manifiesto que la alteración que produce la GL a nivel del ciclo celular es reversible,

Resultados

o al menos, requiere un mayor periodo de incubación para poner en marcha este mecanismo (Figura 9C).

1.3 La parada de ciclo celular en G₂/M inducida por GL afecta principalmente a las líneas celulares andrógeno-independientes de cáncer de próstata

Posteriormente, se analizó si la interrupción de la progresión del ciclo celular en la fase G₂/M sucedía también en otras líneas tumorales de cáncer de próstata. Se seleccionaron las líneas celulares andrógeno-dependientes LNCaP, VCaP y 22Rv1 así como las células andrógeno-independientes DU145 y PC-3, y se trataron con GL a 10 μ M, la cual es la concentración mínima para observar una potente parada del ciclo celular.

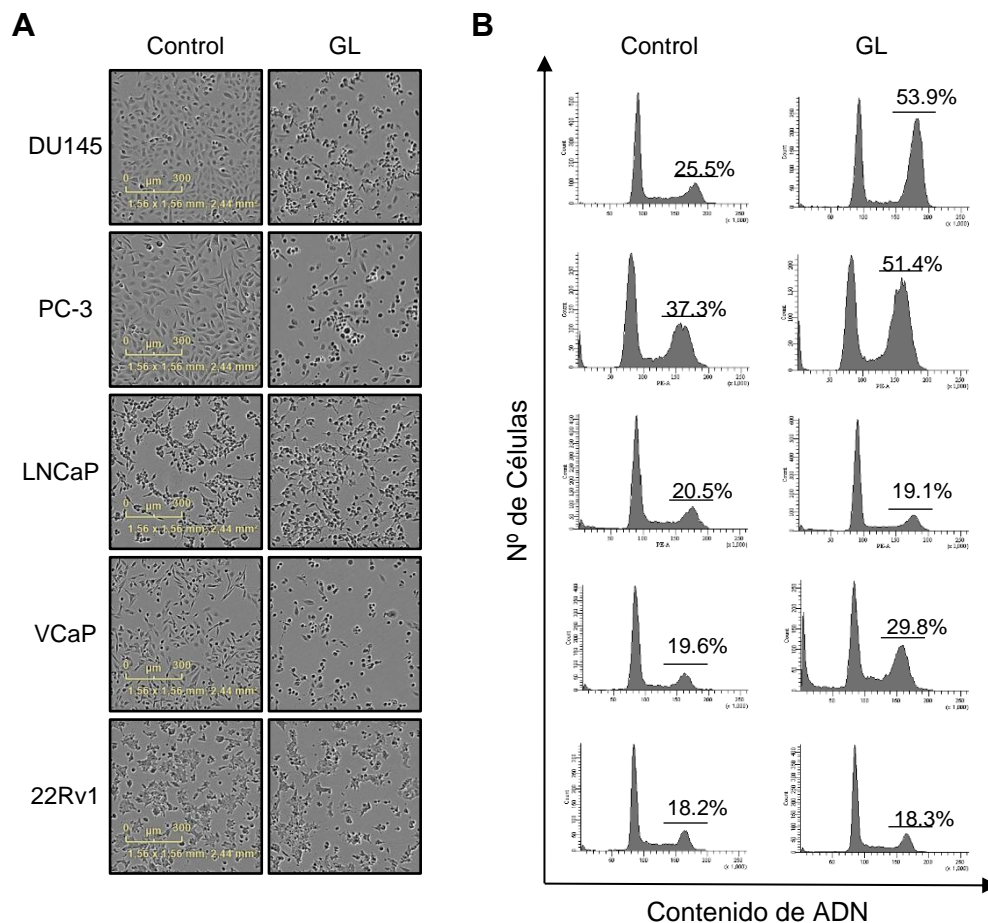


Figura 10. Efecto de la GL en el ciclo celular en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata. Las células se trataron con GL 10 μ M durante 24 h. **A.** Imágenes tomadas con el dispositivo IncuCyte ZOOM. **B.** Histogramas representativos del ciclo celular obtenidos mediante citometría.

A las 24 horas, las imágenes analizadas mostraron una clara reducción de la densidad celular en las líneas andrógeno-independientes (DU145 y PC-3) tratadas con el metabolito fúngico GL, siendo menos acusada en la línea celular VCaP. Por el contrario, no se observaron diferencias visuales en las células andrógeno-dependientes LNCaP y 22Rv1 en presencia o ausencia de GL (Figura 10A).

En concordancia con lo expuesto anteriormente, tanto las células DU145 como las células PC-3 presentan una parada de ciclo celular en fase G₂/M como consecuencia del tratamiento con GL, siendo del 53.9 y 51.4% respectivamente. Las células VCaP se encuentran en un punto intermedio ya que, aunque incrementan el porcentaje de células retenidas en dicha fase (29.8%), lo hacen de una forma menos intensa que en los casos anteriores. Por el contrario, las líneas tumorales LNCaP y 22Rv1 no sufren ninguna alteración en su perfil del ciclo celular en presencia de GL (Figura 10B).

1.4 GL también induce la parada de ciclo celular en líneas celulares tumorales derivadas de otros tipos de cáncer.

Aunque el foco de interés de esta tesis está centrado en estudiar los efectos de la GL en relación con el cáncer de próstata, se examinó si la GL actúa de forma similar en otros tipos de cánceres. De esta forma, se llevaron a cabo las mismas condiciones experimentales anteriores en las siguientes líneas celulares tumorales: H1299 (cáncer de pulmón), Jurkat (leucemia), MDA-MB-231 (cáncer de mama) y SW480 (cáncer de colón).

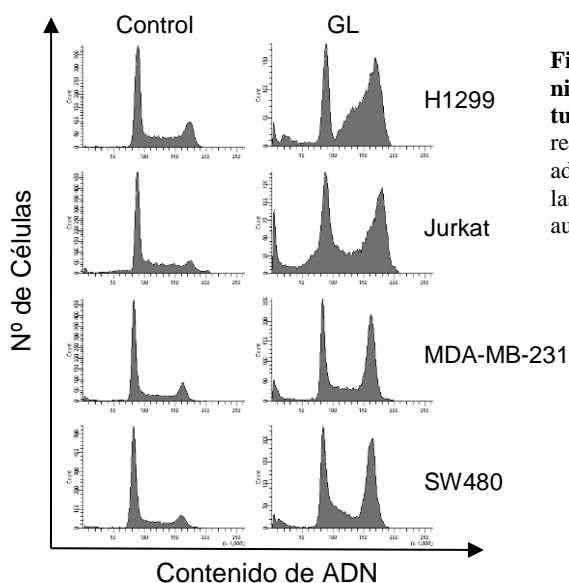


Figura 11. Actividad de la GL a nivel del ciclo celular en líneas tumorales no prostáticas. Perfiles representativos del ciclo celular adquiridos por citometría de flujo de las líneas celulares en presencia o ausencia de GL 10 μ M durante 24 h.

Resultados

En todas las líneas celulares mencionadas, la GL fue capaz de detener el ciclo en fase G_2/M , e incluso en algunas de ellas el porcentaje de células subdiploides también incrementó de forma considerable (Figura 11).

Esto evidencia que aunque en cáncer de próstata la GL muestra una especificidad mayor por las líneas celulares independientes a andrógenos, sus efectos también son extrapolables a otros tipos de cáncer.

1.5 El tratamiento con GL no causa mielodepresión ni altera el ciclo celular en células no tumorales.

La baja especificidad de la GL por un determinado tipo celular concreto de cáncer condujo al estudio en cultivo primario de fibroblastos dérmicos (HDNFs) y en la línea celular de epitelio de próstata (RWPE-1) para comprobar que sus efectos no fueran extensibles a líneas no tumorales. Como se muestra en la Figura 12, el tratamiento con GL 10 μM durante 24 horas no induce ningún efecto sobre el ciclo celular ni en la línea celular RWPE-1 ni en los HDNFs.

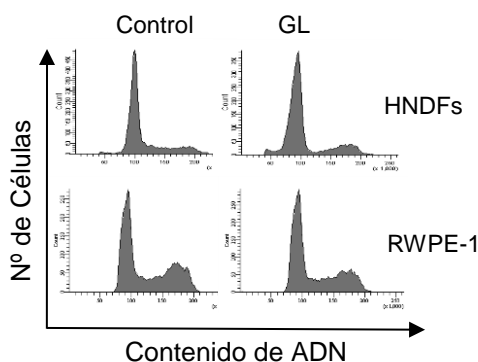


Figura 12. GL no altera el ciclo celular en líneas celulares no tumorales. Histogramas representativos del ciclo celular de HNDFs y RWPE-1 en ausencia o presencia de GL 10 μM durante 24 h.

El mayor inconveniente del uso de los quimioterápicos frente al cáncer es que no discriminan las células cancerosas de las células pluripotenciales sanas, siendo la mielodepresión uno de los efectos adversos más frecuentes. En relación con esto, se cultivaron células madre mesenquimales (hMSC) y se trataron con dosis crecientes de GL y otros agentes anti-neoplásicos (nocodazole y docetaxel), como aproximación empírica para valorar un potencial efecto mielodepresor. A tenor de los resultados, la GL no induce muerte celular en estas células aunque si modifica ligeramente el número de células en fase G_2/M del ciclo celular, pasando del 6.68% de las células no tratadas hasta el 15.16% con la dosis más elevada de GL (20 μM). Sin embargo, el efecto sobre el ciclo causado por los otros agentes anti-neoplásicos es mucho mayor que con la

concentración más alta de GL. Así, el porcentaje de células en fase G₂/M aumenta con el tratamiento con nocodazole hasta un 26.18%, mientras que, con el docetaxel lo hace a niveles similares que la GL (12.99%) pero con la diferencia de que incrementa en un 9.79% el porcentaje de células subdiploides (muerte celular) de las hMSC (Figura 13A y B).

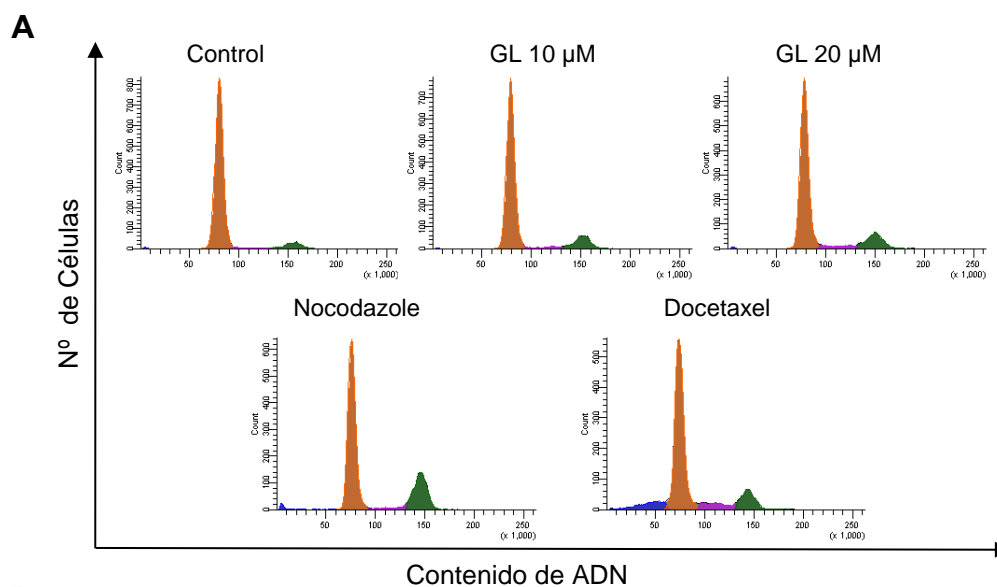


Figura 13. El tratamiento con GL es el que menos mielodepresión produce en las células hMSC. **A.** Perfil del ciclo celular de las células hMSC incubadas con GL (10 y 20 μ M), nocodazole (100 ng/ml) y docetaxel (10 nM) durante 24 horas. **B.** Porcentajes del número de células en cada fase del ciclo celular con los distintos tratamientos mencionados anteriormente.

1.6 Reducción de la viabilidad celular e inducción de la apoptosis dependiente de caspasas tras el tratamiento con GL en células de cáncer de próstata andrógeno-independientes

Recientemente, se ha demostrado que la GL causa apoptosis dependiente de caspasa 3 en células DU145 (Hellsten y cols., 2008). En este contexto, se investigó si la capacidad que tiene la GL de detener el ciclo celular en determinadas líneas celulares de cáncer de próstata se asocia a una reducción de la proliferación y/o a apoptosis.

Resultados

En primer lugar, se determinó la viabilidad celular a las 24 horas de tratamiento con GL mediante un ensayo MTT. Para ello, se seleccionaron 3 líneas celulares de cáncer de próstata: dos líneas celulares sensibles a la GL (DU145 y PC-3) puesto que ésta detiene la progresión del ciclo celular en fase G₂/M en ambos casos y las células LNCaP cuyo ciclo celular no se ve afectado tras la aplicación de GL. En relación con lo que sucede en el ciclo celular, los resultados muestran que las células LNCaP tampoco ven alterada su proliferación con GL, ni siquiera con las dosis más elevadas. Contrariamente, las células DU145 y PC-3 sí presentan una reducción de la viabilidad celular por debajo del 50% con GL 20 µM. Si bien es cierto, las células DU145 se muestran más susceptibles al tratamiento ya que la reducción de las células viables también ocurre con concentraciones más bajas de GL en comparación con las células PC-3 (Figura 14A).

En segundo lugar, se examinó el efecto de la GL sobre la apoptosis tras 48 horas de tratamiento en las mismas líneas celulares mencionadas anteriormente. Se procedió al análisis de la expresión de la proteína Poli ADP-ribosa polimerasa (PARP), la cual responde frente al estrés celular y su escisión es un marcador de apoptosis. Paralelamente a lo que se ha observado en la viabilidad celular, en el *Western blot* se aprecia claramente que el tratamiento con GL provoca el corte de dicha proteína en las células DU145 y PC-3. Mientras que en LNCaP no se observa esta escisión y se mantiene un patrón de expresión de PARP similar al control. Además, al igual que sucedía con la viabilidad celular, parece que las células DU145 responden más eficazmente a la GL debido a que la inducción de apoptosis (proteólisis de PARP) es mayor que en las células PC-3 (Figura 14B).

Uno de los eventos que ocurre en los estadios tempranos de la apoptosis es la translocación del fosfolípido fosfatidilserina de la cara interna de la membrana a su parte externa, utilizándose como marcador de este proceso. En relación con esto, se llevó a cabo un experimento adicional en el que se midió las células positivas para Anexina V, que es una proteína que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, para confirmar que la GL produce muerte celular por apoptosis. Los resultados muestran un incremento en torno al 20% de células DU145 positivas para Anexina V a consecuencia del estímulo con GL, indicando una clara inducción de la apoptosis. Por el contrario, no se detectaron cambios significativos en las células LNCaP tratadas con el metabolito fúngico con respecto a las no tratadas (Figura 14C).

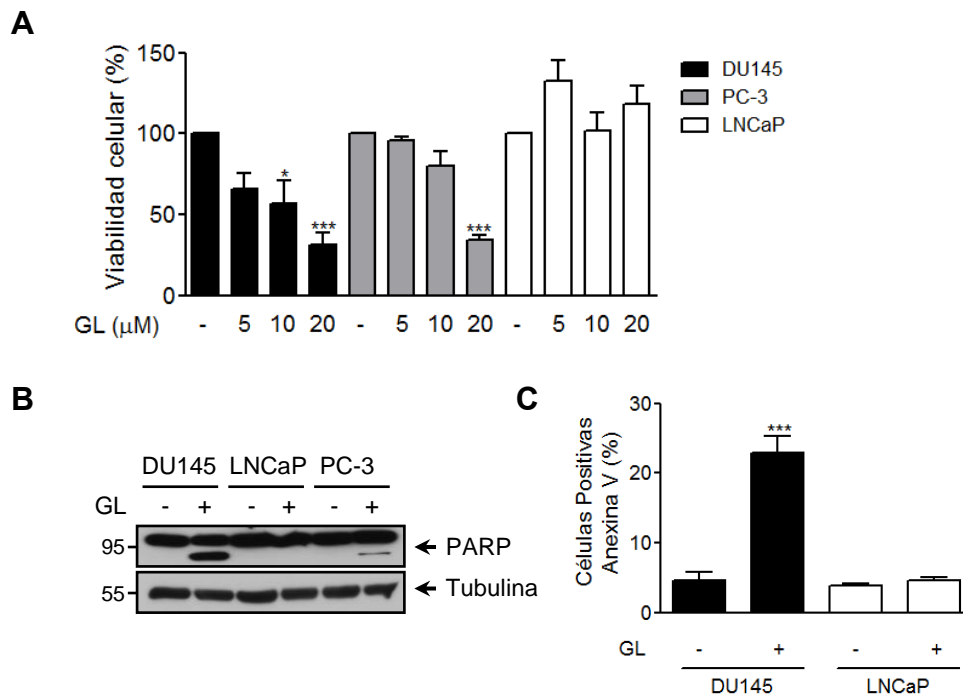


Figura 14. El tratamiento con GL reduce la viabilidad e incrementa la apoptosis en células andrógeno independientes (DU145 y PC-3) pero no en las células andrógeno dependientes LNCaP. **A.** Se trataron las células DU145, PC-3 y LNCaP con GL a las dosis indicadas y se evaluó la viabilidad celular a las 24 h mediante MTT, asignando el 100% de viabilidad al valor obtenido en las células no tratadas. **B.** Niveles de expresión de la proteína PARP en las 3 líneas celulares incubadas con GL 10 μ M durante 48 h. **C.** Análisis por citometría de flujo de las células apoptóticas teñidas con anexina V y PI en las células DU145 y LNCaP, tratadas 48 h con GL 10 μ M. Los datos proceden de la media \pm DE de 3 experimentos. * p <0.05; *** p <0.001 comparado con el grupo control.

Para confirmar que la apoptosis que acontece en las células de cáncer de próstata independientes de andrógenos tratadas con GL está mediada por la caspasa 3, se estimularon las células DU145 con GL y el inhibidor de caspasas ZVF durante 48 horas (periodo en el que ocurre el proceso apoptótico en respuesta a GL). Los resultados muestran un claro procesamiento de la caspasa 3 y de PARP. Asimismo, en la presencia de ZVF en el ensayo claramente abolió el procesamiento de ambas proteínas inducido por la GL así como una drástica reducción de las células positivas para Anexina V. Todos los datos en su conjunto ratifican que, efectivamente, la apoptosis causada por la GL en células DU145 es dependiente de caspasas. (Figura 15A y B).

Resultados

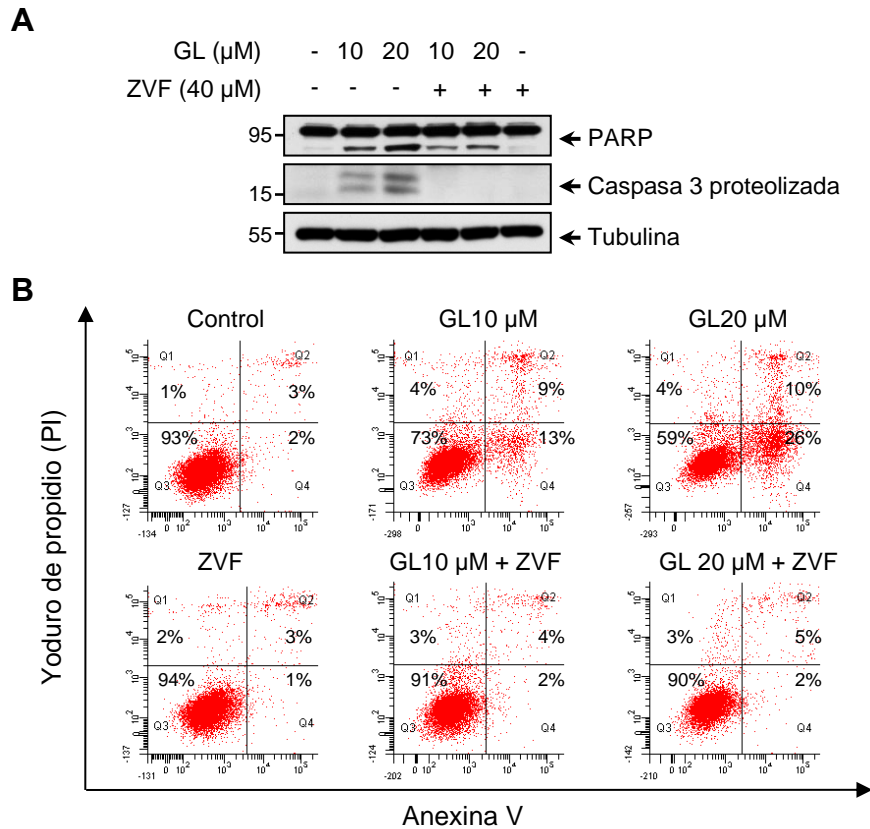


Figura 15. GL promueve la apoptosis dependiente de caspasas en las células DU145 de cáncer de próstata. Las células fueron tratadas con GL (10 y 20 μM) en presencia o ausencia del inhibidor de caspasas ZVF (40 μM) durante 48 h. **A.** Los niveles de expresión de la proteína PARP y la caspasa-3 proteolizada se evaluaron a través de *Western blot*. **B.** Gráficos de puntos (*dot-plot*) representativos del análisis de células apoptóticas efectuado mediante tinción con anexina V y PI medido en el citómetro de flujo en el que se refleja el porcentaje en cada uno de los cuadrantes.

A continuación, se llevó a cabo el estudio del ciclo celular con el tratamiento combinado de GL y ZFV en las células DU145, para chequear si el bloqueo de la apoptosis también repercute en la parada de ciclo en G_2/M . Como se muestra en la Figura 16 (A y B), a pesar de utilizar el inhibidor de caspasas ZVF la GL prosiguió alterando la progresión del ciclo celular con la acumulación de células en G_2/M . En definitiva, estos resultados ponen de manifiesto que la parada de ciclo celular y la apoptosis son activados por el mismo mecanismo de señalización celular y que al ser un evento más temprano la detención del ciclo celular no es bloqueada con el inhibidor ZVF, o bien, que son dos efectos de la GL que siguen vías de señalización completamente independientes.

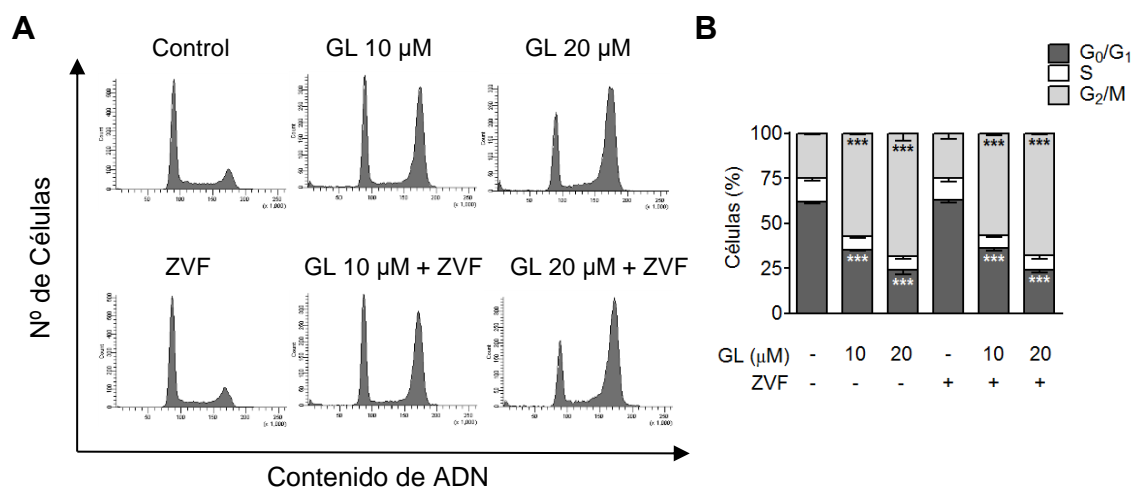


Figura 16. La parada de ciclo celular en G₂/M provocada por GL es mediada a través de una ruta de señalización independiente de caspasas. **A.** Las células DU145 fueron tratadas con GL en presencia o ausencia del inhibidor de caspasas ZVF (40 μM), adquiriéndose la distribución de las células en cada fase del ciclo por citometría de flujo. **B.** Cuantificación de los porcentajes de células en cada una de las fases del ciclo celular del experimento anterior. Los datos extraídos corresponden con la media ± DE, n=3 experimentos independientes. ***p<0.001 comparando con el grupo control.

1.7 GL desestabiliza los microtúbulos del citoesqueleto e inhibe la migración en las células DU145

La actina y tubulina son proteínas que forman parte del citoesqueleto y participan en diversos procesos celulares, entre los que se incluyen la progresión del ciclo celular. Con el fin de investigar si la GL altera alguno de los principales constituyentes del citoesqueleto implicados en la morfología celular, se evaluó mediante microscopía confocal los efectos causados por la molécula de interés con respecto a otros agentes inhibidores de la división celular que causan alteraciones en el citoesqueleto. Estos agentes inhibidores son la citocalasina D, un metabolito fúngico capaz de unirse a los filamentos de actina impidiendo su polimerización y elongación, y los agentes anti-neoplásicos nocodazole y docetaxel que se unen a las tubulinas de los microtúbulos impidiendo su polimerización y despolimerización, respectivamente.

El tratamiento durante 24 horas con estas moléculas, tal y como se esperaba, causan una parada de ciclo celular en fase G₂/M en células DU145. En el caso concreto de la GL se produce un cambio en la morfología celular debido a que se reduce de forma considerable el tamaño celular otorgando a las células un aspecto similar a aquellas que se encuentran en mitosis. En cuanto al efecto que causa sobre los componentes del citoesqueleto se observa, por un lado, que con el tratamiento con GL

Resultados

no se percibe la formación de agregados en los filamentos de actina que sí se producen con el tratamiento con citocalasina D. Por otro lado, la GL es capaz de producir una desestabilización de los microtúbulos morfológicamente parecida a la que aparece tras el estímulo con docetaxel o con nocodazole (Figura 17A). Además, éstos inducen la apoptosis celular a las 48 horas como se aprecia en el inmunoblot con la activación y proteólisis de PARP y caspasa 3 (Figura 17B). No obstante, a diferencia de la GL, el tratamiento a las 24 horas con estos agentes que alteran la dinámica microtubular incrementa el porcentaje de células subdiploides (sub G_0/G_1) correspondientes a las células apoptóticas, indicando que el mecanismo de acción entre estos fármacos y la GL podría ser diferente (Figura 17C). De acuerdo con esto, las células subdiploides (apoptosis) en las células tratadas con GL no aparecen hasta 48 horas después del tratamiento.

Para evaluar si la parada de ciclo celular en fase G_2/M inducida por la GL requiere la biosíntesis de nuevas proteínas y ARN, se empleó la mitomicina C como inhibidor de la transcripción. En células DU145 con el tratamiento combinado, GL y mitomicina C, se observó que la detención de la progresión del ciclo celular generada por la GL durante 24 horas fue revertida con la mitomicina C. Por lo que, indica que la parada del ciclo celular en la fase G_2/M como resultado del estímulo con la GL requiere la transcripción *de novo* de genes involucrados en la regulación de los *checkpoints* del ciclo celular (Figura 18A).

Recientemente, se ha descrito que la GL inhibe la capacidad de invasión de las células DU145 (Canesin y cols., 2016). Este hallazgo junto con el efecto en la desestabilización de los microtúbulos mostrado anteriormente, nos llevó a investigar el efecto de la GL en la migración mediante un ensayo de cicatrización de heridas. Según se puede observar en las Figura 18 (B y C), a partir de las 12 horas de tratamiento la GL comienza a impedir el cierre de la herida en las células DU145 de forma significativa con respecto a las células sin tratar.

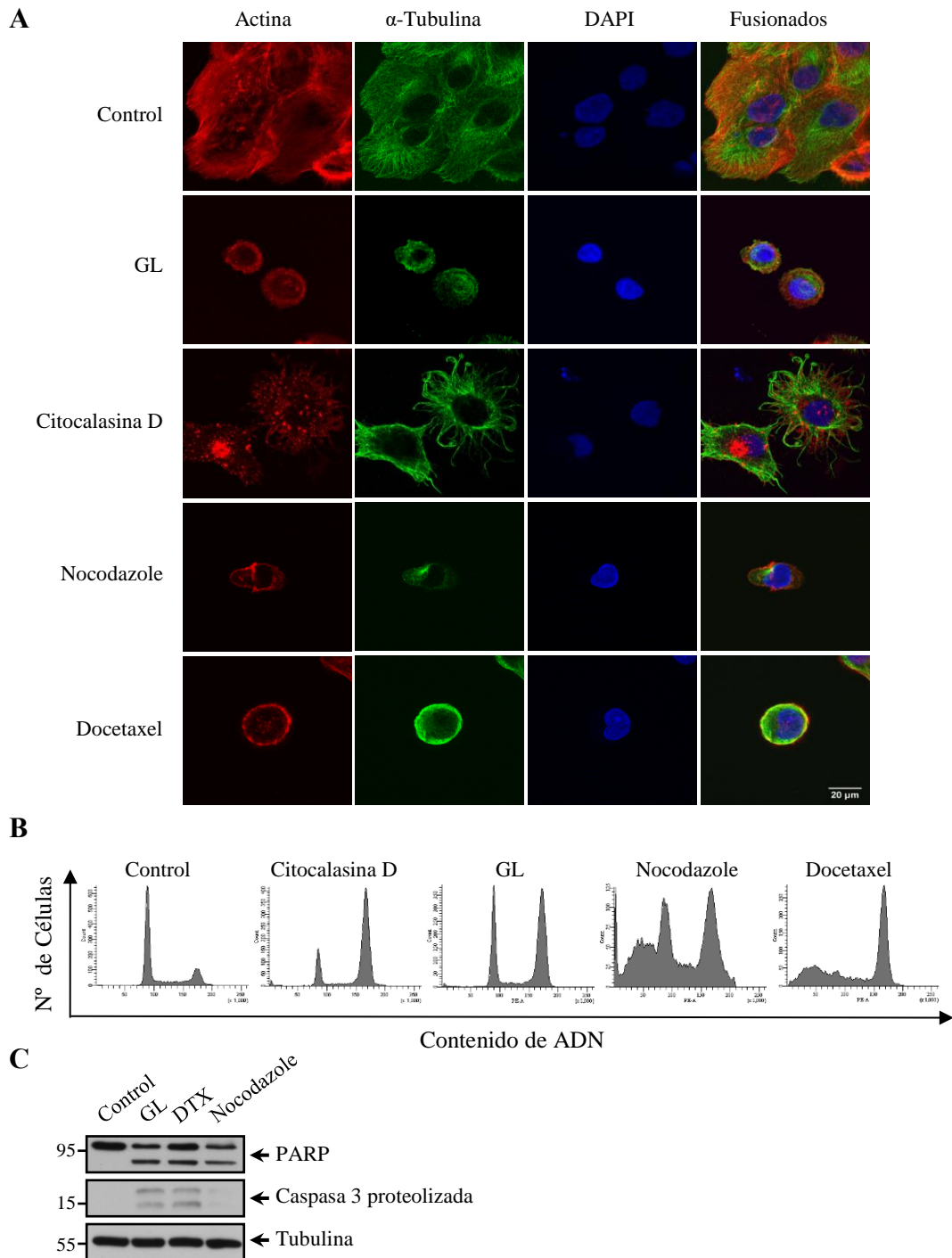


Figura 17. Efecto de la GL sobre la morfología celular y el citoesqueleto. **A.** Inmunofluorescencia con marcaje doble de actina (rojo), α -tubulina (verde) en las células DU145 tratadas con citocalasina D (10 μ M), GL (10 μ M), nocodazole (100 ng/ml) y docetaxel (10 nM) durante 6 h. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Imágenes adquiridas con el microscopio confocal (x63). **B.** Perfiles representativos del ciclo celular obtenidos mediante el análisis con el citómetro de flujo a las 24 h después del tratamiento con los compuestos indicados. **C.** Estudio de la apoptosis con los compuestos incubados durante 48 h, analizando las proteínas PARP y caspasa-3 proteolizada mediante *Western blot*.

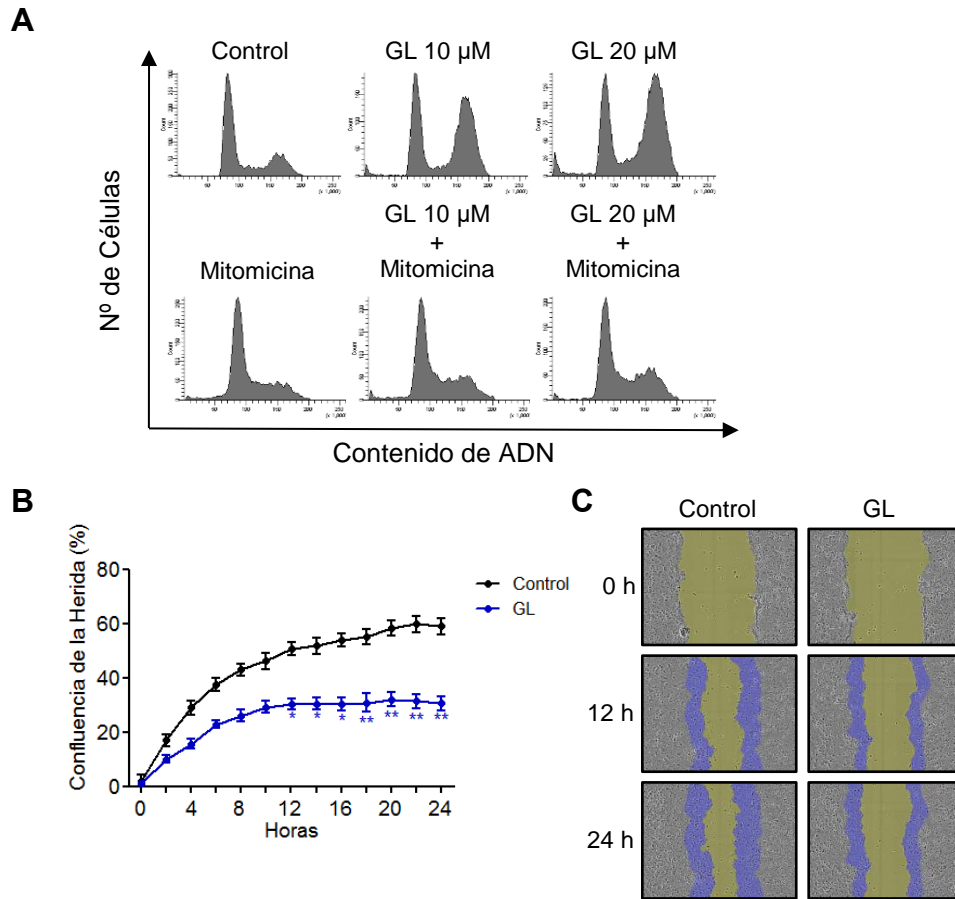


Figura 18. GL inhibe la motilidad celular en células DU145. **A.** Las células se pre-incubaron con mitomicina C (5 μ g/ml) durante 1 h y luego con GL (10 y 20 μ M) durante 24 h. El ciclo celular se analizó mediante tinción con PI y citometría de flujo. Los histogramas mostrados son representativos. **B.** Las células previamente incubadas 1 h con mitomicina C (5 μ g/ml) y tratadas con o sin GL (10 μ M) durante 24 h. Se hicieron mediciones a distintos tiempos (cada 2 horas) sobre la herida realizada en la monocapa de células DU145 cultivadas, obteniéndose el porcentaje de confluencia de la herida. Los datos proceden de la media \pm SE, de 3 experimentos. * p <0.05; ** p <0.01 comparado con el grupo control. **C.** Imágenes del ensayo de cicatrización de la herida obtenidas a 0, 12 y 24 h. Las áreas azules muestran los límites iniciales de la herida.

1.8 La parada de ciclo en G₂/M causada por la GL es independiente de los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B

Diferentes estudios han hecho hincapié en que el mecanismo de acción anti-tumoral de la GL se basa en su efecto inhibitorio sobre la señalización de STAT3. Dado que la GL bloquea la actividad transcripcional de STAT3 y NF- κ B, se investigó si el bloqueo de la señalización de ambos factores de transcripción estaban involucrados en la acumulación de las células en fase G₂/M. Para ello y mediante la infección a través de lentivirus se desarrollaron células DU145 con una expresión estable de shARN capaz de bloquear la expresión STAT3 y NF- κ B (p65). Se testaron 5 shARN diferentes para cada uno de los factores de transcripción con el objetivo de escoger aquellos que fueran más eficientes en su silenciamiento. En el caso de NF- κ B-p65 se obtuvo un silenciamiento

completo con los shARN 2 y 5. Mientras que con STAT3 solo se logró un silenciamiento parcial, siendo el shARN 3 el más efectivo (Figura 19A). Por tanto, se seleccionaron para los experimentos siguientes las células DU145 infectadas con lentivirus portadores de los shARN 2 y 3 para NF- κ B y STAT3, respectivamente cuyos niveles de expresión fueron corroborados de nuevo (Figura 19 B).

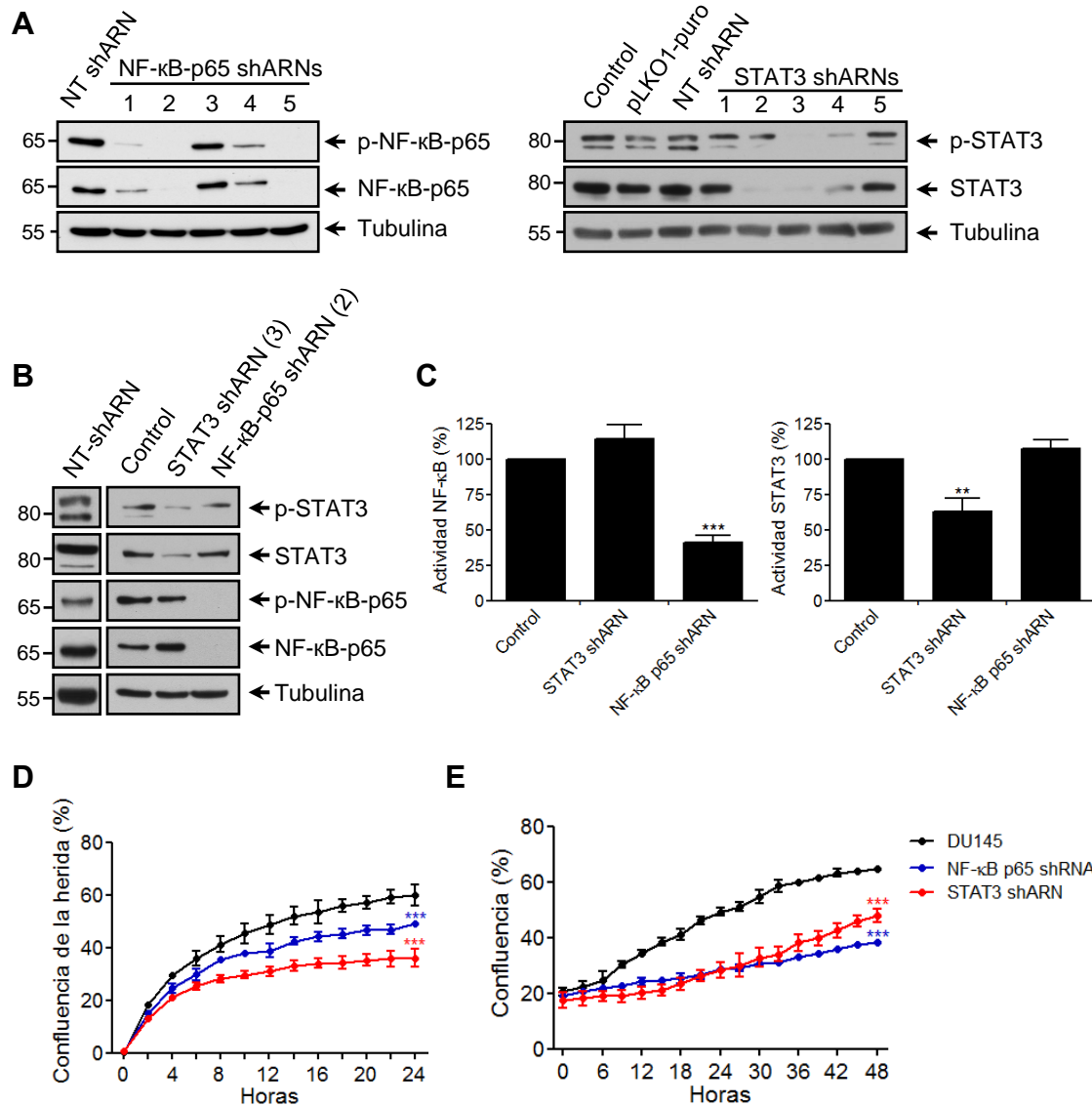


Figura 19. Caracterización de las líneas celulares DU145 silenciadas con shARN para STAT3 y NF- κ B mediante la infección con lentivirus. A. Análisis por *Western blot* de la expresión de las proteínas STAT3 y NF- κ B-p65 (total y fosforilada), en las células DU145 infectadas con lentivirus portadores de distintos shARN específicos para cada proteína. También aparecen los siguientes controles: células DU145 sin infectar, infectadas con lentivirus con el vector vacío (pLKO.1-puro) e infectadas con lentivirus con un shARN que no silencia ninguna proteína específica (*Non-target*). **B.** Medición de los niveles de expresión de proteína STAT3 y NF- κ B mediante inmunoblot, en las células silenciadas seleccionadas (shARN 3 para STAT3 y el shARN 2 para NF- κ B). **C.** Medición en las células seleccionadas de la actividad transcripcional luciferasa para ambos factores de transcripción, expresada como porcentaje de actividad. A las células DU145 normales (control) se le asigna el valor 100%. **D.** Ensayo de cicatrización de la herida en las células DU145 normales y las silenciadas para STAT3 y NF- κ B-p65 (3 y 2), con mediciones cada 2 h durante 24 h. Los datos obtenidos están expresados como porcentaje de confluencia de la herida. **E.** Evaluación de la proliferación en las líneas celulares anteriores realizando mediciones cada 3 h a lo largo de 48 h. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparado con el grupo control (DU145 sin silenciar).

Resultados

Asimismo, también se comprobó que el declive de la expresión de las proteínas iba acompañado de la reducción de la actividad transcripcional basal en ambos casos, aunque fue mucho más evidente en el caso de NF- κ B (Figura 19C). Además, se llevó a cabo un ensayo de cicatrización de la herida y un ensayo de proliferación (medido como porcentaje de confluencia) para comparar las células silenciadas para ambos factores de transcripción con respecto a las células DU145 normales. Los resultados muestran que hay una reducción significativa en la capacidad de migración y de crecimiento en las células DU145 silenciadas para STAT3 y NF- κ B-p65 con respecto al control (células DU145), lo que concuerda con la bibliografía en el sentido de que la activación de estos factores de transcripción están implicados en los procesos tumorales y progresión del cáncer y por tanto su silenciamiento revierte la capacidad migratoria de las células tumorales (Figura 19D y E).

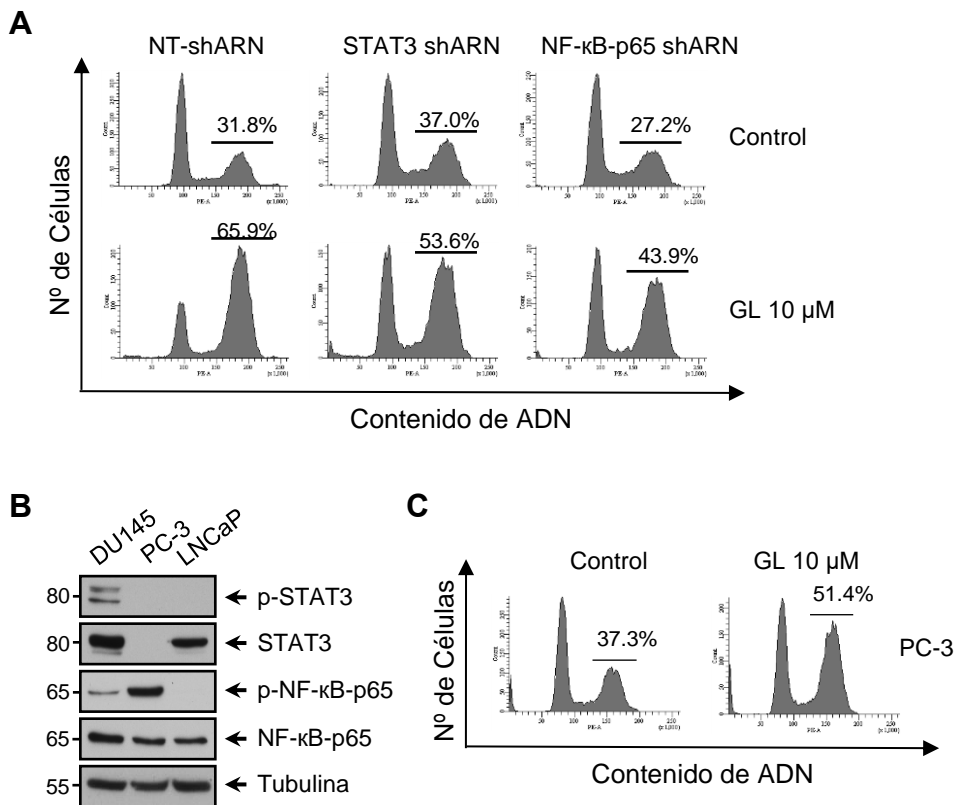


Figura 20. GL causa una detención del ciclo celular en fase G2/M independiente de los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B. **A.** Las células DU145 así como las células silenciadas con shARN para STAT3 y NF- κ B-p65 fueron tratadas con GL 10 μ M durante 24 h, mostrando los histogramas representativos obtenidos mediante citometría de flujo. **B.** Western blot evaluando los niveles proteicos basales de STAT3 y NF- κ B-p65 (total y fosforilada) en las líneas de cáncer de próstata DU145, PC-3 y LNCaP. **C.** Ciclo celular en las células PC-3 tratadas con GL 10 μ M a las 24 h.

Para determinar si la parada de ciclo celular inducida por GL es dependiente de STAT3 y NF- κ B, se analizó mediante citometría de flujo el perfil del ciclo celular de las células DU145 silenciadas para STAT3 y NF- κ B-p65 con respecto a el control (NT-shARN) tras el tratamiento con GL. Los resultados muestran que la presencia de ninguno de estos factores de transcripción, los cuales se encuentran constitutivamente activados en DU145, es necesaria para que la GL induzca la parada del ciclo celular (Figura 20A). No obstante, en el caso de las células DU145 silenciadas para STAT3 que siguen manteniendo un nivel residual de expresión de STAT3 no se puede descartar que esos niveles de proteína fueran suficientes para enmascarar su actividad en el ciclo. Esta hipótesis fue totalmente desestimada cuando se caracterizaron las líneas celulares de cáncer de próstata DU145, LNCaP y PC-3, observándose que éstas últimas carecen de la expresión de STAT3 y sin embargo el tratamiento con la GL si las afecta a nivel de ciclo celular (Figura 20B y C).

1.9 Efecto de la GL sobre la expresión de proteínas implicadas en la regulación de la fase G₂/M del ciclo celular

Puesto que la GL provoca una alteración de la progresión del ciclo celular, a continuación, se estudiaron las principales CDKs y ciclinas que regulan la progresión por las diferentes fases del ciclo en las células DU145 tratadas con GL (10 μ M), incubándose con los tiempos indicados.

Como se observa en el *Western blot* de la Figura 21, por un lado, la GL inhibe la expresión de ciclina E cuya expresión decae radicalmente al final de la fase S; y también lo hace, aunque de forma mucho más atenuada, la expresión de ciclina D la cual alcanza sus niveles máximos en la fase G₁/S y luego se reduce levemente permaneciendo en los mismos niveles a lo largo del ciclo; además de forma más tardía (a las 12 horas) empezó a decrecer la expresión de ciclina A cuyos niveles empiezan a reducirse al final de la fase G₂. Por otro lado, los niveles de expresión de CDK4 y CDK2 permanecen prácticamente invariables. Por el contrario, los niveles p-CDK1 y, sobre todo, los de ciclina B se incrementan progresivamente. En cuanto a las proteínas de la familia CDC25, la isoforma A no cambia su expresión pero sí lo hace la CDC25C reduciéndose considerablemente y por tanto, dejaría de fosforilar a la CDK1 inactivando al complejo CDK1-ciclina B que actúa en la fase G₂/M (Figura 21). En

Resultados

conjunto, los datos muestran que la GL está alterando proteínas implicadas en la fase G_2/M que justificaría la parada de ciclo celular.

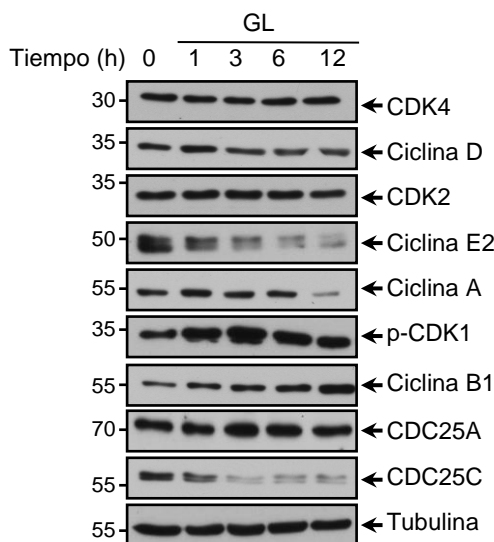


Figura 21. Efecto de la GL sobre las principales proteínas implicadas en el control de la progresión del ciclo celular. Los niveles de proteínas de las principales ciclinas, CDKs y fosfatasa CDC25 fueron analizadas por *Western blot* en las células DU145 tratadas con GL 10 μ M en los tiempos que se indican.

A continuación, se estudió en detalle proteínas específicas de la fase G_2/M comparando entre una línea celular de cáncer de próstata que responde a GL (DU145) frente a otra que no lo hace (LNCaP). Cabe destacar que en las células DU145 tratadas con GL se observa un incremento progresivo de los niveles de ciclina B, p-CDK1 así como la reducción de CDC25C, los cuales no se aprecian en LNCaP ya que no varían con respecto al control, o en el caso de p-CDK1 se mantiene oscilante a lo largo de las horas. Myt1 y Wee1, son otros reguladores del complejo CDK1-ciclina B, parecen no tener un papel relevante en la parada efectuada por la GL. El primero (Myt1) desaparece en LNCaP, mientras que, en DU145 incrementan sus niveles a las 12 y 24 horas. No obstante, las bandas que aparecen son de mayor peso molecular, por lo que deben corresponder a la forma fosforilada y por tanto inactiva. El segundo (pWee1 fosforilado en serina 642), está inhibido en ambas células a 24 horas del tratamiento con GL, por tanto no se aprecia una expresión diferencial.

Por otro lado, la fosforilación de la histona H3 en serina 10 está muy correlacionada con la condensación de cromosomas en la mitosis. La GL indujo la expresión de pHistona H3 a partir de las 12 horas de tratamiento en las células DU145, coincidiendo en el tiempo con la parada de ciclo en G_2/M . Por el contrario, en las células LNCaP apenas se observa fosforilación de dicha proteína. Además, la proteína PLK1 que interviene en la transición de las fases G_2/M y en la formación del centrosoma, se encuentra sobreexpresada en DU145 tras el tratamiento con GL con

respecto al control. En contraste, en las células LNCaP no se observa variación de la expresión de PLK1. Por último, es llamativa la expresión diferencial con respecto a p21, un inhibidor de CDKs que regula fundamentalmente la progresión en la fase G₁/S, y que se encuentra muy sobreexpresado en las células LNCaP con o sin tratamiento, mientras que en DU145 se observa un incremento a partir de las 12 y 24 horas de incubación con GL (Figura 22).

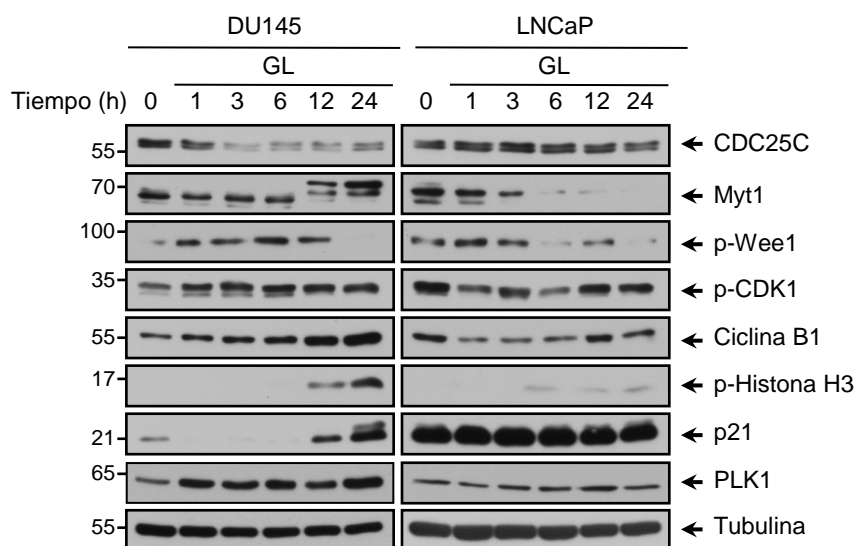


Figura 22. Análisis cinético de proteínas involucradas en la regulación de la fase G₂/M tras el tratamiento con GL y su expresión diferencial en células DU145 con respecto a las LNCaP. Las células se incubaron con GL 10 μ M durante los tiempos indicados y se evaluó la expresión de proteínas mediante *Western blot*.

Resultados

2. Estudio de la señalización molecular implicada en la parada de ciclo celular promovida por GL

Resultados

2.1 La mutación de la proteína p53 no es responsable de la alteración del ciclo celular provocada por la GL

Como ya se ha comentado anteriormente, el factor de transcripción p53 desempeña funciones importantes en la reparación del daño al ADN y en el control de la progresión del ciclo celular. Las células LNCaP, aunque tienen una mutación de una base, el aminoácido que codifica es el mismo que el de la proteína normal presentando una proteína p53 funcional. Mientras que las líneas DU145 y PC-3 presentan mutaciones que dan lugar a una proteína no funcional, y en el caso de PC-3 la mutación da lugar a un codón de *Stop* de la traducción lo que conlleva a que no se exprese dicha proteína (Figuras 23A y B).

Por esta razón, se pensó que la respuesta diferencial a GL observada en las diferentes líneas de cáncer de próstata a nivel de ciclo celular podría deberse a la presencia de una proteína p53 disfuncional. Para investigarlo, se seleccionaron las células PC-3 debido a que carecen de la expresión de dicha proteína, y se reconstituyó su expresión transfectando las células con el plásmido p53-Flag. Primeramente, se observó que el tratamiento a 24 horas con GL no modifica la expresión de p53 (Figura 23C). Posteriormente, se comparó el perfil del ciclo celular mediante citometría de flujo en las células PC-3 sin transfectar con respecto a las transfectadas con p53-Flag en presencia y ausencia de GL, sin encontrarse diferencias entre ambas, demostrando que la presencia de una proteína p53 funcional no logra revertir la parada del ciclo celular promovida por la GL (Figura 23D).

Además, los experimentos llevados a cabo en otras líneas tumorales con p53 normal (sin mutaciones), concretamente en HeLa, A549 y SK-N-SH, no se indujo parada de ciclo celular en las dos primeras al ser tratadas con GL, en cambio, sí lo hizo en SK-N-SH (Figura 23E). Tomando en conjunto los resultados de estos experimentos se puede afirmar que la parada de ciclo celular en G₂/M provocada por la GL es independiente de p53.

Resultados

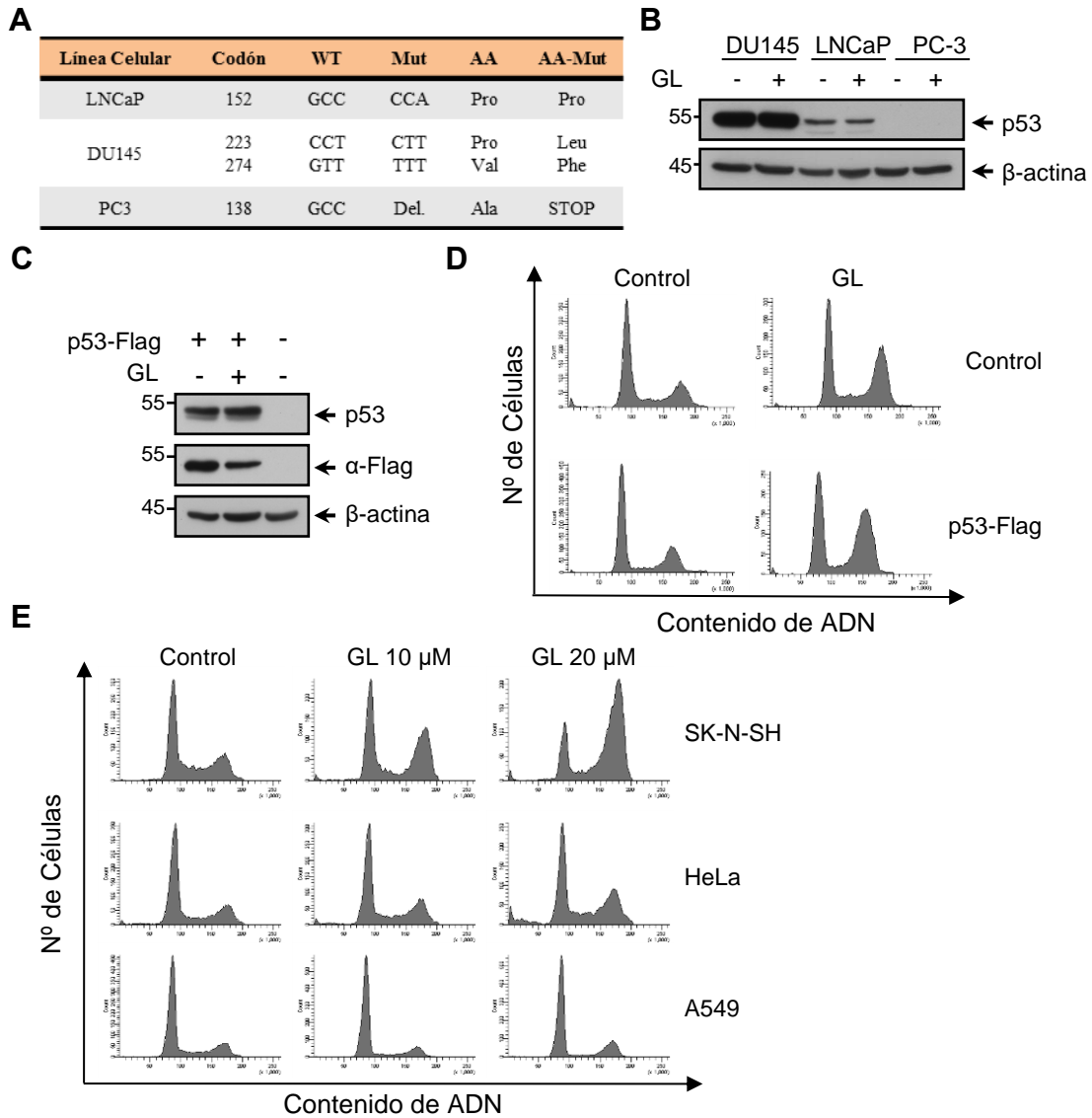


Figura 23. La parada de ciclo celular mediada por la GL no es revertida con la reconstitución de la expresión de p53. **A.** Esquema representativo de las mutaciones de p53 en las líneas de cáncer de próstata DU145, PC-3 y LNCaP. WT: secuencia original (no mutada) de nucleótidos; AA: Aminoácido correspondiente a la secuencia WT; Mut: Secuencia de nucleótidos mutada; AA-Mut: Aminoácido anómalo. **B.** Expresión de p53 tras el tratamiento con GL 10 μ M en las 3 líneas celulares de cáncer de próstata mediante inmunoblot. **C.** Las células PC-3 se transfectaron con el plásmido p53-Flag y después de 72 h, se estimularon con GL 10 μ M durante 24 h adicionales. Una fracción de células se utilizó para analizar la expresión de la proteína p53. **D.** La otra fracción de células PC-3 se utilizó para el análisis mediante citometría de flujo, mostrando los histogramas representativos. **E.** Análisis mediante citometría de flujo del ciclo celular en otras líneas tumorales sin mutaciones en p53 tratadas con GL 10 μ M, 24 h.

2.2 GL activa la ruta de señalización de DDR a través de ATM/ATR-CHK1

CDC25C es una proteína esencial para el control de la transición entre las fases G₂/M del ciclo celular y está implicado en la respuesta frente a diferentes tipos de estrés, incluidos los que causan daño en el ADN. Ante la presencia de agentes genotóxicos, las quinasas ATM y ATR así como sus efectores, las quinasas CHK1 y CHK2, son

activadas interviniendo en la inhibición y/o degradación de CDC25C. Basándose en que la GL es capaz de reducir la expresión de CDC25C, se barajó la posibilidad de que esta molécula pudiera activar la DDR mediada a través de la ruta de señalización de ATM/ATR.

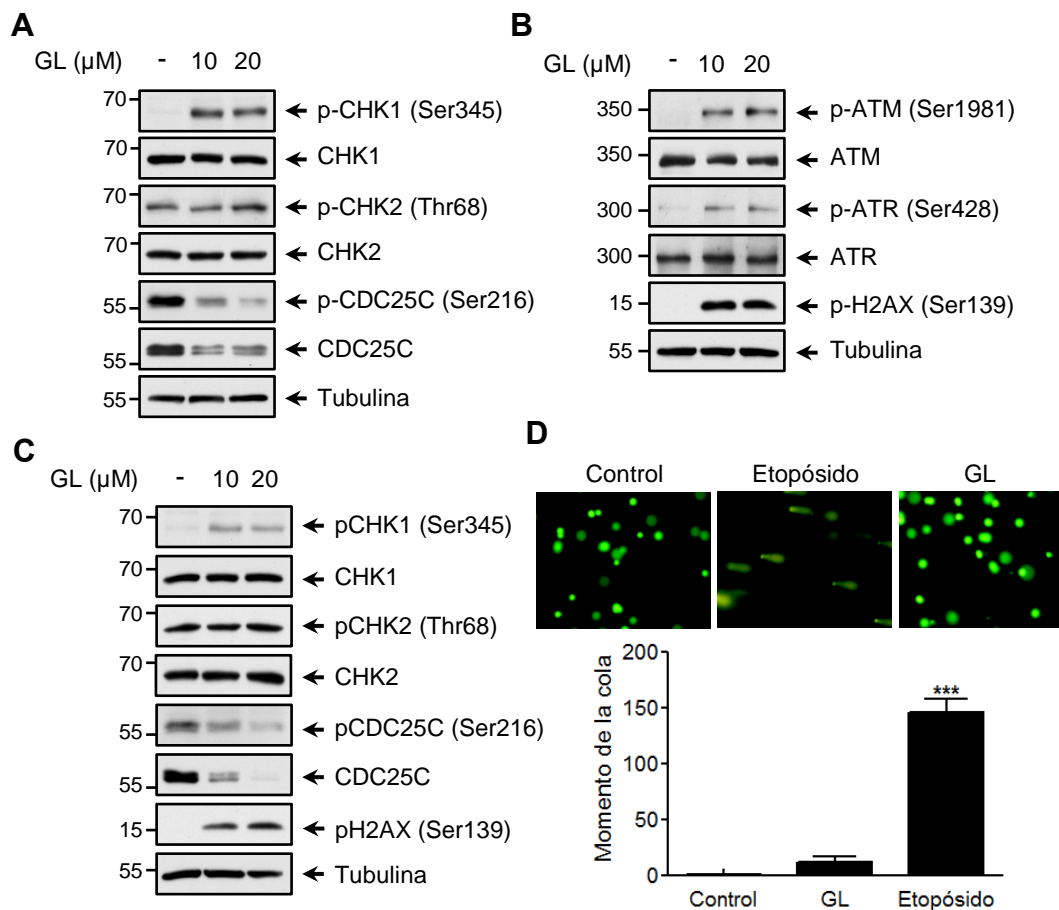


Figura 24. Efecto de la GL en la expresión de proteínas que intervienen en la DDR y el daño al ADN. A. Expresión de las proteínas CHK1, CHK2 y CDC25C (total y fosforilada). **B.** Las proteínas ATR, ATM (total y fosforilada) y γ H2AX, analizadas por inmunoblot en células DU145 tratadas con GL durante 24 h. **C.** Expresión de proteínas implicadas en la DDR en células PC-3 tratadas con GL a las 24 h. **D.** Ensayo cometa alcalino realizado para determinar rupturas en el ADN en células DU145 tratadas 24 h con GL (10 μ M) o etopósido (50 μ M). Imágenes representativas del ensayo así como la representación gráfica con el momento de la cola. *** $p < 0.001$ comparado con el grupo control (células sin tratamiento).

Para estudiar dicha actividad, se midieron los niveles de activación de CHK1 y CHK2 mediante el análisis de la fosforilación de los residuos serina 345 y treonina 68, respectivamente. En la Figura 24A se muestra como el tratamiento con GL indujo la fosforilación de CHK1 de una manera dosis dependiente, sin embargo, los niveles de fosforilación de CHK2 no se vieron afectados. La activación de CHK1 se correlacionó con la fosforilación de CDC25C en la serina 216 y su posterior degradación. Seguidamente, se examinó la capacidad de la GL para inducir la activación de las

Resultados

quinasas ATM y ATR que actúan de iniciadoras de la DDR. Para ello, se estimularon las células DU145 con GL detectándose, por inmunoblot, la fosforilación de ATM en la serina 1981 y de la serina 428 en ATR. Paralelamente, se evaluó la fosforilación de la histona H2AX como marcador de daño al ADN. Como se observa en la Figura 24B, la GL induce una fosforilación dosis dependiente de ATM y ATR, incrementando los niveles de fosforilación de la serina 139 en H2AX.

Del mismo modo, se han obtenido resultados de expresión similares de las proteínas mencionadas en la línea celular PC-3, cuyo comportamiento frente a la GL es muy parecido al de las células DU145 (Figura 24C). Por último, se realizó un ensayo cometa para determinar la presencia de rupturas en las cadenas de ADN. En contraste con la inducción de γ H2AX, no se encontraron cambios significativos en las células tratadas con GL durante 24 horas. Sin embargo, sí se observó una evidente formación de cometas con la estimulación con etopósido. Estos resultados ponen de manifiesto que la GL activa la ruta de señalización de ATM/ATR sin producir rupturas en el ADN (Figura 24D).

2.3 La inhibición de la ruta de señalización de ATM/ATR revierte la parada de ciclo celular en fase G₂/M inducida por la GL

En vista de los resultados previos obtenidos, se estudió si los inhibidores de ATM/ATR podrían afectar la parada en fase G₂/M, la DDR y la apoptosis mediada por la GL. En primer lugar, las células DU145 se estimularon en presencia o en ausencia de GL con UCN-01, un inhibidor dual de CHK1 y CHK2, y se evaluó en paralelo el ciclo celular así como la expresión de las proteínas pCHK1 (Ser345), γ H2AX y PARP. Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de CHK1 a través de UCN-01 evitó la parada del ciclo celular en fase G₂/M producido por la GL (Figura 25A). Como se esperaba, los niveles de fosforilación de γ H2AX no varían al encontrarse por encima en la ruta de señalización. Tampoco interfirió con la escisión de PARP inducida por GL (Figura 25C) ni con la apoptosis, la cual incluso se vio incrementada (Figura 25E).

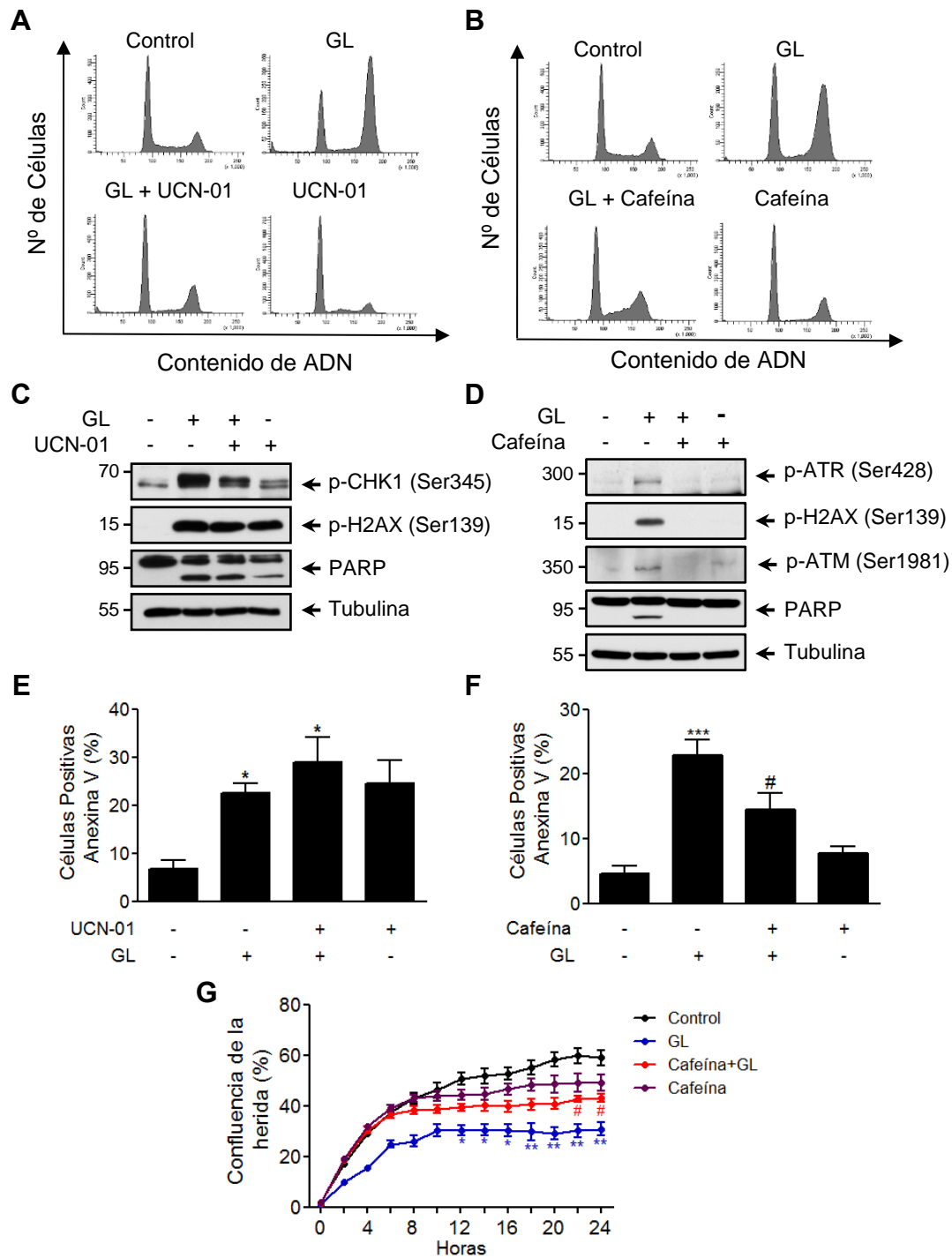


Figura 25. GL activa la ruta la señalización ATM/ATR-Chk1 en células DU145. Las células fueron pre-incubadas durante 1 h con UCN-01 (1 μ M) o con cafeína (10 mM) y luego tratadas con GL (10 μ M) durante 24 h. **A, B.** Perfiles representativos del ciclo celular obtenidos por citometría de flujo después del tratamiento con los compuestos indicados durante 24 h. **C, D.** Identificación proteica de la activación de la DDR y la apoptosis (PARP). **E, F.** Incubación durante 48 h con los tratamientos indicados para la evaluación de la apoptosis mediante la tinción con Anexina V/PI y su análisis en el citómetro de flujo. Se muestran los porcentajes de células positivas para Anexina V. **G.** Ensayo de cicatrización de la herida en el que se aplicaron los estímulos correspondientes sobre la monocapa de células tras realizar la herida y se monitorizó el cierre de la misma durante 24 h, expresándose los datos como porcentaje de la confluencia de la herida. Los datos corresponden a la media \pm DE, de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparado con el grupo control. # $p < 0.05$ comparado con el grupo tratado con GL (10 μ M).

Finalmente, para verificar la implicación de ATM/ATR en la parada en G₂/M promovida por la GL, se llevaron a cabo experimentos similares pero utilizando la cafeína, un inhibidor de las proteínas ATM y ATR. Las células DU145 fueron estimuladas con GL en presencia o ausencia de cafeína, mostrando que la inhibición de dichas quinasas previno claramente la parada de ciclo celular (Figura 25B) y la activación de ATM, ATR y γ H2AX (Figura 25D). En contraste con los resultados obtenidos con la inhibición de CHK1, la cafeína sí produjo una inhibición significativa del corte de PARP inducida por GL así como la reducción de la apoptosis al disminuir el porcentaje de células positivas para Anexina V (Figura 25F). Cabe destacar que la estimulación con cafeína consiguió revertir la capacidad de la GL de reducir la cicatrización de la herida en las células DU145 (Figura 25G). Tomando en conjunto estos datos, se demuestra que la parada de ciclo en fase G₂/M producida por la GL es mediada a través de la activación de la ruta de señalización ATM/ATR.

2.4 N-acetil cisteína (NAC) previene la parada de ciclo celular y la apoptosis causada por la GL

La activación de la DDR puede producirse a consecuencia de un daño al ADN provocado por la producción de ROS. Por tanto, se investigó si el incremento intracelular de ROS está implicado en la inducción de la parada de ciclo celular en G₂/M y de la apoptosis en las células DU145. Como muestra la Figura 26A, a diferencia de la inducción causada por el hidroperóxido de tert-butilo (TBHP), la GL fue incapaz de incrementar los niveles intracelulares de ROS. En consecuencia, como muestran los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, ni el antioxidante ambroxol ni el galato de epigallocatequina (EGCG) evitaron la parada de ciclo celular inducida por GL (Figura 26B). Curiosamente, el tratamiento con el antioxidante NAC sí previno los efectos de la GL a nivel de ciclo celular (Figura 26B), la fosforilación de H2AX, el corte de PARP y caspasa 3 (Figura 26C), así como de la apoptosis medida a través del ensayo de Anexina V/PI (Figura 26D).

NAC es un antioxidante que neutraliza los radicales libres y también un precursor de L-cisteína. La capacidad de la GL de modificar y unirse covalentemente a cisteínas, al menos en el caso de la proteína STAT3, sugiere que el NAC podría estar uniéndose a la GL atenuando sus efectos sobre las células tumorales.

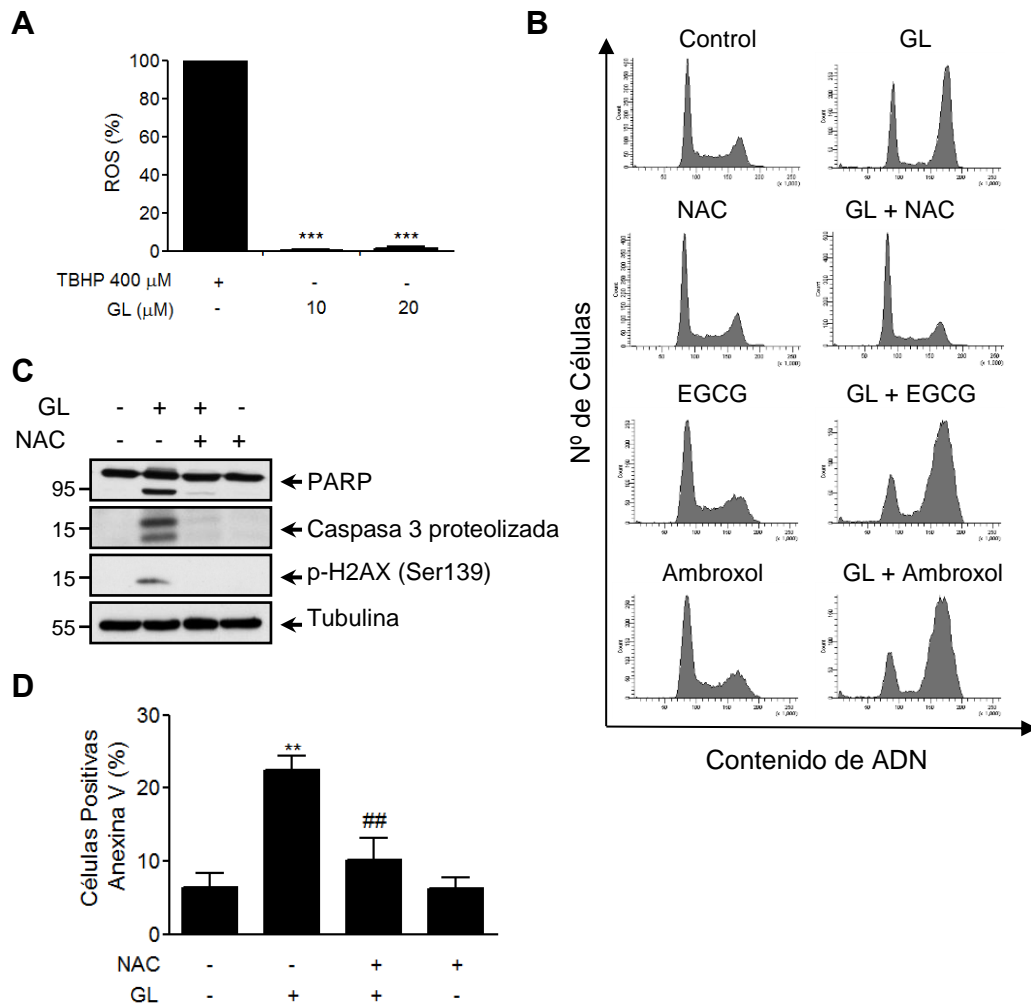


Figura 26. NAC inhibe la parada de ciclo celular en G2/M y la apoptosis inducida por GL. **A.** Se trataron las células DU145 con GL o TBHP, determinándose la generación intracelular de ROS con la sonda fluorescente DCFH2-DA. *** $p < 0.001$ comparado con el control positivo (TBHP). **B.** Se incubaron las células con NAC (1 mM), EGCG (100 μ M) o ambroxol (100 μ M) seguido del tratamiento con GL (10 μ M). Se muestran los histogramas representativos del ciclo celular obtenidos después de 24 h de tratamiento. **C.** Expresión proteica de PARP, caspasa 3 y γ H2AX determinada por inmunoblot. **D.** Después de 48 h de tratamiento, las células se tiñeron con Anexina V/PI para evaluar la apoptosis al citómetro, mostrando el porcentaje de células positivas para Anexina V. Los datos corresponden con la media \pm DE, de experimentos triplicados. ** $p < 0.01$ comparado con el grupo control. ## $p < 0.01$ con respecto con el grupo tratado con GL (10 μ M).

Resultados

3. Estudio del efecto antitumoral de la GL en los ratones xenoinjertados con células DU145 y análisis de su perfil metabolómico en el plasma

Resultados

3.1 La inhibición de STAT3 y NF-κB con shARN o GL reduce el crecimiento tumoral de xenoinjertos de células de cáncer de próstata *in vivo*, y además la GL induce la fosforilación de H2AX.

Estudios previos han demostrado que la GL produce una reducción del crecimiento tumoral en varios modelos animales de cáncer de próstata (Hellsten y cols., 2008; Canesin y cols., 2016). Dado que la GL inhibe de forma dual los factores de transcripción STAT3 y NF-κB y además activa la DDR, se investigó si están involucrados en el crecimiento tumoral *in vivo*. Se usaron ratones machos homocigotos para el gen *nude* (nu/nu) que se caracterizan por carecer de pelo, tener un timo rudimentario y una deficiencia de linfocitos T. El hecho de que sean ratones inmunodeficientes les hace idóneos para tolerar xenoinjertos.

En este caso, se inyectaron subcutáneamente células DU145 normales o bien infectadas previamente con lentivirus con shARNs para STAT3 y NF-κB-p65 (Figura 27A). Antes de la aplicación de las células tumorales, se volvió a comprobar el silenciamiento de la expresión de ambas proteínas mediante *Western blot*.

En primer lugar, se examinó cómo afecta el silenciamiento de STAT3 y NF-κB observándose que los ratones no experimentaron cambios en el peso corporal a lo largo del procedimiento experimental (Figura 27B). No obstante, sí se encontró una reducción del volumen tumoral significativa. De hecho, el último día de medición del volumen tumoral en los ratones xenoinjertados con células DU145, este parámetro alcanzó un volumen medio de 501.11 mm³ mientras que en los xenoinjertos con células silenciadas para NF-κB y STAT3 fue de 212.59 y 298.63 mm³, respectivamente (Figura 27C). En concordancia con estos datos, una vez extraído el tumor su peso fue significativamente menor en los ratones con xenoinjertos de células silenciadas para ambos factores de transcripción con respecto al de DU145 (Figura 27D). En definitiva, estos resultados demuestran que aunque el silenciamiento de STAT3 y NF-κB no está directamente implicados en los efectos de la GL a nivel de ciclo celular *in vitro*, sí parecen ser importantes en la progresión del tumor en los modelos animales y por tanto, la capacidad de la GL de inhibir ambos factores de transcripción también repercute en la progresión del tumor al provocar efectos anti-tumorales.

Resultados

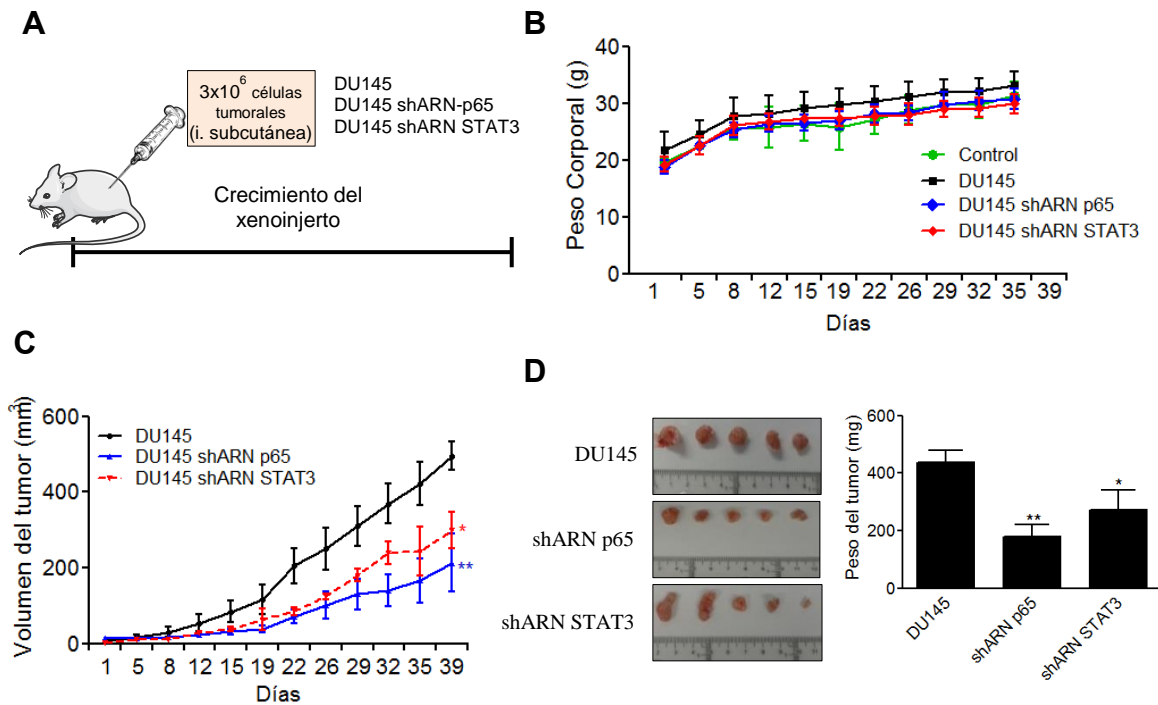


Figura 27. El silenciamiento de los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B reduce el crecimiento tumoral de xenoinjertos de células DU145 *in vivo*. A. Esquema del procedimiento experimental. B. Control del peso corporal de los distintos grupos. C. Estimación del volumen tumoral (mm³) cada 3-4 días empleando un calibre. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ comparado con el grupo DU145. D. Peso del tumor (mg) e imágenes de los tumores extraídos de cada grupo experimental.

En segundo lugar, se comprobó el efecto antitumoral de la GL en el mismo modelo animal. Para ello, se realizaron los xenoinjertos de células DU145 por inyección subcutánea y después de una fase de crecimiento del tumor de 4 semanas, cuando el tumor alcanza un volumen aproximado de 100 mm³, comenzó la fase de tratamiento en la que los ratones recibieron una dosis diaria de GL (3 mg/kg) a través de inyecciones intraperitoneales durante 3 semanas (Figura 28A). Los resultados muestran que la GL no alteró el peso corporal de los ratones (Figura 28B). Por el contrario, sí se apreció una reducción significativa del volumen del tumor durante el tratamiento con GL, siendo la media de éste de 327.83 mm³ (Figura 28C). Después del sacrificio de los animales, el tumor fue extirpado y pesado, observándose una reducción significativa del peso tras las 3 semanas de tratamiento en comparación con los ratones no tratados (Figura 28D). Por último, se analizó la expresión de la fosforilación de H2AX para investigar si la GL activa la DDR *in vivo*. La inmunohistoquímica realizada a secciones de tejido del tumor mostró que la expresión de células con γ H2AX fue significativamente mayor en los ratones tratados con GL en comparación con los ratones que no recibieron el

tratamiento (Figura 28E). Por lo que, los resultados confirman que la activación de la señalización DDR inducida por GL ocurre *in vitro* y también *in vivo*.

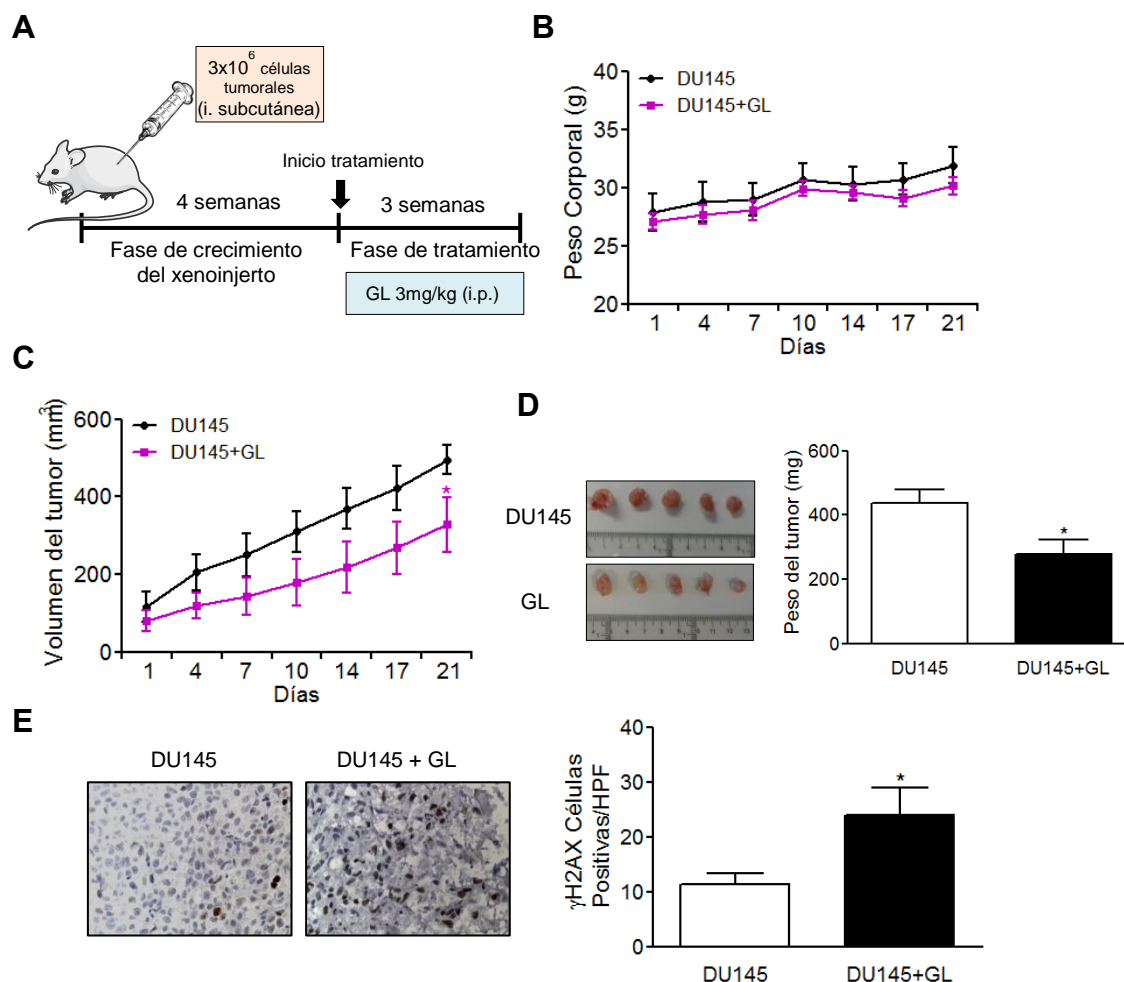


Figura 28. La GL reduce el crecimiento tumoral *in vivo* e induce la fosforilación de H2AX en los ratones xenoinjertados con células de cáncer de próstata. **A.** Esquema con los grupos experimentales y los procedimientos experimentales: Los ratones atímicos desnudos Foxn1nu se les realizó el xenoinjerto de células DU145 de forma subcutánea. Después pasaron 4 semanas hasta que el tumor estaba bien constituido. Por último, comenzó la fase de tratamiento que consistió en el tratamiento con GL (3 mg/Kg) o DMSO (0.1%) durante 3 semanas mediante inyección intraperitoneal (i.p.). **B.** Control del peso corporal de los ratones. **C.** Estimación del volumen tumoral (mm³) cada 3-4 días usando un calibre. **D.** Peso del tumor (mg) con las imágenes de los tumores extraídos de cada grupo experimental. **E.** Expresión de γ H2AX en secciones de tejido tumoral de los xenoinjertos de DU145 de ratones control (sin tratar) y tratados con GL. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica (x40). Cuantificación gráfica de las células positivas para γ H2AX por campo. * $p < 0.05$ comparado con el grupo DU145.

3.2 El tratamiento temprano con GL bloquea el inicio del desarrollo tumoral en el modelo animal de cáncer de próstata

En los experimentos anteriores se dejó una fase de crecimiento del tumor antes de aplicar el tratamiento con GL, sin embargo, también investigamos el efecto del tratamiento temprano con este metabolito fúngico en la tumorigénesis del cáncer de

Resultados

próstata. Para ello, se les inyectó a los ratones el xenoinjerto de células DU145 y seguidamente se les aplicó el tratamiento con GL (3mg/kg) durante 3 semanas. Posteriormente permanecieron durante una fase de post-tratamiento (Figura 29A). Los resultados muestran que el volumen tumoral medio en los ratones tratados con GL fue de 18,61 mm³ al finalizar el tratamiento con respecto a los 84.40 mm³ del grupo de ratones sin tratar. Incluso, este efecto en el decrecimiento de la masa tumoral con respecto al grupo sin tratar se mantuvo 9 días después de finalizar el tratamiento (Figura 29B). Además, el peso de los tumores medido al término del ensayo es significativamente menor en los ratones tratados (Figura 29C). Por lo tanto, este experimento pone de manifiesto que el empleo de GL en estadios tempranos de la enfermedad también podría ser beneficioso para tratar el cáncer de próstata.

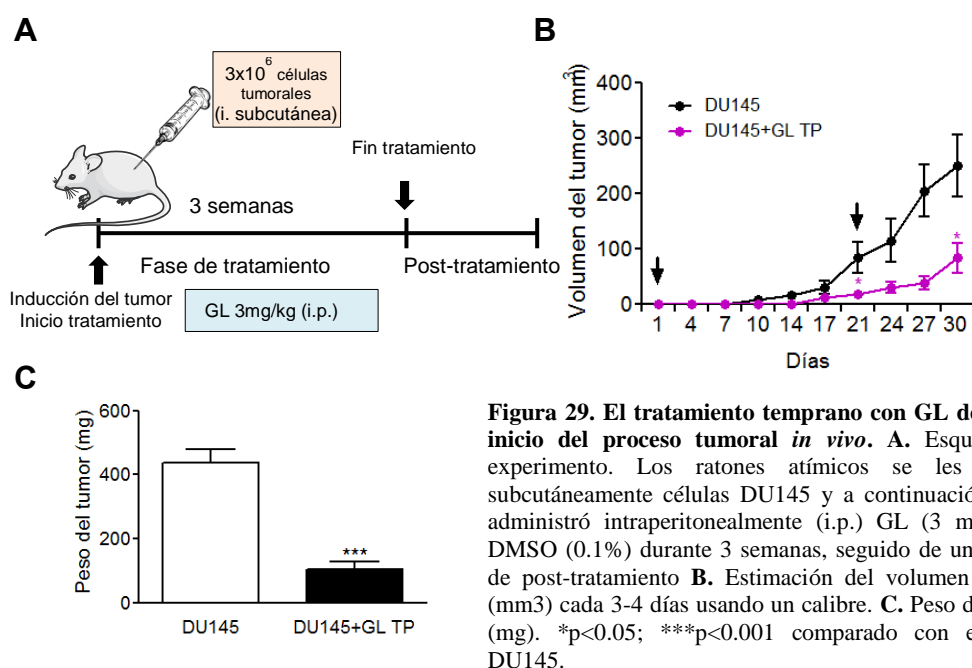


Figura 29. El tratamiento temprano con GL detiene el inicio del proceso tumoral *in vivo*. A. Esquema del experimento. Los ratones atímicos se les inyectó subcutáneamente células DU145 y a continuación se les administró intraperitonealmente (i.p.) GL (3 mg/Kg) o DMSO (0.1%) durante 3 semanas, seguido de un período de post-tratamiento B. Estimación del volumen tumoral (mm³) cada 3-4 días usando un calibre. C. Peso del tumor (mg). *p<0.05; ***p<0.001 comparado con el grupo DU145.

3.3 Cambios metabólicos en el plasma del modelo animal con xenoinjertos de células de cáncer de próstata con una inhibición de STAT3 y NF-κB, mediante el uso de shARNs o con el tratamiento farmacológico con GL

El estudio del perfil metabólico en el plasma de los ratones con xenoinjertos de células DU145 de cáncer de próstata se llevó a cabo con el fin de encontrar metabolitos alterados a consecuencia del proceso tumoral, como una aproximación para la búsqueda de biomarcadores de la enfermedad relacionados con la respuesta a GL. Para ello, se obtuvieron 200 µl de plasma extraído por punción cardíaca de cada uno de los grupos experimentales para su análisis. A partir de una librería de 3500 metabolitos,

se identificaron un total de 488 en el plasma de los ratones. La mayoría de los metabolitos detectados pertenecen al grupo de los lípidos (N=186) seguido de los aminoácidos (N=146), aunque también se han encontrado otros metabolitos que son carbohidratos, nucleótidos, xenobióticos, péptidos, cofactores y vitaminas e intermediarios energéticos (Figura 30A).

De todos los metabolitos detectados solo 25 de ellos presentan diferencias de expresión significativas entre el grupo control (sin tumor) frente al grupo correspondiente a los ratones con xenoinjertos de células de cáncer de próstata (DU145). Concretamente hay 19 metabolitos que decrecen su expresión mientras que 6 incrementan en presencia del tumor. A continuación, se comparó los 25 metabolitos con los datos obtenidos de los grupos experimentales restantes, es decir, con los ratones con xenoinjertos de células DU145 que recibieron GL o aquellos donde las proteínas STAT3 y NF- κ B fueron silenciadas con sus respectivos shARN. Los metabolitos encontrados de mayor interés fueron analizados.

La mayoría de las células cancerosas incrementan la glucólisis para obtener el suministro energético necesario para su crecimiento. En este contexto, se encontró una reducción de los niveles de sorbitol (metabolito formado a partir de la glucosa por la aldosa reductasa) en todos los grupos de ratones xenoinjertados con respecto al control, exceptuando el grupo DU145 shARN NF- κ B-p65 que aunque muestra una tendencia similar, ésta no fue significativa (Figura 30B). Además, se encontraron reducidos los niveles de glucosa, fructosa 1,6-bisfosfato, 3-fosfoglicerato en el grupo DU145 con respecto al grupo control, aunque estas diferencias no fueron significativas. A pesar de esto, dichas alteraciones podrían indicar una reducción de la disponibilidad de carbohidratos debido a su captación y utilización para el crecimiento tumoral.

Los dipéptidos anserina y N-acetilcarnosina son derivados del metabolismo de histidina que se utilizan para la formación de antioxidantes (Kohen y cols., 1988; Holliday y McFarland, 1996). En el análisis metabolómico se observó un incremento en el grupo de ratones con el xenoinjerto de células DU145 de 1.48 (anserina) y 1.63 (N-acetilcarnosina) veces de inducción, en comparación con el grupo control. En los ratones tratados con GL o con los shARNs se detectó una tendencia ascendente de ambos metabolitos similar a la observada al grupo DU145 que podría sugerir que los

Resultados

niveles elevados en plasma de dichos metabolitos son indicativos de la presencia del tumor (Figura 30B).

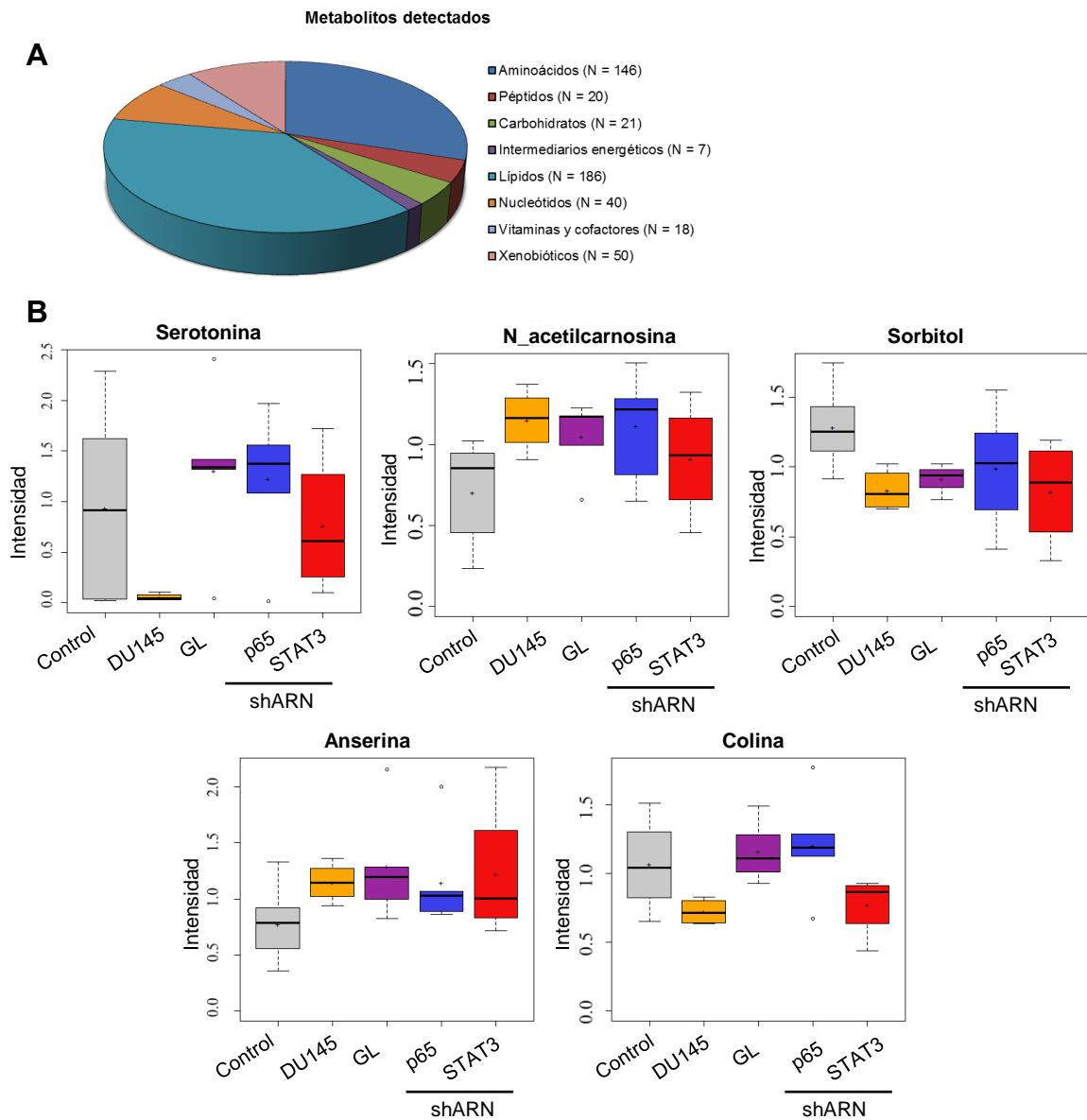


Figura 30. Análisis metabolómico en plasma de grupos experimentales del modelo animal con xenoinjertos de células DU145 de cáncer de próstata. A. Clasificación de los metabolitos identificados. N=Número de metabolitos identificados. **B.** Metabolitos de interés (sorbitol, serotonina, anserina, N-acetilcarnosina y colina) alterados significativamente ($p < 0.05$) en plasma en presencia del xenoinjerto con células DU145 con respecto al control (sin tumor) y su comportamiento con el tratamiento con GL o silenciando STAT3 y NF- κ B. Leyenda del diagrama de cajas: la barra horizontal representa la mediana, el símbolo + del interior de la caja representa el valor promedio, la barra inferior representa el mínimo de la distribución, la barra superior muestra el máximo de la distribución y los círculos representan los valores atípicos. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Welch's.

La serotonina está implicada en numerosas funciones biológicas como neurotransmisor del sistema nervioso central, agente vasoactivo, afecta al peristaltismo intestinal, etc. También se ha relacionado con el crecimiento del tumor, encontrándose

una sobreexpresión de sus receptores en las líneas celulares de cáncer próstata PC-3, DU145 y LNCaP y también en tumores agresivos (Dizeyi y cols., 2004; Sarrouilhe y cols., 2015). En el análisis metabolómico, se detectó una reducción significativa de 16.74 veces de inducción de los niveles de serotonina en el plasma de los ratones con xenoinjertos DU145 en comparación con el grupo control, pudiendo deberse al incremento de su captación. En contraste, el tratamiento farmacológico con GL y el silenciamiento de los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B revertieron los bajos niveles plasmáticos de serotonina (Figura 30B).

La colina interviene en numerosos procesos fisiológicos, pero también está ligada al cáncer debido a que puede afectar la metilación del ADN, aumentar la proliferación a través de la síntesis de membranas celulares y modificar la señalización celular (Awwad y cols., 2012). El análisis realizado refleja como la colina presenta niveles más bajos en plasma en el grupo DU145 en comparación con las muestras control. Sin embargo, con el silenciamiento de NF- κ B y el tratamiento con GL los niveles de colina no tienen esta tendencia. Por lo que, del mismo modo que ocurría con la serotonina, su captación puede estar incrementada en presencia del tumor y el bloqueo de p65, ya sea mediante shARN o con la GL, podría interferir en la entrada del metabolito a la célula, aumentando sus niveles en plasma en dichos grupos (Figura 30B).

Resultados

4. Análisis proteómico para la identificación de proteínas responsables de la respuesta diferencial a GL y estudio de análogos semisintéticos derivados de ésta

Resultados

A continuación, se investigaron los cambios de expresión de proteínas que ocurren como consecuencia del tratamiento con GL en las líneas DU145 y LNCaP, para comprobar si su respuesta diferencial mostrada en los bloques previos se refleja en un perfil proteómico distinto. Asimismo, se pretende hallar proteínas potenciales que permitan explicar el distinto comportamiento en ambos tipos celulares de cáncer de próstata. Todos los ensayos de proteómica que aparecen en este bloque se llevaron a cabo mediante espectrometría de masas LC/MS seguido de la cuantificación relativa por SWATH.

4.1 El tratamiento con GL altera la expresión de proteínas asociadas a funciones nucleares y mitocondriales en células DU145

En primer lugar, se procedió a realizar el análisis proteómico comparativo entre las células DU145 estimuladas con GL durante 24 horas frente a las que no han recibido tratamiento (DU145+GL/DU145). Los datos globales del análisis muestran que 447 proteínas presentan cambios significativos de expresión entre ambas condiciones ($p < 0.05$), encontrándose 287 proteínas inhibidas y 160 sobreexpresadas en presencia de GL. Aplicando un análisis estadístico más restrictivo con la corrección de Bonferroni (p valor ajustado), el número de proteínas significativas se reduce a 21 (Figura 31A y B). Empleando el software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) como herramienta para interpretar los resultados, se estudiaron las proteínas significativas con un número de veces de cambio (*fold change*) $\geq \pm 1.5$, revelando que las proteínas resultantes del ensayo de proteómica tienen una localización prácticamente similar de proteínas citoplasmáticas (47%) que de nucleares (43%) (Figura 31C). El alto porcentaje de proteínas nucleares fue totalmente esperable puesto que la GL induce una parada de ciclo celular en fase G₂/M en las células DU145, y para llevarla a cabo se requiere la modificación de la expresión y reclutamiento de proteínas reguladoras nucleares. Funcionalmente, más de la mitad de las proteínas no están clasificadas, mientras que el 27% son enzimas, el 7% proteínas reguladoras de transcripción y el 6% reguladoras de la traducción (Figura 31D).

Según los datos obtenidos con el software IPA, las proteínas encontradas diferencialmente expresadas al ser estimuladas con GL están asociadas con funciones celulares y moleculares que juegan un papel destacado en cáncer, siendo las más significativas las que se detallan a continuación: modificación post-transcripcional del

Resultados

ARN, muerte y supervivencia celular, crecimiento y proliferación celular, expresión génica y desarrollo celular (Figura 31E).

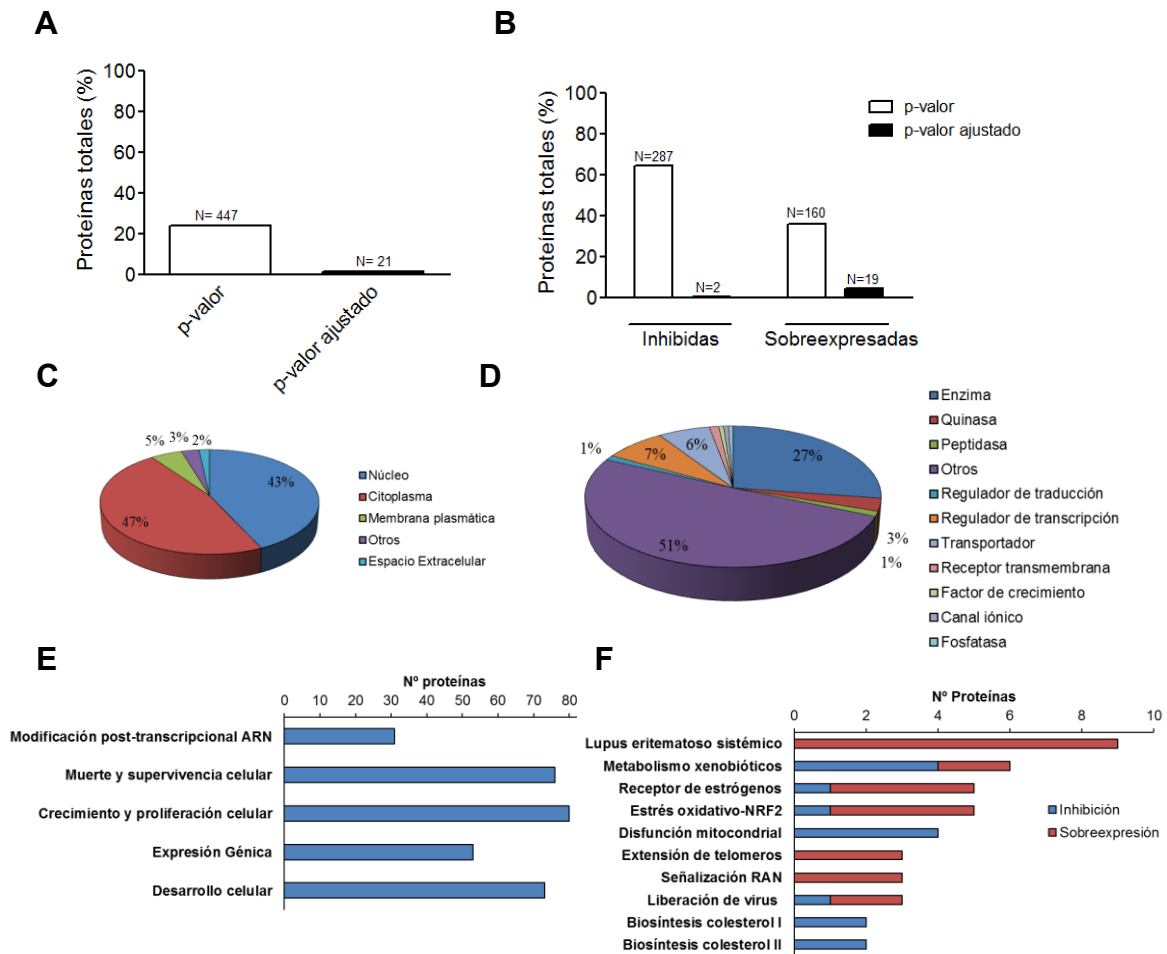


Figura 31. Análisis proteómico comparativo de DU145+GL/DU145. Las células DU145 sin tratar y estimuladas con GL 10 μ M durante 24 horas, se lisaron para la obtención de proteínas y su posterior análisis en el espectrómetro de masas mediante LC/MS seguido de la cuantificación relativa por SWATH. **A.** Proteínas con cambios de expresión significativos mediante *t-test* y corrección de Bonferroni ($p < 0.05$). **B.** Sobreexpresión e inhibición de las proteínas con cambios de expresión. **C.** Clasificación atendiendo a su localización. **D.** Clasificación según su función. **E.** Análisis de las funciones biológicas. **F.** Análisis de las 10 primeras rutas de señalización más significativas. Los análisis se hicieron con las proteínas con un $p < 0.05$ para el *t-test* y un *fold change* $\geq \pm 1.5$ utilizando la herramienta IPA.

Por otro lado, las 10 rutas de señalización más significativas asociadas a las proteínas cuya expresión varía con GL se muestran en la Figura 31F. Curiosamente, las proteínas asociadas al lupus eritematoso sistémico ocupan la primera posición, aunque al analizarlas en detalle, todas ellas son ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) y otros componentes del espliceosoma que se encargan del procesamiento y maduración del ARN, y además, también intervienen en otros procesos nucleares. De hecho, como se ha comentado, la primera función molecular más significativa era la modificación post-transcripcional del ARN. Por lo que, esta explicación concuerda de

forma más lógica con los efectos que produce la GL a nivel del ciclo celular. En este contexto, las proteínas que se han encontrado asociadas al espliceosoma se detallan en la Figura 32A. Una de ellas, es la proteína RBMX (*RNA-binding motif protein encoded on the X chromosome*) que apareció 4.07 veces más inducida con GL ($p= 1.54 \times 10^{-8}$). Dado que se ha descrito que RBMX actúa como supresor de tumores (Shin y cols., 2006) y además es un regulador de la cohesión de cromátidas hermanas jugando un papel en el mantenimiento y protección centromérico (Matsunaga y cols., 2012), se investigó más en detalle. En concordancia con los datos del análisis proteómico, el estímulo con GL induce la expresión de la proteína RBMX en las células DU145 (Figura 32B). Además, el estudio cinético con GL demuestra que el aumento observado sucede a partir de las 12 horas de tratamiento con dicha molécula y se mantiene a las 24 horas, coincidiendo con la parada de ciclo celular (Figura 32C). Por tanto, los resultados expuestos en relación con RBMX indican que esta proteína podría ser la responsable, o bien, participar en los mecanismos involucrados en la parada de ciclo en G₂/M mediada por GL. El hecho de que se induzca RBMX con el tratamiento con otros quimioterápicos que también detienen el ciclo celular en G₂/M (docetaxel y nocodazole) sugiere más bien lo segundo (Figura 32D).

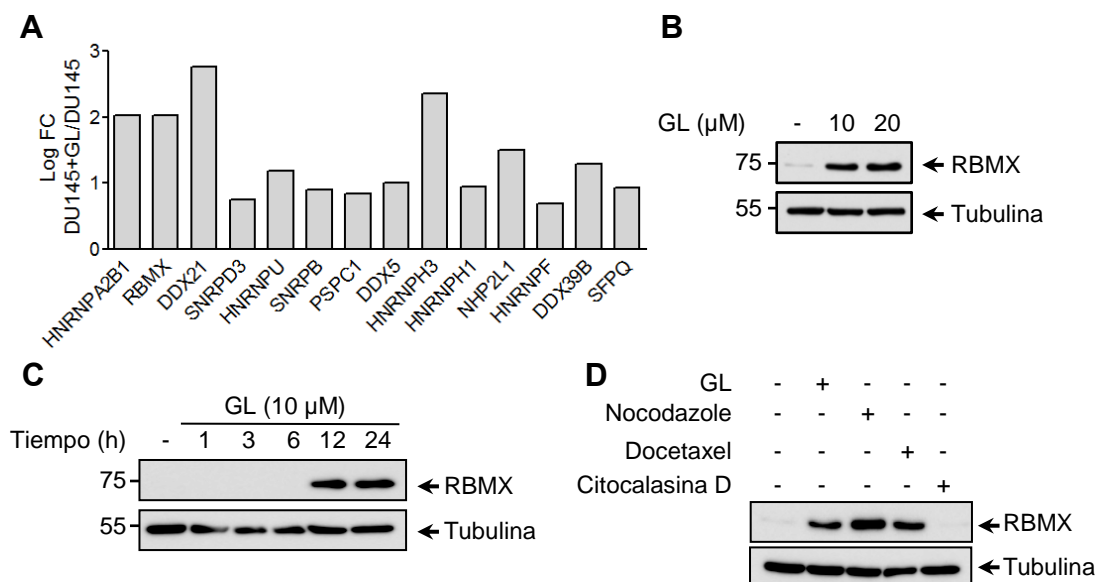


Figura 32. GL induce la expresión de RBMX y otras proteínas del espliceosoma en células DU145. A. Representación gráfica de las proteínas relacionadas con el espliceosoma con cambios de expresión significativos mediante *t-test* ($p < 0.05$), mostrando sus valores en log base 2 *fold change* resultantes del análisis proteómico comparando las células DU145 tratadas con GL respecto a las que no han recibido tratamiento. **B.** Evaluación mediante *Western blot* de los niveles de expresión de RBMX con la incubación de GL (10 y 20 μM) durante 24 horas. **C.** Cinética de la inducción de RBMX estimulando con GL 10 μM. **D.** Análisis de la expresión de RBMX con docetaxel (10 nM), nocodazole (100 ng/ml) y citocalasina D (10 μM).

Resultados

El análisis proteómico también refleja que las células DU145 tratadas con GL tienen alterada la expresión de proteínas que juegan un papel activo en el desarrollo de la división celular así como en mecanismos de reparación del ADN. Entre éstas se encuentran las siguientes con sus respectivos *fold change*: AURKA (3.52), NUSAP1 (1.75), TACC3 (1.73), HAT (-1.63), CBX1 (3.76). Además, el tratamiento con nuestro metabolito fúngico produce cambios de expresión en proteínas como COX17 (-1.85), HMOX1 (2.59), FTH1 (2.07), TXNRD1 (1.56), cuya alteración está muy asociada a estrés oxidativo y a una disfunción mitocondrial.

4.2 GL modifica la expresión de proteínas con función mitocondrial en células LNCaP

El análisis proteómico resultante de la comparación entre las células LNCaP tratadas con GL con respecto a las sin tratar (LNCaP+GL/LNCaP), detectó diferencias significativas en 165 proteínas, estando 102 inhibidas y 63 sobreexpresadas con el tratamiento con GL (p valor <0.05), mientras que dicha cifra se reduce a 12 si se aplica la corrección de Bonferroni (Figura 33A y B). El 52% y el 34% de las proteínas se localizan en el citoplasma y núcleo, respectivamente (Figura 33C). Además, el 47% de ellas no están clasificadas en ningún grupo, mientras que el 37% presenta una actividad enzimática (Figura 33D). El análisis enriquecido muestra que las proteínas cuya expresión varía en la proteómica intervienen en funciones de crecimiento y proliferación celular, movimiento celular, muerte y supervivencia celular, desarrollo celular y captura de radicales libres (Figura 33E). En LNCaP, a diferencia de lo que sucedía en DU145, el tratamiento con GL no altera proteínas con funciones relacionadas con la progresión del ciclo celular. En este sentido, las rutas de señalización más significativas corresponden a proteínas implicadas en estrés oxidativo-NRF2 (Factor de transcripción nuclear eritroide-2) y el metabolismo de xenobióticos (Figura 33F). Entre las proteínas (con sus veces de inducción) asociadas a estrés oxidativo inducidas por la vía NRF2 están HMOX1 (45.24), NQO1 (2.00), PRDX1 (1.53), FTH1 (7.02), TXNRD1 (2.19).

Es llamativo que tanto en el perfil proteómico comparativo de LNCaP+GL/LNCaP como de DU145+GL/DU145, se observa que el tratamiento con GL modifica la expresión de proteínas implicadas en la vía estrés oxidativo-NRF2. Uno de los reguladores claves de esta ruta de señalización es la proteína KEAP1 (*Kelch-like*

ECH-associated protein 1), un regulador clave de Nrf2, cuya hipermetilación de sus promotores y un *splicing* aberrante causa su pérdida de expresión en células DU145 promoviendo resistencia a las terapias y el crecimiento tumoral (Zhang y cols., 2010).

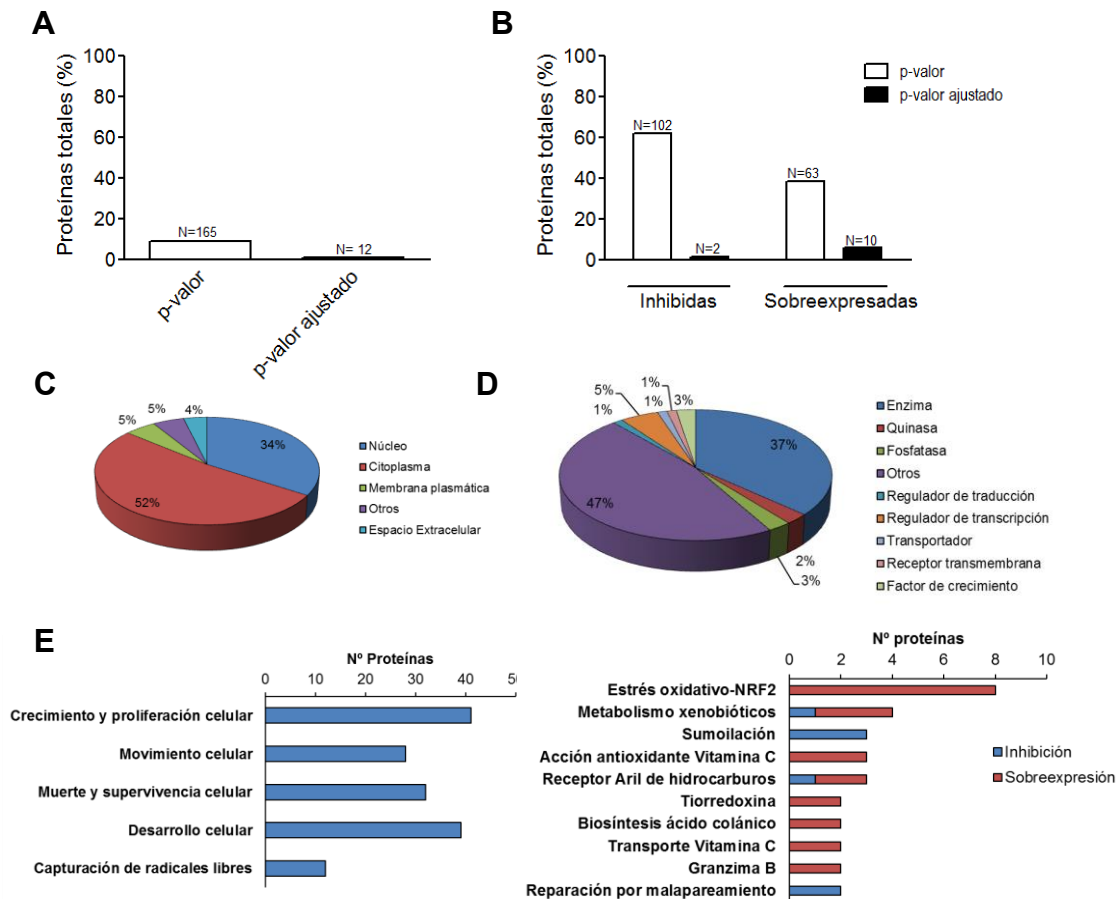


Figura 33. Análisis proteómico comparativo de LNCaP+GL/LNCaP. Las células LNCaP sin tratar y estimuladas con GL 10 μ M durante 24 horas, se lisaron para la obtención de proteínas para su posterior análisis en el espectrómetro de masas mediante LC/MS seguido de la cuantificación relativa por SWATH. **A.** Proteínas con cambios de expresión significativos mediante *t-test* y corrección de Bonferroni ($p < 0.05$). **B.** Sobreexpresión e inhibición de las proteínas con cambios de expresión. **C.** Clasificación atendiendo a su localización. **D.** Clasificación según su función. **E.** Análisis de las funciones biológicas. **F.** Análisis enriquecido de las 10 primeras rutas de señalización canónicas más significativas. Los análisis con el software IPA se llevaron a cabo con las proteínas con un $p < 0.05$ para el *t-test* y un *fold change* $\geq \pm 1.5$.

Esta fue la base para pensar que aunque en ambos análisis proteómicos aparecen proteínas relacionadas con el estrés y la vía Nrf2, quizá la falta de expresión de KEAP1 en DU145 podría ser la causante del comportamiento celular diferencial a GL que se viene observando entre ambos tipos celulares. Por ello, las células DU145 fueron infectadas con lentivirus que contienen KEAP1-HA con el objetivo de incorporar de nuevo la expresión de la proteína. Después de su selección con puromicina, se verificó que el procedimiento resultó satisfactorio al encontrarse expresión de las proteínas

Resultados

KEAP1 y HA mediante *Western blot* (Figura 34A). No obstante, la reconstitución de la expresión de KEAP1 no modificó el efecto de la GL en la apoptosis ya que no indujo cambios significativos en el porcentaje de células positivas para Anexina V (Figura 34B), ni tampoco alteró la acumulación de células en fase G₂/M como muestra el análisis del ciclo celular (Figura 34C y D). Por tanto, a la vista de estos resultados, parece que la expresión diferencial de KEAP1 en ambos tipos celulares no es responsable del comportamiento diferencial que presentan ambas células en respuesta a la GL.

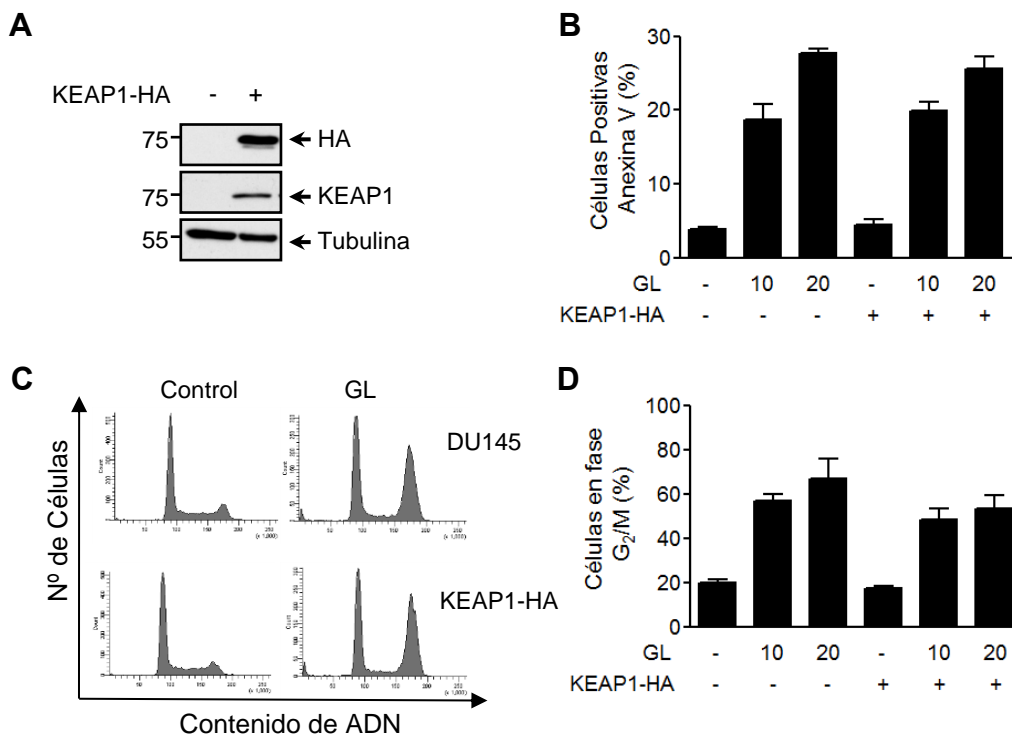


Figura 34. KEAP1 no es responsable del comportamiento diferencial entre LNCaP y DU145 frente a GL. Los experimentos se realizaron en células DU145 normales y en células resultantes de la infección con lentivirus con el plásmido KEAP1-HA adquiriendo una expresión estable de dichas proteínas. **A.** Inmunoblot con los niveles de expresión de las proteínas KEAP1 y HA. **B.** Evaluación de la muerte celular mediante citometría de flujo tras el estímulo con GL a las dosis indicadas durante 48 horas, medida como porcentaje de células positivas para Anexina V. **C y D.** Perfil del ciclo celular y representación gráfica de los porcentajes de las células acumuladas en fase G₂/M después del tratamiento con GL a las dosis indicadas durante 24 horas.

4.3 LNCaP y DU145 presentan numerosas diferencias de expresión en el perfil proteómico

Con el fin de encontrar la/s proteína/s causantes de la respuesta diferencial a GL, se realizó un análisis comparativo de ambas líneas celulares (LNCaP/DU145) sin ningún tratamiento farmacológico, para buscar diferencias de expresión inherentes a

cada una de ellas. En el análisis se encontraron un total de 1032 proteínas expresadas diferencialmente ($p < 0.05$), de las cuales 404 aparecen inhibidas y 628 sobreexpresadas en LNCaP con respecto a DU145. El número total de proteínas con cambios significativos se reduce a 224 si se aplica la corrección de Bonferroni (p -valor ajustado), teniendo en este caso 124 inhibidas y 100 sobreexpresadas (Figura 35A y B). El análisis con IPA de las proteínas significativas con veces de inducción $\geq \pm 1.5$, evidenció que la mayoría de los cambios entre ambos tipos celulares residen en proteínas con una localización citoplasmática (67%) y, funcionalmente, hay una gran heterogeneidad de grupos. Sin contar las que no están clasificadas en ningún grupo, el más numeroso fue el de las enzimas (34%), aunque también destacan proteínas transportadoras (9%), reguladoras de la transcripción (5%) y quinasas (4%) (Figura 35C y D).

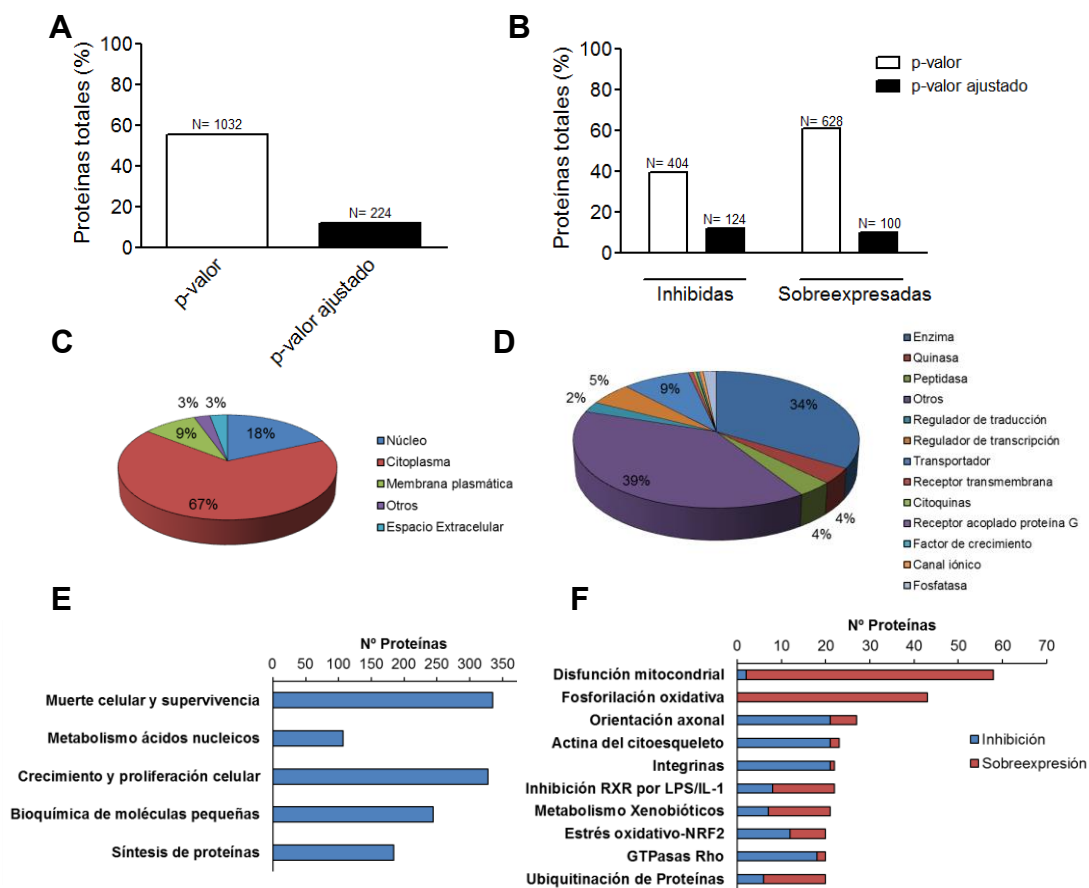


Figura 35. Análisis proteómico comparativo de LNCaP/DU145. Se obtuvieron las proteínas procedentes de las células LNCaP y DU145 y se analizaron mediante espectrometría de masas mediante LC/MS seguido de la cuantificación relativa por SWATH. **A.** Proteínas con cambios de expresión significativos mediante t -test y corrección de Bonferroni ($p < 0.05$). **B.** Sobreexpresión e inhibición de las proteínas con cambios de expresión. **C.** Clasificación atendiendo a su localización. **D.** Clasificación según su función. **E.** Análisis de las funciones biológicas. **F.** Rutas de señalización canónicas más significativas. Los análisis se llevaron a cabo usando el software IPA, de aquellas proteínas con un $p < 0.05$ para el t -test y un $fold\ change \geq \pm 1.5$.

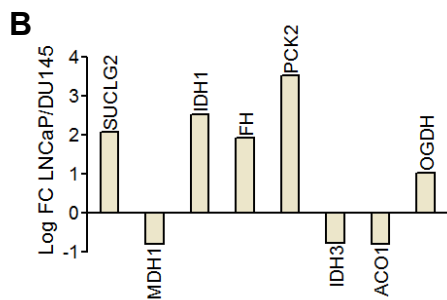
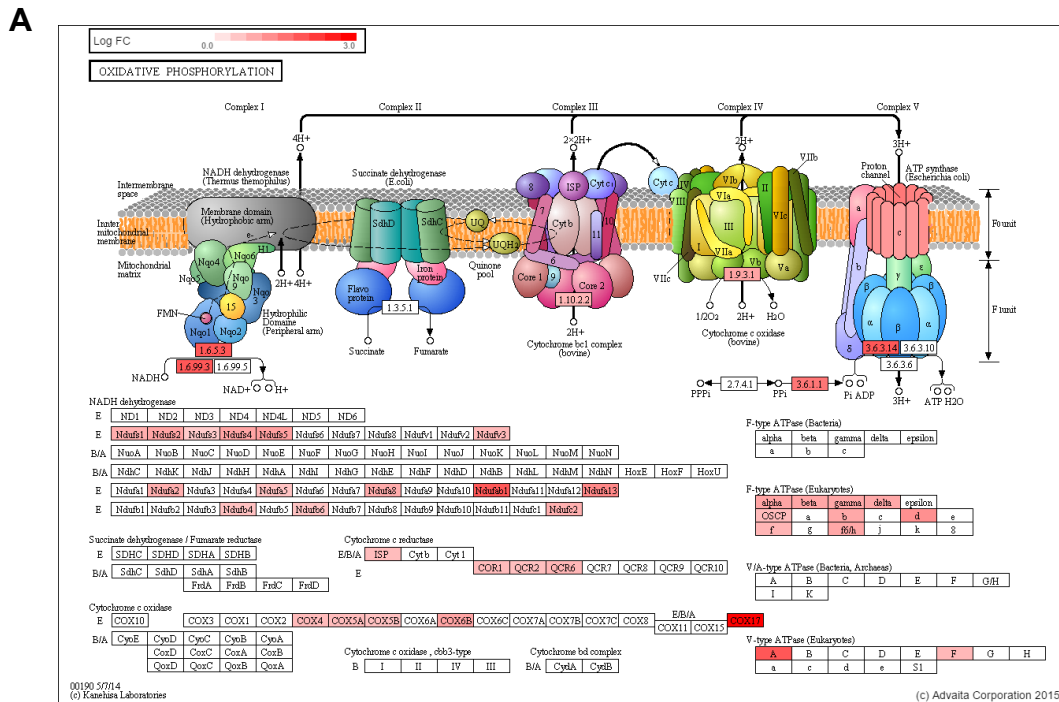


Figura 36. Diferencias resultantes del análisis proteómico comparativo de LNCaP/DU145. A. Representación esquemática de los complejos de la fosforilación oxidativa obtenida con la herramienta *Advaita Bio's iPathwayGuide*. Las proteínas que aparecen en rojo son significativas ($p < 0.05$) y reflejan una mayor expresión en LNCaP con respecto a DU145. En la parte superior izquierda aparece la escala en Log en base 2 *fold change*. **B.** Expresión diferencial de proteínas que participan en el ciclo de Krebs en ambos tipos celulares.

Los 5 primeros procesos más significativos en los que están involucrados las proteínas diferencialmente expresadas en LNCaP/DU145 son mecanismos de muerte celular y supervivencia, metabolismo de ácidos nucleicos, crecimiento y proliferación, bioquímica de pequeñas moléculas y síntesis proteica (Figura 35E). Mientras que, el análisis enriquecido para averiguar las rutas de señalización moleculares más significativas, revela que las células LNCaP presentan una sobreexpresión de numerosas proteínas implicadas en funciones mitocondriales y en la fosforilación oxidativa, proceso en el que a través de la oxidación de moléculas reducidas en la cadena respiratoria se obtiene energía en forma de ATP (Figura 35F). En relación con esto, en la Figura 36A se representa esquemáticamente los complejos integrantes de la cadena respiratoria obtenido de la herramienta de análisis *Advaita Bio's iPathwayGuide* (www.advaitabio.com/ipathwayguide), apareciendo en color rojo aquellas proteínas que se encuentran sobreexpresadas en LNCaP con respecto a DU145. Por tanto, es posible que las diferencias encontradas a nivel mitocondrial pudieran estar influyendo en el

comportamiento diferencial, al margen de proteínas ya descartadas como KEAP1. Por otro lado, también se han encontrado diferencias de expresión en enzimas que intervienen en el metabolismo, sobre todo, a nivel del ciclo de Krebs (Figura 36B).

Con el objetivo de hallar una posible proteína candidata de la respuesta diferencial a GL y teniendo en cuenta los datos del análisis proteómico de LNCaP/DU145, resultó interesante el estudio de la Ubiquitina C-terminal hidrolasa (UCHL1) puesto que, en primer lugar, se encuentra mucho más expresado en DU145, concretamente 25.99 veces más que en LNCaP, siendo esta diferencia de las más significativas que aparecen en el estudio ($p=3.18 \times 10^{-11}$). UCHL1 pertenece a la familia de enzimas encargadas de eliminar ubiquitina de sus proteínas sustrato regulando numerosos procesos biológicos. El interés de su estudio radica en que se ha encontrado la misma tendencia de expresión en estas líneas celulares en artículos previos y, mientras que en LNCaP UCHL1 ejerce un papel supresor de tumores (Ummanni y cols., 2011), en DU145 promueve la metástasis a través de la EMT (Jang y cols., 2011).

No obstante, para confirmar y validar los resultados obtenidos se procedió a la medición de los niveles de expresión para dicha proteína en los lisados celulares de LNCaP y DU145 mediante *Western blot*. Similarmente a los resultados de proteómica, los niveles de expresión detectados de UCHL1 son mucho mayores en DU145 ya que ni siquiera se detecta su expresión en LNCaP (Figura 37A). A continuación, ambos tipos celulares se estimularon con GL a las dosis indicadas durante 24 horas, sin verse modificada su expresión en ninguna de ellas (Figura 37B). El siguiente paso, fue silenciar esta proteína para comprobar si es requerida para la detención del ciclo celular en G₂/M promovida por la GL. Para ello, las células DU145 se transfectaron con una mezcla de siRNAs para UCHL1 y se empleó como control negativo el denominado siRNA *Non-target*. Transcurridas 72 horas, se observó un silenciamiento de la proteína bastante acusado (Figura 37C). Paralelamente, se realizó el mismo procedimiento experimental, con la salvedad de que además se llevó a cabo el estímulo con GL durante 24 horas seguido de la medición de la distribución de las células en el ciclo celular. Los resultados muestran que aunque hay una tendencia a la reducción de las células acumuladas en la fase G₂/M en las células tratadas con GL y silenciadas para UCHL1, no se observan diferencias significativas con respecto a los controles (células sin transfectar y transfectadas con el siRNA *Non-target*) (Figura 37D y E). Por tanto, no se

Resultados

puede concluir que UCHL1 sea necesaria para que la GL lleve a cabo su efecto a nivel de ciclo celular.

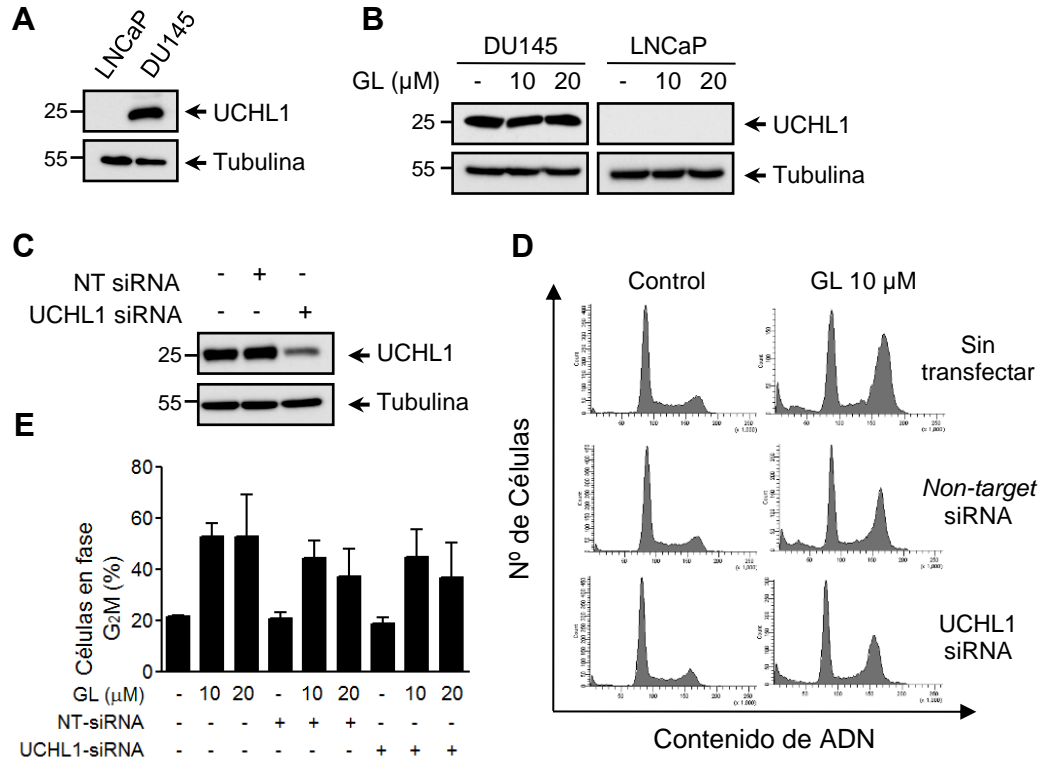


Figura 37. UCHL1 no es una proteína determinante para la detención del ciclo celular en fase G₂/M. **A.** Niveles basales de expresión de UCHL1 en las líneas de cáncer de próstata LNCaP y DU145 analizada por *Western blot*. **B.** Ambos tipos celulares se trataron durante 24 horas con GL (10 y 20 μM) y se examinó la expresión de UCHL1. **C.** Las células DU145 se silenciaron con el siRNA para UCHL1 y *Non-target* (100 nM) y sus niveles de expresión se evaluaron transcurridas 72 horas mediante inmunoblot. **D.** Silenciamiento de UCHL1, en las células DU145, seguido del estímulo con GL durante 24 horas y su posterior análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. **E.** Representación de las células acumuladas en fase G₂/M.

4.4 Las células DU145 muestran resistencia dependiente de la confluencia al tratamiento con GL

Al margen de la respuesta diferencial a GL en ambos tipos celulares de cáncer de próstata (Figura 38A), se observó que en las células DU145 la GL pierde su efecto de detener el ciclo celular en G₂/M si se permite el crecimiento celular prolongado, es decir, cuanto mayor es la confluencia en éstas. Por ejemplo, si el estímulo con GL se inicia 48 horas después de efectuar la siembra de las células, se observa una reducción muy notable de la población celular en fase G₂/M. Asimismo, si el tratamiento empieza después de 72 horas de crecimiento hasta alcanzar la confluencia, el efecto de la parada de ciclo celular se atenúa considerablemente (Figura 38B). Dicho efecto, es extensible a

lo que sucede con el tratamiento con otros anti-neoplásicos (nocodazole y docetaxel), aunque si bien es cierto, siguen manteniendo una leve acumulación de células en fase G₂/M y en el caso del docetaxel también de la apoptosis del 12.41% (Figura 38C). Este efecto es conocido como resistencia dependiente de la confluencia y se ha descrito con el uso de quimioterápicos tales como cisplatino o doxorubicina en líneas celulares de cáncer de pulmón, colon y mama (Garrido y cols., 1997; Fang y cols., 2007; Yokokura, y cols., 2016).

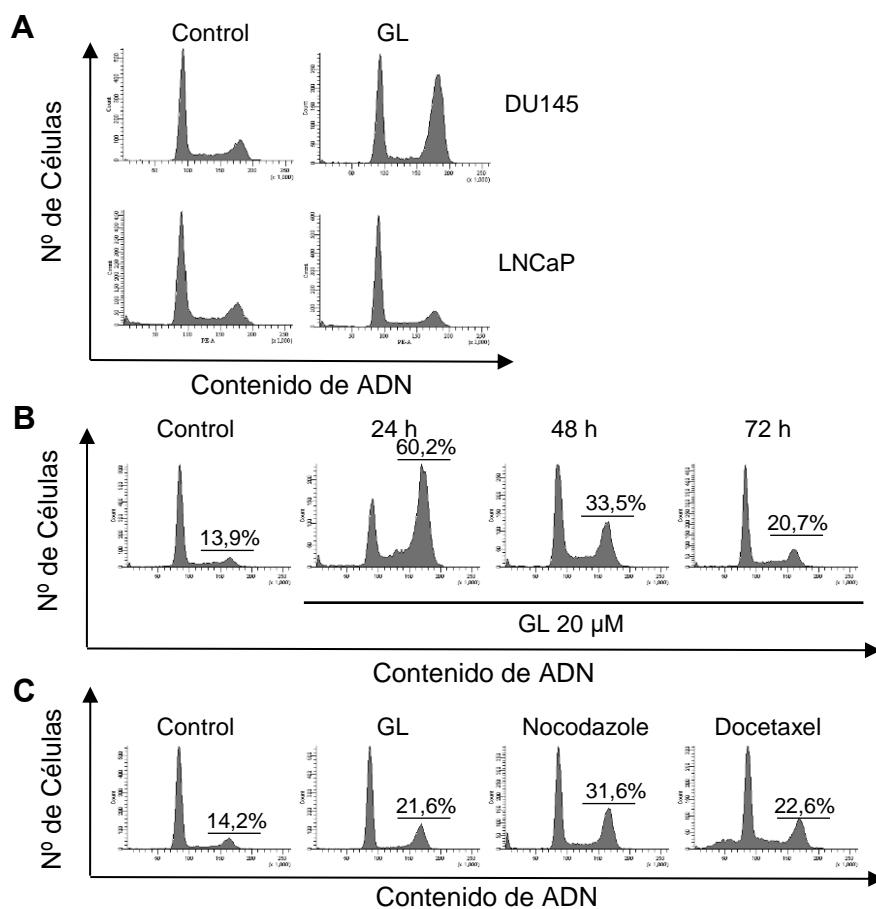


Figura 38. Efecto de resistencia dependiente de confluencia tras el tratamiento con GL. Se muestran histogramas representativos del ciclo celular obtenidos mediante la tinción con PI y su posterior análisis en el citómetro de flujo. **A.** Perfil del ciclo celular en las líneas tumorales DU145 y LNCaP estimuladas con GL 10 µM, 24 horas. **B.** Ciclo celular de las células DU145 tratadas con GL 20 µM durante 24 horas, después de 24, 48 o 72 horas de crecimiento desde su siembra. **C.** Después de 72 horas de crecimiento, las células DU145 se trataron con otros anti-neoplásicos: docetaxel (10 nM), nocodazole (100 ng/ml) y GL (20 µM) durante 24 horas y se evaluó el efecto de resistencia dependiente de confluencia.

4.5 La confluencia en las células DU145 provoca cambios en la expresión proteica

Para averiguar cómo varía el proteoma en células DU145 confluyentes, con la determinación de hallar proteínas candidatas que sean las causantes de la resistencia a

Resultados

confluencia, se llevó a cabo el análisis proteómico comparativo entre las células DU145 normales (sin alcanzar la confluencia) con respecto a las células DU145 confluyentes (DU145/DU145 en confluencia).

Los resultados obtenidos revelaron que el estado en confluencia modifica la expresión de una gran cantidad de proteínas, habiendo 1125 proteínas significativas expresadas diferencialmente entre ambas condiciones ($p < 0.05$), que disminuyen a 169 aplicando un p valor ajustado (Figura 39A). Del total de proteínas significativas, el número de proteínas inhibidas fue de 513 y 612 estaban sobreexpresadas en DU145 con respecto a su estado en confluencia (Figura 39B). El 63% de las proteínas encontradas se ubican en el citoplasma y en cuanto a su clasificación se refiere, el 39% de las proteínas no están agrupadas en ninguna clase, mientras que, un 32% correspondió a enzimas y el 8% a proteínas transportadoras (Figura 39C y D).

El análisis posterior realizado con el software IPA, reveló que las proteínas diferencialmente expresadas en la comparación normal/confluencia están relacionadas principalmente con el crecimiento y proliferación celular, síntesis de proteínas, muerte celular y supervivencia, desarrollo celular y expresión génica (Figura 39E). En cuanto a las rutas de señalización resaltan los numerosos cambios de expresión en los denominados factores de iniciación eucariotas (EIF) cuya función principal es promover el proceso de traducción. Por este motivo, se encuentra en primer lugar como la ruta más significativa, la señalización de EIF2. Además, algunos EIF se encuentran regulados por las quinasas mTOR y S6K1, apareciendo sus rutas de señalización en el análisis entre las 10 primeras (Figura 39F). La desregulación de dichas proteínas se ha asociado con patologías como el cáncer (Bhat y cols., 2015) por lo que las variaciones de expresión que se encuentran en confluencia podrían ser el resultado de un crecimiento alterado y de la resistencia a GL.

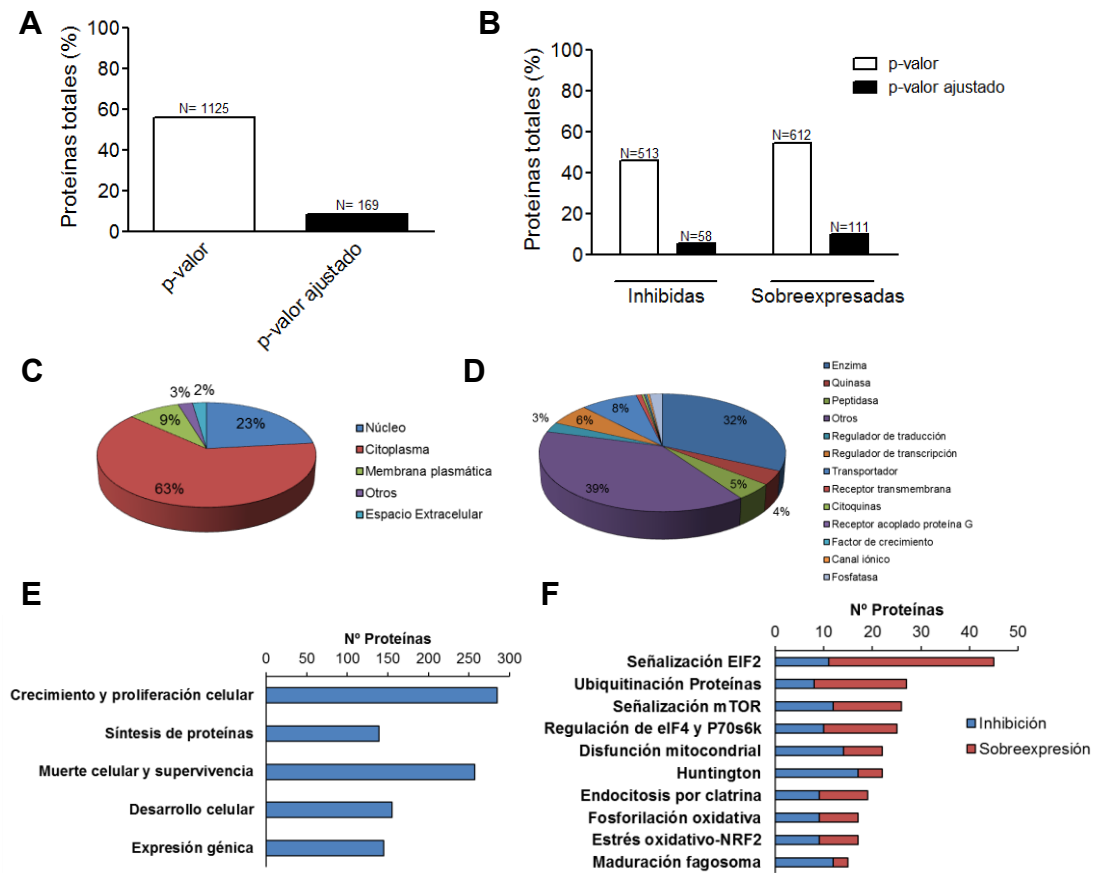


Figura 39. Análisis proteómico comparativo de DU145/DU145 en confluencia. Las células DU145 normales se recogieron a las 24 horas posteriores a su siembra, mientras que, las células confluentes se lisaron después de 96 horas desde su siembra. Una vez obtenidas las proteínas fueron analizadas mediante espectrometría de masas LC/MS seguido de la cuantificación relativa mediante SWATH. **A.** Proteínas con cambios de expresión significativos mediante *t-test* y corrección de Bonferroni ($p < 0.05$). **B.** Sobreexpresión e inhibición de las proteínas con cambios de expresión. **C.** Clasificación atendiendo a su localización. **D.** Clasificación según su función. **E.** Análisis de las funciones biológicas. **F.** Análisis enriquecido de las 10 primeras rutas de señalización canónicas más significativas. Análisis realizados exclusivamente en las proteínas con un $p < 0.05$ para el *t-test* y un *fold change* $\geq \pm 1.5$, analizados con el software IPA.

4.6 Estudio de las proteínas candidatas: ZYX, NUSAP1 y TAGLN como dianas de GL

La gran cantidad de proteínas que aparecen en los análisis proteómicos comparativos entre ambos tipos celulares de cáncer de próstata (LNCaP/DU145) y en confluencia (DU145/DU145 en confluencia) genera una gran cantidad de información global, haciendo difícil elegir cual es la proteína más apropiada para estudiar en detalle como responsable de este comportamiento diferencial a GL, a nivel de ciclo celular. Por ello, se propuso la hipótesis de que la ausencia o presencia de alguna proteína pudiera ser la responsable de la resistencia a GL en confluencia y de que no tenga ningún efecto sobre la línea celular LNCaP. De esta forma, se cruzaron los datos obtenidos en ambos análisis proteómicos (LNCaP/DU145 y DU145/DU145 en confluencia) con el objetivo

Resultados

de encontrar patrones de expresión comunes. Para ello, se realizó un diagrama de Venn comparando las proteínas con un $p < 0.05$ y un cambio de expresión $\geq \pm 1.5$ de los grupos mencionados anteriormente, dando lugar a un total de 217 proteínas comunes (Figura 40A). No obstante, se descartaron aquellas que no comparten el mismo patrón de expresión en ambos grupos, reduciéndose el número de proteínas a 66 proteínas sobreexpresadas y 62 proteínas inhibidas comunes en las células LNCaP y DU145 en confluencia con respecto a DU145.

Para restringir aún más el número de proteínas comunes a estudiar, se ha empezado con aquellas cuya expresión se reduce. Por lo que, la hipótesis que se baraja es que la GL ejerce su parada de ciclo a través de una proteína diana presente en DU145 la cual se reprime o desaparece su expresión tanto en condiciones de confluencia como en las células LNCaP. De esta manera, el análisis se centró en las 62 proteínas inhibidas, determinándose que el 45% tienen una localización citoplasmática, el 37% nuclear y el 16% se encuentran en la membrana plasmática (Figura 40B). En cuanto a su clasificación se refiere, más de la mitad de ellas no están encuadradas en ninguna clase (53%), seguido de las enzimas (19%), proteínas reguladoras de transcripción (10%) y quinasas (6%) (Figura 40D). Además, la Figura 40C muestra el análisis enriquecido con las 10 rutas de señalización celular más significativas, aunque en este caso al ser un análisis con un número de proteínas mucho menor los resultados hay que aceptarlo con más cautela. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis para ver las interacciones que existen entre las 62 proteínas comunes, siendo las proteínas CDK2, RPL14, TYMS y ZYX los nodos principales al conectar con un mayor número de proteínas (Figura 41A).

De las proteínas comunes, realizamos una selección inicial con las proteínas NUSAP1 (*Nucleolar and spindle associated protein 1*), TAGLN (Transgelin) y ZYX (Zixina) dado su estrecha asociación con cáncer. En primer lugar NUSAP1, interviene en la división celular con formación del huso mitótico y en la reparación del ADN (Raemaekers y cols., 2003; Kotian y cols., 2014). En segundo lugar, en torno a Transgelin, una proteína del citoesqueleto, hay controversia acerca de su implicación en cáncer ya que se ha descrito como promotor de la progresión tumoral y también como supresor de tumores (Assinder y cols., 2009; Wu y cols., 2014), no obstante, algunos autores indican que su expresión sensibiliza a las células a radioterapia y doxorubicina (Kim y cols., 2010). En tercer lugar, Zixina interviene en la regulación del citoesqueleto

y las adhesiones y se ha visto que interviene en funciones de motilidad celular y división en cáncer (Hirota y cols., 2000; Yamamura y cols., 2013).

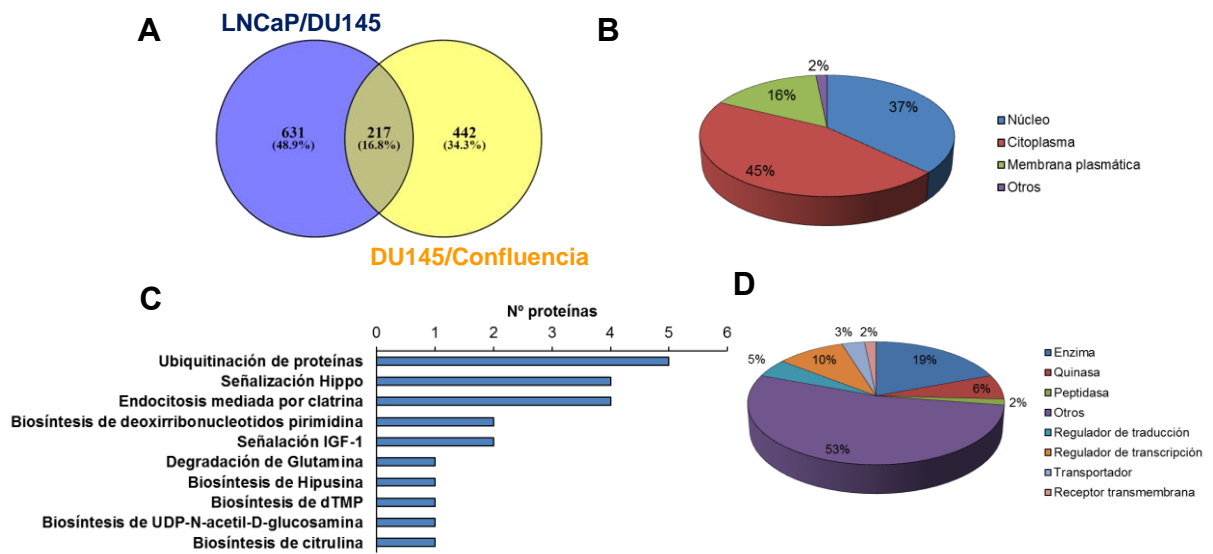


Figura 40. Proteínas en común resultantes de la comparación de los análisis proteómicos entre LNCaP/DU145 y DU145/DU145 en confluencia. **A.** Diagrama de Venn de las proteínas significativas ($p < 0.05$) con un *fold change* $\geq \pm 1.5$ de los ensayos proteómicos mencionados, empleando la herramienta Venny 2.1. De las 217 proteínas comunes, se suprimieron aquellas que no seguían la misma tendencia, y posteriormente se restringió el análisis exclusivamente a aquellas que estuvieran más expresadas en DU145 e inhibidas en LNCaP y DU145 en confluencia. **B.** Clasificación de las 62 proteínas comunes según su localización. **C.** Análisis de las rutas de señalización en las que están implicadas las proteínas comunes. **D.** Clasificación según su función. Los datos que se muestran en los apartados B, C y D se obtuvieron del análisis con el software IPA.

A continuación, se analizaron los niveles de expresión de las 3 proteínas de interés, utilizando como control negativo la proteína UCHL1 que ya se había descartado previamente y no aparece entre las proteínas comunes. Por un lado, se estudió la expresión basal de dichas proteínas en las líneas celulares de cáncer de próstata en las que se ha evaluado el efecto de la GL a nivel de ciclo celular. Los resultados muestran que, a priori, las proteínas NUSAP1, Zixina y Transgelin parecen buenos candidatos ya que, en primer lugar, en los 3 casos su expresión es mucho mayor en las células que responden a GL, DU145 y PC-3, en segundo lugar, se observan niveles de expresión menores en la línea tumoral VCaP lo que concuerda con el hecho de que la GL producía una parada de ciclo celular menos acusada en esta línea celular en comparación con las anteriores; y por último, en las 2 líneas celulares que no responden a GL, LNCaP y 22Rv1, la expresión de dichas proteínas es bastante más reducida con respecto a las otras líneas celulares. En contraste, la proteína UCHL1 solo está expresada en células DU145. Por lo que, estos experimentos además de concordar con exactitud con los

Resultados

datos de proteómica (LNCaP/DU145), también lo hacen con el resto de líneas celulares, mostrando que en aquellas donde su expresión es mayor también lo es el efecto de parada de ciclo mediada por la GL (Figura 41B).

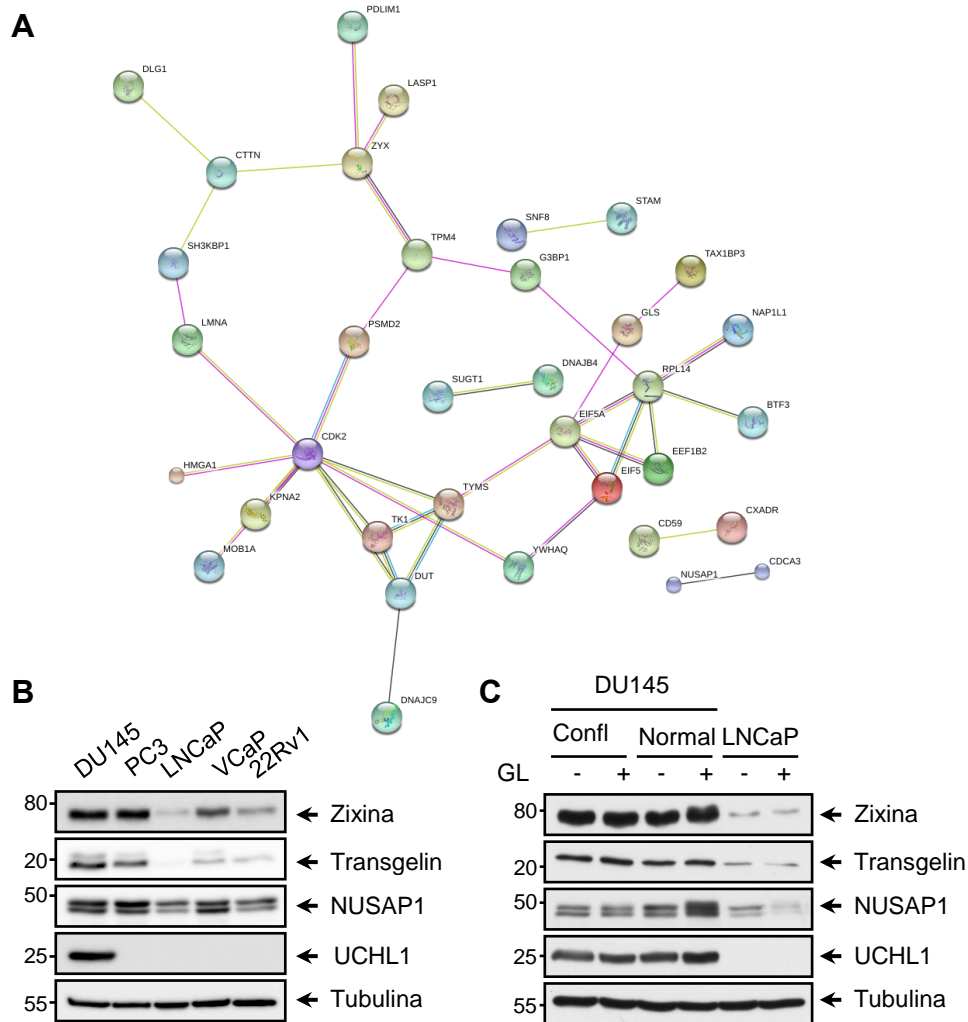


Figura 41. Proteínas candidatas como responsables de la respuesta diferencial entre DU145 y LNCaP así como el efecto de resistencia dependiente de confluencia en DU145. **A.** Interacciones entre las 62 proteínas comunes resultantes de la comparación de los análisis proteómicos de LNCaP/DU145 con respecto a DU145/DU145 en confluencia. Se utilizó la herramienta STRING versión 10.5. **B.** Niveles de expresión de las proteínas ZYX, TAGLN, NUSAP1 y UCHL1 mediante inmunoblot en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata. **C.** *Western blot* con la expresión de las proteínas mencionadas anteriormente en las líneas celulares DU145 (normal y en confluencia) y en LNCaP, en ausencia o en presencia del estímulo con GL 10 μ M durante 24 horas.

Por otro lado, se estimularon con GL durante 24 horas las células DU145 normales y en confluencia así como las células LNCaP, evaluándose los niveles de expresión de las proteínas mediante *Western blot*, observándose que la expresión de Zixina, Transgelin y NUSAP1 es mucho menor en LNCaP que en las otras condiciones y el tratamiento con GL no modifica sus niveles de expresión, con excepción de

NUSAP1 que incluso se reduce aún más. Lo mismo sucede en DU145, es decir, los niveles de dichas proteínas no se alteran con GL salvo en NUSAP1 aunque en este caso aumenta (ya comentado en el análisis proteómico de DU145+GL/DU145). Mientras que en las células confluyentes no se aprecian diferencias entre las células con o sin GL. No obstante, es importante resaltar que, a diferencia de los resultados proteómicos, no se observa una reducción en la expresión de Zixina y Transgelin en células DU145 en confluencia con respecto a las células normales. Por el contrario, en el caso de NUSAP1 sí que hay una reducción de su expresión en células en confluencia en concordancia con el análisis proteómico (Figura 41C). Por tanto, NUSAP1 cumple las primeras expectativas para ser la proteína diana de la GL y cuya disminución de la expresión provocaría la pérdida de respuesta a GL.

4.7 Estudio de las actividades de interés en los compuestos semisintéticos derivados de GL

En el desarrollo de nuevos fármacos, es común partir de una molécula origen o precursor cuya actividad biológica es conocida y modificar su estructura química dando lugar a moléculas derivadas. De esta forma, las moléculas derivadas suelen tener propiedades farmacológicas parecidas a las del precursor aunque algunas de estas modificaciones pueden mejorar la actividad, la especificidad, su administración y/o minimizar los efectos secundarios de la molécula original. Además, con las moléculas derivadas se puede averiguar cuál es la parte de la estructura (farmacóforo) que es esencial para mantener cada una de las actividades biológicas del fármaco.

Con la finalidad de encontrar compuestos con actividades mejoradas con respecto a la GL, y en colaboración con el grupo del Centro de Análisis y Síntesis de la Universidad de Lund (Suecia) que se encargó de la síntesis de 59 moléculas semisintéticas análogas de la GL, se procedió a analizar la actividad transcripcional STAT3, NF- κ B y NRF2 así como su efecto a nivel de ciclo celular.

Como resultado de estos experimentos, destacan que la mayor parte de estos compuestos derivados de GL presentan una inducción de la actividad NRF2, a excepción de las moléculas 585-1-3, 666, 10-24, 10-25 y 10-26. Por el contrario, la mayor parte de los derivados semisintéticos pierden la capacidad de inhibición de la actividad transcripcional de STAT3 debido a que su IC₅₀ es superior a 20 μ M. En contraste, los derivados de GL 658-12-15 y 585-1-3 conservan dicha actividad a dosis

Resultados

bajas. En cuanto a la actividad NF- κ B se refiere, los derivados presentan una amplia variedad en su actividad inhibitoria que va desde los que tienen su IC50 menor, como el caso de los derivados 611-6-8 y 647 (IC50<1), y por tanto mayor capacidad de inhibir la actividad transcripcional de NF- κ B; hasta los que presentan una menor actividad, como por ejemplo, las moléculas 569, 639-7-10, 650 entre otras.

Nombre del derivado GL	Actividad transcripcional			Parada ciclo celular en G ₂ /M
	STAT3	NF- κ B	NRF2	
569				-
491				-
581-1-3				-
583-10-16				+
584-4				-
585-1-3				-
590-4-6				+
591-7-11				-
592-2-3				-
597-10-15				-
599-7-10				-
600-4-6				-
601-9-14				-
602-6-10				+
603-7-10				-
605-5-9				+
609-6-9				-
610-7-10				-
607-7-10				-
608-9-14				-
606-8-12				-
611-6-8				-
612-3-4				-
627-8-14				+
633-2-3				-
623-7-12				+
626-6-11				-
628-4-5				-
629-14-20				-
632-3-5				-
631-6-8				-
635-4-6				-
636-4-7				-
637-6-8				-
638-7-10				-
616-8-14				-
615-6-9				-
622-10-14				-
614-4				-
614-9-11				+
647				-
649				-
667				+
666				+
665				-
658-12-15				+
660				+
659				-
624				-
650				+
663				-
664				+
668				+
10-19				+
10-28				+
10-27				+
10-25				-
10-26				+
10-24				-

Figura 42. Actividades transcripcionales y efecto sobre el ciclo celular de los derivados semisintéticos de GL. Para medir las actividades transcripcionales se trataron las células correspondientes con los derivados semisintéticos a las concentraciones de 1, 5, 10 y 20 μ M y tras 6 horas de incubación se midió la actividad luciferasa con el lector de placa *TriStar2 Berthold*. El IC50 se calculó a partir de los datos obtenidos de 3 experimentos independientes, utilizando el programa *GraphPad Prism v5.0*. Los datos referentes a la actividad transcripcional STAT3, NF- κ B y Nrf2 se obtuvieron testando los diferentes compuestos en las células HeLa-pTATA-TK-Luc, NIH3T3-KBF-Luc y HaCaT-pNQO1-ARE-Luc, respectivamente. La última columna hace referencia al ciclo celular que se evaluó en las células DU145 mediante citometría de flujo. Se asignó el símbolo positivo (+) cuando el porcentaje de células en fase G₂/M superó el 30% con el tratamiento con el derivado semisintético, mientras que el símbolo negativo (-) se asignó cuando no superó dicho umbral.

IC50 (μ M)
$\geq 16 > 20$
$\geq 12 \leq 16$
$\geq 8 \leq 12$
$\geq 4 \leq 8$
$0 \leq 4$

Cabe destacar que solo 18 de los derivados semisintéticos siguen conservando su capacidad de causar una parada de ciclo celular en fase G₂/M en células DU145, al considerarse como positivo un porcentaje superior al 30% de la población celular total. De las moléculas que paran el ciclo celular se puede deducir que este efecto no va asociado con las actividades transcripcionales STAT3 y NRF2 debido a que aunque hay

derivados semisintéticos de GL que acumulan las células en fase G₂/M, éstos no tienen actividad anti-STAT3 (667) ni efecto sobre NRF2 (666). Curiosamente, todos los derivados que paran el ciclo celular conservan una alta actividad anti-NF-κB, aunque ya se ha comprobado que el silenciamiento de dicho factor de transcripción no altera el ciclo celular (Figura 42).

Resultados

V. Discusión

Los pacientes con cáncer de próstata localizado tratados con prostatectomía y radioterapia muestran unas tasas de supervivencia elevadas. Sin embargo, se estima que entre el 10 y el 20% de los pacientes desarrolla CRPC a los 5 años, de los cuales el 84% muestran metástasis en el momento del diagnóstico (Kirby y cols., 2011). Para estos pacientes la primera línea de tratamiento incluye mitoxantrona, estramustina y docetaxel, aunque solo éste último mejora la supervivencia. Cuando fracasa la terapia con docetaxel, el cabazitaxel y acetato de abiraterona son utilizados como segunda línea de tratamiento (Altavilla y cols., 2012). A pesar de ello, según varios estudios, la supervivencia media de los pacientes con CRPC oscila entre los 9 y los 30 meses (Kirby y cols., 2011). Por ello, urge la necesidad de desarrollar nuevos fármacos que mejoren la calidad y expectativas de esta enfermedad.

Los productos naturales ofrecen una amplia gama de moléculas con una potencial actividad antitumoral. Numerosos estudios han puesto de manifiesto la existencia de moléculas de origen natural con capacidad de inhibir el crecimiento de células de cáncer de próstata a través de la inducción de la apoptosis y la detención del ciclo celular; entre ellas se incluyen el resveratrol, dialil disulfuro, curcumina, etc. (Arunkumar y cols., 2006; Zhang y cols., 2015; Singh y cols., 2017). En este contexto, nuestros resultados muestran que en las líneas celulares de cáncer de próstata andrógeno independientes DU145 y PC-3, el metabolito fúngico GL induce una parada de ciclo celular en fase G₂/M que comienza a las 12 horas de tratamiento y se acentúa a las 24 horas. Este efecto va acompañado de una alteración en la expresión de proteínas implicadas en su regulación, entre los que destacan el incremento de la expresión de ciclina B, p-CDK1, p-Histona H3 o la disminución de la fosfatasa CDC25C; promoviendo la inactivación del complejo ciclina B-CDK1 que es clave para la progresión del ciclo celular.

Además, en artículos previos, ya habían demostrado que la GL causa una apoptosis mediada por caspasa 3 en células de cáncer de próstata (Hellsten y cols., 2008; Hellsten y cols., 2011). En concordancia con dichos estudios, hemos corroborado que el tratamiento con el inhibidor de caspasas ZVF evitó la apoptosis producida por GL, sin embargo, no consiguió revertir la parada de ciclo celular. Similarmente, la incapacidad del ZVF para revertir la parada de ciclo celular se ha encontrado en otros estudios como es el caso de la Abieslactona, una lactona triterpenoide de origen vegetal, cuya parada de ciclo en fase G₁, sigue produciéndose a pesar del tratamiento de ZVF en

líneas celulares de hepatocarcinoma (Wang y cols., 2014). Estos resultados estarían indicando que son dos procesos independientes llevados a cabo por rutas de señalización celular diferentes, o bien, que la apoptosis es un evento más tardío a la detención del ciclo celular que se desencadena a consecuencia de la imposibilidad de reparar el daño causado por GL.

Por otra parte, la regulación de la proteína CDC25C está controlada por la ruta de señalización de la DDR mediada por las quinasas ATM/ATR-CHK1/CHK2. El tratamiento con GL induce la DDR a través de la fosforilación de la histona H2AX y la activación de la ruta de señalización de las quinasas ATM/ATR que se traduce en una rápida degradación de la proteína CDC25C en las líneas celulares de cáncer de próstata andrógeno independientes (DU145 y PC-3). Concretamente, la GL causa la fosforilación de ATM y ATR y esto, a su vez, incrementa la fosforilación de CHK1 en el residuo serina 345, sin embargo, no se observa ningún indicio en la fosforilación de CHK2 en la treonina 68. Cabe destacar que dependiendo del agente citotóxico inductor de la DDR, puede ocurrir la activación de una sola quinasa (ATM o ATR) o ambas. El etopósido (VP-16) provoca la activación de ATR (Cliby y cols., 2002), mientras que la camptotecina induce ATM o ATR dependiendo de la línea celular (Zuco y cols., 2010). Además, el uso de la cafeína como inhibidor de ATM/ATR así como el inhibidor de CHK1, UCN-01, confirma el papel que juega la GL en la activación de la ruta de señalización ATM/ATR-CHK1. Asimismo, el incremento de γ H2AX reflejado en los cortes histológicos de los xenoinjertos de células DU145 en el modelo animal evidencia la inducción de la DDR por GL.

En contraste con lo que sucede en las células sanas, una característica universal de las células tumorales es la presencia de defectos en los mecanismos implicados en la reparación del ADN, favoreciendo la inestabilidad genómica y haciéndolas más dependientes de otras vías de reparación que permanecen intactas (Esteller, 2000; Curtin, 2012). Por ello, hay que barajar la hipótesis de que la inducción de la DDR y la parada de ciclo en fase G₂/M observada en las células de cáncer de próstata tras el tratamiento con GL pudiera ser un mecanismo de defensa celular para intentar reparar el daño causado por ésta. En relación con esto, numerosos artículos ponen de manifiesto como la activación de la DDR es la causa subyacente de la resistencia a la quimioterapia, entre los que se incluyen el estudio que muestra como la sobreexpresión de CHK1 se ha relacionado con la resistencia a radio y quimioterapia en cáncer gástrico

(Bargiela-Iparraguirre y cols., 2016) o como la activación de ATR-CHK1 contribuye a la resistencia a gemcitabina y cisplatino en cáncer de vejiga (Chen y cols., 2016). Paradójicamente, la resistencia que les confiere la presencia de mecanismos de reparación defectivos también les hace más dependientes de las vías de reparación que mantienen intactas, es por eso, que se está explotando el uso de inhibidores de CHK1 combinados con radioterapia/agentes genotóxicos ya que potencian el efecto de éstos últimos (Wang y cols., 2012; Bryant y cols., 2014; McNeely y cols., 2014). De acuerdo con esta premisa, nuestros resultados muestran como el uso del inhibidor de CHK1, UCN0-1, revierte la parada de ciclo celular contrariamente a lo que ocurre con la apoptosis, en la que no logra disminuirla sino que incluso la incrementa.

La activación de la ruta ATM/ATR tiene lugar en respuesta a diversos tipos de daño al ADN, incluido las rupturas en la doble cadena de ADN. En este sentido, el ensayo cometa llevado a cabo en las células DU145 tratadas con GL ha puesto de manifiesto que no provoca dichas rupturas. Por lo que, una posible explicación podría ser que la GL activa la DDR al estar generando otro tipo de daño al ADN, similar al que ocasionan los agentes alquilantes, los cuales reaccionan con las bases nitrogenadas de los nucleótidos originando puentes inter e intracatenarios en el ADN activando la DDR. De hecho, numerosos agentes alquilantes del ADN son empleados como tratamiento frente al cáncer como es el caso de la temozolomida, carmustina y estramustina (Stupp y cols., 2005; Ravery y cols., 2011).

La ruta de señalización ATM/ATR es un potente sensor del estrés oxidativo causado por agentes endógenos o exógenos de distinta índole, entre ellos los quimioterápicos. Estos agentes causan diferentes tipos de lesiones en el ADN que desencadenan la activación de la DDR. No obstante, la GL no produjo un incremento de ROS en las células DU145 aunque, curiosamente, sus efectos a nivel del ciclo celular y apoptosis fueron bloqueados con el tratamiento con NAC. Este aminotiol es usado como antioxidante, siendo un precursor de glutatión (GSH) y de la cisteína intracelular pudiendo interactuar con proteínas que presenten residuos de este aminoácido o grupos tiol. En este contexto, un estudio reciente ha mostrado que la GL se une covalentemente a cisteínas del factor de transcripción STAT3 impidiendo su unión al ADN (Don-Doncow y cols., 2014). De esta forma, el NAC podría bloquear el sitio reactivo de la GL, por lo que no se podría excluir el estrés oxidativo como responsable de la activación de ATM/ATR mediado por la GL.

En algunos casos, la parada de ciclo celular después del tratamiento con docetaxel, nocodazole o citocalasina D va asociada con una desorganización del citoesqueleto a nivel de la actina y tubulina, respectivamente (Nehme y cols., 2001; Endo y cols., 2010; Heng y Koh, 2010). Los agentes que desestabilizan la dinámica de los microtúbulos inhiben la progresión de la mitosis, desencadenando la muerte celular. Un estudio reciente ha propuesto que la acumulación de células en fase G₂/M originada por agentes que interfieren en los microtúbulos, como el paclitaxel o vincristina, sería causado por la interrupción del tráfico intracelular de proteínas reparadoras del daño al ADN (ATM, ATR, DNA-PK, Rad50, Mre11, p95/NBS1, p53, 53BP1 y p63) (Poruchynsky y cols., 2015). Además, el tratamiento combinado de estos fármacos junto con radiación o con quimioterápicos inductores de daño en el ADN (etopósido o doxorubicina) resulta en un incremento en cuanto a la duración así como la expresión de γ H2AX en células A549 y MCF-7. De esta manera, el uso combinado de los agentes cuya diana son los microtúbulos junto con fármacos genotóxicos, mejoran los efectos de los mismos en comparación con su uso de forma individual (Poruchynsky y cols., 2015). En nuestros experimentos, se aprecia como el tratamiento con GL provoca una alteración temprana de los microtúbulos en las células DU145 que podría estar obstaculizando el transporte de proteínas implicadas en el proceso de reparación, promoviendo la parada de ciclo en fase G₂/M y la apoptosis.

Los factores de transcripción STAT3 y NF- κ B están implicados en procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, controlando la progresión del ciclo celular y ejerciendo un papel importante en la carcinogénesis así como en la progresión del cáncer (Grivennikov y Karin, 2010). Además, se ha descrito que su activación constitutiva contribuye a la quimioresistencia en múltiples tumores (Li y Sethi, 2010; Yin y cols., 2012; Han y cols., 2013). Por este motivo, la administración de inhibidores de dichos factores de transcripción administrados en combinación con fármacos citostáticos favorecería la actividad citotóxica y proapoptótica de estos últimos (Arlt y cols., 2001; Alas y Bonavida, 2003). Sin embargo aún no existen inhibidores de STAT3 y NF- κ B comercializados como fármacos antitumorales.

Previamente se había descrito que la GL es un inhibidor de STAT3 y NF- κ B y esto concuerda con nuestros resultados, ya que hemos observado la capacidad del metabolito fúngico de inhibir la actividad transcripcional de ambos. Sin embargo, la

implicación de STAT3 y NF-κB en la parada de ciclo celular en fase G₂/M causada por GL, es la primera vez que se investiga.

Ambos factores de transcripción interfieren en los mecanismos de reparación del ADN. Por un lado, se ha demostrado que la infección con el virus de Epstein-Barr (EBV) induce la activación de STAT3, suprimiendo la DDR debido al bloqueo de la señalización de ATR-CHEK1 (Koganti y cols., 2014). Además, STAT3 es requerido para una reparación eficiente del daño al ADN por radiación ultravioleta B y las células deficientes para STAT3 son más sensibles al daño al ADN, mostrando una actividad reducida de la ruta de señalización ATM-CHEK1 (Barry y cols., 2010). Por otro lado, las radiaciones ionizantes y los agentes citotóxicos que causan dobles rupturas en las hebras de ADN requieren la activación de NF-κB para promover la reparación del ADN (Habraken y Piette, 2006). A pesar de la implicación de estos factores de transcripción en la DDR y en el control del ciclo celular, la parada de ciclo celular llevada a cabo por la GL a consecuencia de la activación de la DDR en las células DU145, es independiente de los factores de transcripción STAT3 y NF-κB puesto que su silenciamiento no modifica la actividad de esta molécula. Además, la ausencia de expresión de STAT3 en las células PC-3 supone otra evidencia a favor de que esta proteína no contribuye en el efecto a nivel del ciclo celular de la GL, al ser una línea celular que responde a la GL con parada de ciclo. Sin embargo nuestros ensayos muestran que hay una reducción en la capacidad de migración y de crecimiento *in vitro* gracias a la inhibición de dichos factores de transcripción ya sea a través del tratamiento farmacológico con GL, o bien, con el silenciamiento mediante shARN. Del mismo modo, también observamos una reducción del crecimiento del tumor *in vivo*. Por consiguiente, aun no estando directamente implicados STAT3 y NF-κB en la progresión del ciclo celular, la actividad de la GL sobre ambos factores de transcripción es un valor añadido a la actividad antitumoral de este metabolito fúngico.

La presencia de mutaciones en la proteína p53 en las líneas celulares de cáncer de próstata respondedoras a GL (van Bokhoven y cols., 2003), junto con el papel relevante que desempeña en el control de la división celular, le confirió inicialmente un especial interés por su posible implicación en la parada de ciclo celular tras el tratamiento con GL. No obstante, hemos comprobado que la reconstitución de la expresión de p53 en células PC-3 no afecta a la acumulación de células en fase G₂/M tras el estímulo con GL. En concordancia con estos resultados, los experimentos

llevados a cabo en líneas celulares con p53 con un estatus silvestre (*wild type*) demostraron que tras la administración de GL se observa una acumulación de células en la fase G₂/M en la línea celular SK-N-SH, en contraste con las células HeLa y A549 las cuales no se ven afectadas. Tomando en conjunto los resultados de estos experimentos, se corrobora que la GL puede detener el ciclo celular de una manera independiente de p53.

La mayor parte de los efectos antitumorales de la GL se han observado en células de cáncer de próstata andrógeno independientes (DU145 y PC-3), lo que induce a pensar en el papel prometedor que puede tener esta molécula como tratamiento frente al CRPC. No obstante, el efecto sobre el ciclo celular también se produce en otras líneas celulares tumorales de cáncer de mama, pulmón, colon y leucemia, sugiriendo que el mecanismo molecular que desencadena dicho efecto es común y extensible a otros tipos de cáncer. De hecho, el uso del mismo fármaco quimioterapéutico como tratamiento para diferentes tipos de tumor es común en clínica, por ejemplo el cisplatino es eficaz frente al cáncer de vejiga y de ovario (Henkels y Turchi, 1999; Konstantakou y cols.); mientras que el docetaxel, a parte de su uso en cáncer de próstata, también induce la muerte de células tumorales de mama o se emplea como tratamiento del cáncer de pulmón (Georgoulas, 2002; Morse y cols., 2005).

A pesar de su baja especificidad por un tipo celular tumoral concreto, un punto a favor de la GL es su aparente inocuidad en células no tumorales. En este sentido, el tratamiento con GL no alteró el ciclo celular en fibroblastos dérmicos ni en células epiteliales de próstata no tumorales y además sus efectos adversos en células hMSC son menores con respecto al que ocasionan otros anti-neoplásicos. Por tanto, esta molécula presenta una actividad mielosupresora y toxicidad reducida en células no tumorales *in vitro* y, a priori, supone una clara ventaja frente a la mayoría de fármacos empleados en quimioterapia, los cuales son generalmente mielotóxicos.

Una de las grandes incógnitas de los resultados obtenidos en la presente tesis es por qué las líneas celulares de cáncer de próstata tienen un comportamiento distinto frente al tratamiento con GL. Mientras que las células DU145, PC-3 y VCaP responden a GL, las células 22Rv1 y sobre todo la línea celular LNCaP no sufren cambios significativos en cuanto a su ciclo celular, apoptosis y viabilidad celular se refiere. A consecuencia de estos resultados se llevaron a cabo una combinación de ensayos

proteómicos con una línea celular representante de cada grupo (DU145 y LNCaP) con y sin tratamiento con GL, para intentar dilucidar proteínas candidatas que expliquen la respuesta diferencial a GL.

Del primer análisis proteómico se observó que el tratamiento con GL en las células DU145 modificó la expresión de proteínas implicadas en la división celular, sugiriendo que se hayan producido como consecuencia de la retención de las células en fase G₂/M. Entre ellas destaca la inducción de una proteína clave en este proceso, AURKA, cuyos niveles de expresión más altos se producen durante el final de la fase G₂ y el comienzo de la mitosis (Seki y cols., 2008), lo que coincide con nuestros análisis de citometría de flujo en los que se ve incrementada de forma notable el número de células en esta fase debido al tratamiento con GL. Además, por un lado, AURKA activa a otra proteína que está implicada en numerosas funciones a nivel de la división celular, PLK1 (Macurek y cols., 2009), cuyos niveles de expresión aumentaron con el estímulo con GL como observamos por *Western blot*. Por otro lado, AURKA también está correlacionada con la proteína TACC3, encargada de estabilizar los microtúbulos al centrosoma durante la mitosis (Kinoshita y cols., 2005), siendo otra de las proteínas incrementadas y detectadas en el ensayo proteómico. Además, el análisis proteómico demostró que la proteína YAP1 disminuye su expresión en células tratadas con GL. En relación con esto, se ha descrito como AURKA puede fosforilar LAST1/2, proteína perteneciente a la ruta de señalización *Hippo*, que regula el *checkpoint* G₂/M y además inactiva la proteína YAP1 (Toji y cols., 2004; Meng y cols., 2016). También NUSAP1 se encontró sobreexpresada por la acción de la GL, interviniendo en la formación del huso mitótico y también muestra un pico de expresión en la transición de la fase G₂ a mitosis (Raemaekers y cols., 2003). El tratamiento con GL produjo la disminución de HAT1 cuyo silenciamiento se ha asociado a una detención del ciclo celular en fase G₂/M (Xue y cols., 2014).

A priori, estos resultados en células DU145 estimuladas con GL parecen indicar que el aumento de la expresión de las proteínas mencionadas anteriormente, se debe a la parada de ciclo celular, aunque también hay que valorar que la sobreexpresión de estas proteínas se ha asociado con una progresión de la enfermedad (Iyer y cols., 2011; Nikonova y cols., 2013). En este sentido, se ha encontrado como la sobreexpresión de AURKA anula el *checkpoint* que controla la correcta formación del huso mitótico y causa resistencia a la apoptosis inducida por taxol (Anand y cols., 2003) o como induce

una desregulación de genes implicados en la DDR (Veerakumarasivam y cols., 2008). También la inhibición de NUSAP1 suprime la proliferación y mejora el efecto antitumoral del paclitaxel (Okamoto y cols., 2015). Por el contrario, la disminución causada por GL en otras proteínas relacionadas con el ciclo celular muestran una acción antitumoral, en este contexto, hay artículos que refrendan como la inhibición de la expresión de las proteínas HAT1 y YAP1 bloquean la progresión del cáncer (Zhao y cols., 2007; Gajer y cols., 2015; Sheng y cols., 2015).

Es interesante destacar que nuestros resultados muestran un incremento de la expresión de proteínas asociadas al espliceosoma tras el tratamiento con GL en células DU145. Recientemente, se ha propuesto la inhibición del esplicesoma como terapia frente al cáncer (van Alphen y cols., 2009). Cabe la posibilidad que fuese una forma de potenciación de este proceso para generar un *splicing* alternativo de proteínas como mecanismo de defensa en respuesta a GL con el objetivo de continuar proliferando. Sin embargo, se requiere un estudio más detallado sobre el papel exacto que juegan estas proteínas dada su implicación en otras funciones nucleares. Una de estas proteínas es RBMX, la cual presenta una clara inducción por GL. Su implicación en el mantenimiento de la cohesión de cromátidas hermanas durante la división celular y su reclutamiento hacia los sitios dañados en el ADN, junto con la inducción de la expresión que se ha observado tras la administración con nocodazole y docetaxel, hace pensar que es una proteína que participa en la detención del ciclo celular e inducción de la DDR más que ser una diana específica de GL.

El segundo análisis proteómico llevado a cabo en las células LNCaP reflejó que el tratamiento con GL indujo la expresión de una gran cantidad de proteínas relacionadas con la vía NRF2, algunas de ellas también se han observado en las células DU145 tratadas con esta molécula. A diferencia de LNCaP, se ha descrito que las células DU145 no expresan la proteína KEAP1, uno de los reguladores claves de NRF2 (Zhang y cols., 2010). No obstante, los experimentos realizados han evidenciado que la restauración de la expresión de KEAP1 en células DU145 no modifica la actividad de GL sobre el ciclo celular. Es llamativo que en células sanas la expresión de proteínas dependientes de NRF2 es esencial para protegerlas frente agentes carcinógenos y mantener la homeostasis celular. Por el contrario, en determinadas células tumorales NRF2 está sobreexpresada y supone una ventaja para su supervivencia, crecimiento y resistencia a la quimioterapia (Lau y cols., 2008). Curiosamente, una respuesta mayor

de la inducción de NRF2 y de sus genes dependientes se ha observado en DU145 con respecto a las células PC-3, haciendo que tenga menos sensibilidad a la radioterapia (Jayakumar y cols., 2014). Por tanto, no es descartable que la respuesta diferencial a GL entre LNCaP y DU145 se deba a una inducción mayor de la vía NRF2, aunque sería paradójico ya que precisamente la línea celular DU145 es la que tiene una respuesta y activación mayor de NRF2 (Zhang y cols., 2010; Pettazzoni y cols., 2011).

El análisis comparativo entre DU145 y LNCaP ha mostrado un amplio abanico de proteínas expresadas desigualmente, entre las que destacan las numerosas diferencias de proteínas mitocondriales que ponen de manifiesto la importancia que puede tener este orgánulo en el comportamiento frente a GL. Por otro lado, aunque se comprobó la ineficacia del silenciamiento de UCHL1 para modificar el comportamiento de GL a nivel de ciclo celular, inicialmente, se optó por su estudio debido a que la misma tendencia de expresión que obtuvimos en los resultados de proteómica fue encontrada por otros autores y además, el que desempeñara funciones antagónicas tales como supresor de tumores en LNCaP y promotor de la metástasis en DU145 supuso que fuera una posible diana potencial a GL (Jang y cols., 2011; Ummanni y cols., 2011). Además, análisis posteriores no detectaron niveles de expresión de UCHL1 en otras líneas celulares respondedoras a GL (PC-3 y VCaP), descartando definitivamente a esta proteína como la diana de molecular de la GL.

Otro hecho destacable observado fue la resistencia a GL dependiente de confluencia en células DU145, describiéndose el mismo efecto en la bibliografía frente a otros fármacos empleados en quimioterapia (Fang y cols., 2007; Yokokura y cols., 2016), incluso hemos comprobado que también sucede en células DU145 confluentes en respuesta a docetaxel y nocodazole. El análisis de proteómica reveló una variación de la expresión proteica más amplia de lo esperado, englobándose en rutas de señalización como la de EIF2 cuya desregulación está asociada al cáncer (Bhat y cols., 2015). Se ha visto que la sobreexpresión de la proteína HSP27 en células de cáncer de colón es la responsable de la resistencia dependiente de confluencia a cisplatino y doxorubicina (Garrido y cols., 1997). En nuestro ensayo comparativo proteómico apareció HSP27 como significativa, sin embargo la tendencia de la expresión fue justo la contraria, es decir, estaba más sobreexpresada en las células DU145 sin confluencia (1.25 veces). Por ello, dada la poca consistencia de la participación de esta proteína en nuestros resultados se descartó investigar en profundidad su implicación.

Por último, estuvimos interesados en estudiar la posibilidad de que los cambios en el proteoma inducidos en las células DU145 crecidas en condiciones confluencia (resistencia a GL) y de LNCaP (no respuesta a GL) podrían orientarnos a identificar la(s) proteína(s) responsable de la respuesta a GL observada en las células DU145 en crecimiento exponencial. Así, cotejando los resultados de ambos análisis observamos un patrón de expresión de 128 proteínas que podría cuadrar con al menos tres posibilidades. La primera es que la falta de respuesta a GL en células confluentes y LNCaP se debiera a rutas de señalización completamente distintas; la segunda posibilidad es que la sobreexpresión de determinadas proteínas comunes en LNCaP y DU145 en confluencia con respecto a DU145 sean las responsables de la respuesta diferencial a GL, tratándose de un mecanismo de resistencia desarrollado por la célula, y por último sería también posible que proteínas expresadas en DU145 en crecimiento exponencial se encontraran reprimidas en condiciones de confluencia y no expresadas en LNCaP (62 proteínas). Esta última posibilidad fue la más atractiva de investigar ya que se podría identificar la proteína candidata a ser la diana terapéutica de la GL y cuya inhibición, o falta de expresión, haría que la célula perdiera su capacidad de parar el ciclo celular en respuesta a GL.

Inicialmente del grupo de 62 proteínas fueron seleccionadas ZYX, NUSAP1 y TAGLN por su implicación en la división celular y el cáncer (Iyer y cols., 2011; Yamamura y cols., 2013; Wu y cols., 2014). Su estudio por *Western blot* en las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata validó nuestro ensayo proteómico al encontrarse resultados similares y además su expresión fue mayor en las líneas celulares que responden a GL. Sin embargo, en las células DU145 en confluencia solo NUSAP1 disminuyó con respecto a las células en condiciones de crecimiento normal, por lo que las proteínas ZYX y TAGLN no parecen apoyar nuestra hipótesis, al menos, en cuanto a su papel en la resistencia dependiente de confluencia se refiere. En definitiva, a la vista de los resultados de proteómica e inmunoblot, creemos que la proteína NUSAP1 es la proteína candidata más idónea para ser diana de la GL en células DU145 y la disminución de su expresión podría ser responsable de la respuesta diferencial entre las diferentes líneas celulares así como de la resistencia observada en confluencia en células DU145. Necesitaremos completar estos estudios en un futuro para confirmar esta hipótesis.

Con respecto al análisis metabólicomico llevado a cabo en el plasma de ratones xenoinjertados con células de cáncer de próstata, se encontraron 25 metabolitos con cambios significativos de expresión en presencia del tumor. Si bien es cierto, al ser un experimento con un número de individuos muy limitado ($n=5$, por grupo) se requieren estudios adicionales para poder confirmar si alguno de éstos tienen valor como biomarcador. A pesar de esto, sí hemos observado correlaciones interesantes en metabolitos como la serotonina y colina. En el primer caso, la serotonina es un metabolito que promueve la proliferación y migración en células DU145 y PC-3 y cuyos receptores están sobreexpresados en dichas células de cáncer de próstata (Dizeyi y cols., 2004; Dizeyi y cols., 2011). En el caso de la colina, hay documentado altos niveles de expresión en muestras de tejido de cáncer de próstata que se han relacionado con una mayor agresividad así como un incremento de sus transportadores en células de cáncer de próstata (Muller y cols., 2009; Glunde y cols., 2011, Keshari y cols., 2011). Nuestros resultados mostraron bajos niveles de serotonina y colina en plasma de ratones con xenoinjertos de células DU145 que se atribuyó a un posible incremento de su captación por las células tumorales. En ambos casos, el tratamiento con GL consiguió contrarrestar los bajos niveles plasmáticos de los metabolitos mencionados, pudiendo ser positivo para impedir la progresión de la enfermedad y ser unos buenos marcadores de respuesta al tratamiento con GL.

Por otra parte, como aproximación para identificar los farmacóforos de la GL responsables de sus diferentes actividades biológicas, se sintetizaron 59 análogos de dicha molécula. De ellos, se han encontrado 18 moléculas que mantienen el efecto de parar el ciclo celular en G_2/M . Tras la evaluación de las otras actividades biológicas restantes, la molécula 658-12-15, con un radical cloro-benzimidazol, es la que mostró una fuerte inhibición de la actividad transcripcional STAT3, NF- κ B y aumento de NRF2 puesto que su IC₅₀/EC₅₀ para dichas actividades se produce a concentraciones sensiblemente más bajas que las de GL, y además, continúa parando el ciclo celular. Algunos derivados de benzimidazol exhiben propiedades antitumorales al bloquear la actividad de HER2 y EGFR en células de cáncer de mama o actividad citotóxica en células de melanoma (Błaszczak-Swiatkiewicz y cols., 2012; Chu y cols., 2015), por lo que no es de extrañar que esta variación potencie los efectos de la GL. Además, es posible que algunos análogos puedan mejorar las propiedades farmacocinéticas de la GL como es el caso del profármaco de la GL, GPA512, cuya administración incrementa

Discusión

su absorción y niveles en plasma con respecto a GL (Escobar y cols., 2016). Actualmente estamos realizando un estudio más detallado de estructura-función para proceder a la síntesis de análogos aún más potentes y selectivos.

En la presente tesis, al margen de dilucidar los mecanismos responsables de la respuesta diferencial a GL entre las diferentes líneas celulares de cáncer de próstata y en condiciones de confluencia, mostramos un nuevo mecanismo de acción de dicha molécula en la ruta de señalización de DDR asociado a su actividad antitumoral en cáncer de próstata. Concretamente, la GL induce la vía de señalización ATM/ATR-CHK1 causando una parada de ciclo celular en fase G₂/M y apoptosis, además de inhibir el crecimiento tumoral en modelos animales (Figura 43). Estos hallazgos sugieren que la GL podría ser un agente antitumoral prometedor para su aplicación individual o en combinación con otros fármacos para el tratamiento del CRPC y quizá para otros tumores.

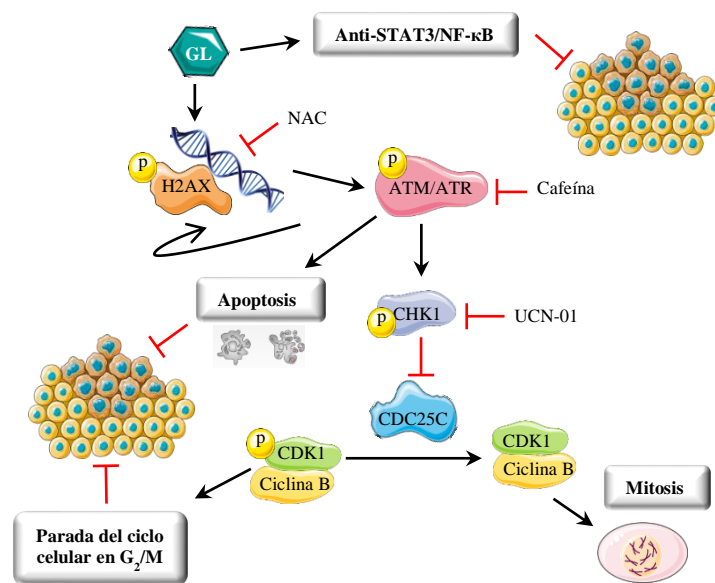


Figura 43. Esquema representativo del mecanismo de acción antitumoral ejercido por GL en CRPC

Discusión

VI. Conclusiones

1. La GL promueve la apoptosis mediada por caspasa 3, desestabiliza los microtúbulos del citoesqueleto e impide la progresión del ciclo celular en fase G₂/M en células DU145, coincidiendo con la alteración de la expresión de proteínas reguladoras de dicha fase.
2. La acumulación de células en fase G₂/M tras el tratamiento con GL ocurre en diferentes líneas celulares tumorales, siendo muy acentuada en las células de cáncer de próstata independientes de andrógenos. Por el contrario, no parece afectar a células no tumorales ni a células mesenquimales de médula ósea.
3. La GL es capaz de bloquear la transcripción promovida por STAT3 y NF-κB disminuyendo la proliferación de células DU145. Sin embargo, dichos factores de transcripción no son necesarios para la inducción de la parada del ciclo celular en fase G₂/M.
4. La estimulación con GL activa la DDR, mediada por la ruta de señalización ATM/ATR-CHK1 en los modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de próstata, y es responsable de la parada de ciclo celular y de la apoptosis promovida por ésta.
5. El crecimiento del tumor y la alteración del perfil metabólico en ratones xenoinjertados con células DU145 es atenuado con el tratamiento con GL.
6. El cambio de expresión proteico reflejado en los análisis proteómicos, podría explicar la respuesta diferencial a GL entre las células LNCaP (no respondedora) y DU145 (respondedora), así como la resistencia dependiente de confluencia observada en ésta última.
7. Como conclusión final, los resultados expuestos en la presente tesis sugieren, que dadas las actividades antitumorales que posee la GL, es una molécula prometedora para el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración.

VII. Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

Abbas, T. and A. Dutta (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9(6): 400-414.

Abdulghani, J., L. Gu, A. Dagvadorj, J. Lutz, B. Leiby, G. Bonuccelli, M. P. Lisanti, T. Zellweger, K. Alanen, T. Mirtti, T. Visakorpi, L. Bubendorf and M. T. Nevalainen (2008). Stat3 promotes metastatic progression of prostate cancer. *Am J Pathol* 172(6): 1717-1728.

Abukhdeir, A. M. and B. H. Park (2008). P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 10: e19.

Agoulnik, I. U., A. Vaid, W. E. Bingman, 3rd, H. Erdeme, A. Frolov, C. L. Smith, G. Ayala, M. M. Ittmann and N. L. Weigel (2005). Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. *Cancer Res* 65(17): 7959-7967.

Akira, S., Y. Nishio, M. Inoue, X. J. Wang, S. Wei, T. Matsusaka, K. Yoshida, T. Sudo, M. Naruto and T. Kishimoto (1994). Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77(1): 63-71.

Alaiya, A. A., M. Al-Mohanna, M. Aslam, Z. Shinwari, L. Al-Mansouri, M. Al-Rodayan, M. Al-Eid, I. Ahmad, K. Hanash, A. Tulbah, A. Bin Mahfooz and C. Adra (2011). Proteomics-based signature for human benign prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Int J Oncol* 38(4): 1047-1057.

Alas, S. and B. Bonavida (2003). Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res* 9(1): 316-326.

Altavilla, A., R. Iacovelli, G. Procopio, D. Alesini, E. Risi, G. M. Campenni, A. Palazzo and E. Cortesi (2012). Medical strategies for treatment of castration resistant prostate cancer (CRPC) docetaxel resistant. *Cancer Biol Ther* 13(11): 1001-1008.

Anand, S., S. Penrhyn-Lowe and A. R. Venkitaraman (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3(1): 51-62.

Arlt, A., J. Vorndamm, M. Breitenbroich, U. R. Folsch, H. Kalthoff, W. E. Schmidt and H. Schafer (2001). Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 20(7): 859-868.

Armandari, I., A. R. Hamid, G. Verhaegh and J. Schalken (2014). Intratumoral steroidogenesis in castration-resistant prostate cancer: a target for therapy. *Prostate Int* 2(3): 105-113.

Arunkumar, A., M. R. Vijayababu, N. Srinivasan, M. M. Aruldas and J. Arunakaran (2006). Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Mol Cell Biochem* 288(1-2): 107-113.

Referencias bibliográficas

- Assinder, S. J., J. A. Stanton and P. D. Prasad (2009). Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor. *Int J Biochem Cell Biol* 41(3): 482-486.
- Awwad, H. M., J. Geisel and R. Obeid (2012). The role of choline in prostate cancer. *Clin Biochem* 45(18): 1548-1553.
- Azare, J., K. Leslie, H. Al-Ahmadie, W. Gerald, P. H. Weinreb, S. M. Violette and J. Bromberg (2007). Constitutively activated Stat3 induces tumorigenesis and enhances cell motility of prostate epithelial cells through integrin beta 6. *Mol Cell Biol* 27(12): 4444-4453.
- Bargiela-Iparraguirre, J., L. Prado-Marchal, M. Fernandez-Fuente, A. Gutierrez-Gonzalez, J. Moreno-Rubio, M. Munoz-Fernandez, M. Sereno, R. Sanchez-Prieto, R. Perona and I. Sanchez-Perez (2016). CHK1 expression in Gastric Cancer is modulated by p53 and RB1/E2F1: implications in chemo/radiotherapy response. *Sci Rep* 6: 21519.
- Barnum, K. J. and M. J. O'Connell (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol* 1170: 29-40.
- Barry, S. P., P. A. Townsend, R. A. Knight, T. M. Scarabelli, D. S. Latchman and A. Stephanou (2010). STAT3 modulates the DNA damage response pathway. *Int J Exp Pathol* 91(6): 506-514.
- Barton, B. E., J. G. Karras, T. F. Murphy, A. Barton and H. F. Huang (2004). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines. *Mol Cancer Ther* 3(1): 11-20.
- Baud, V. and M. Karin (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 8(1): 33-40.
- Beach, D., B. Durkacz and P. Nurse (1982). Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* 300(5894): 706-709.
- Bhat, M., N. Robichaud, L. Hulea, N. Sonenberg, J. Pelletier and I. Topisirovic (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 14(4): 261-278.
- Bishop, J. L., D. Thaper and A. Zoubeidi (2014). The Multifaceted Roles of STAT3 Signaling in the Progression of Prostate Cancer. *Cancers (Basel)* 6(2): 829-859.
- Blagosklonny, M. V., T. Schulte, P. Nguyen, J. Trepel and L. M. Neckers (1996). Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res* 56(8): 1851-1854.
- Blaszczak-Swiatkiewicz, K., M. Mirowski, K. Kaplinska, R. Kruszynski, A. Trzesowska-Kruszynska and E. Mikiciuk-Olasik (2012). New benzimidazole derivatives with potential cytotoxic activity--study of their stability by RP-HPLC. *Acta Biochim Pol* 59(2): 279-288.

- Bollmann, F., S. Jackel, L. Schmidtke, K. Schrick, C. Reinhardt, K. Jurk, Z. Wu, N. Xia, H. Li, G. Erkel, U. Walter, H. Kleinert and A. Pautz (2015). Anti-Inflammatory and Anti-Thrombotic Effects of the Fungal Metabolite Galiellalactone in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *PLoS One* 10(6): e0130401.
- Boutros, R., V. Lobjois and B. Ducommun (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 7(7): 495-507.
- Bracci, L., G. Schiavoni, A. Sistigu and F. Belardelli (2014). Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ* 21(1): 15-25.
- Bryant, C., R. Rawlinson and A. J. Massey (2014). Chk1 inhibition as a novel therapeutic strategy for treating triple-negative breast and ovarian cancers. *BMC Cancer* 14: 570.
- Byrne, J. C., M. R. Downes, N. O'Donoghue, J. M. Fitzpatrick, M. J. Dunn and R. W. Watson (2008). Fasting status as a consideration for human serum collection and preparation prior to depletion and analysis. *Electrophoresis* 29(14): 3055-3059.
- Byrne, J. C., M. R. Downes, N. O'Donoghue, C. O'Keane, A. O'Neill, Y. Fan, J. M. Fitzpatrick, M. J. Dunn and R. W. Watson (2009). 2D-DIGE as a strategy to identify serum markers for the progression of prostate cancer. *J Proteome Res* 8(2): 942-957.
- Caldenhoven, E., T. B. van Dijk, R. Solari, J. Armstrong, J. A. Raaijmakers, J. W. Lammers, L. Koenderman and R. P. de Groot (1996). STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* 271(22): 13221-13227.
- Callewaert, L., N. Van Tilborgh and F. Claessens (2006). Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor. *Cancer Res* 66(1): 543-553.
- Canesin, G., S. Evans-Axelsson, R. Hellsten, O. Sterner, A. Krzyzanowska, T. Andersson and A. Bjartell (2016). The STAT3 Inhibitor Galiellalactone Effectively Reduces Tumor Growth and Metastatic Spread in an Orthotopic Xenograft Mouse Model of Prostate Cancer. *Eur Urol* 69(3): 400-404.
- Cao, D. L., D. W. Ye, Y. Zhu, H. L. Zhang, Y. X. Wang and X. D. Yao (2011). Efforts to resolve the contradictions in early diagnosis of prostate cancer: a comparison of different algorithms of sarcosine in urine. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 14(2): 166-172.
- Cassinello, J., J. Carballido Rodriguez and L. Anton Aparicio (2016). Role of taxanes in advanced prostate cancer. *Clin Transl Oncol* 18(10): 972-980.
- Catz, S. D. and J. L. Johnson (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20(50): 7342-7351.

Referencias bibliográficas

Chandrasekar, T., J. C. Yang, A. C. Gao and C. P. Evans (2015). Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol* 4(3): 365-380.

Chen, G., X. Wang, S. Zhang, Y. Lu, Y. Sun, J. Zhang, Z. Li and J. Lu (2005). Androgen receptor mutants detected in recurrent prostate cancer exhibit diverse functional characteristics. *Prostate* 63(4): 395-406.

Chen, S., X. Chen, G. Xie, Y. He, D. Yan, D. Zheng, S. Li, X. Fu, Y. Li, X. Pang, Z. Hu, H. Li, W. Tan and J. Li (2016). Cdc6 contributes to cisplatin-resistance by activation of ATR-Chk1 pathway in bladder cancer cells. *Oncotarget* 7(26): 40362-40376.

Chen, T., L. H. Wang and W. L. Farrar (2000). Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 60(8): 2132-2135.

Cheung, P. K., B. Woolcock, H. Adomat, M. Sutcliffe, T. C. Bainbridge, E. C. Jones, D. Webber, T. Kinahan, M. Sadar, M. E. Gleave and J. Vielkind (2004). Protein profiling of microdissected prostate tissue links growth differentiation factor 15 to prostate carcinogenesis. *Cancer Res* 64(17): 5929-5933.

Chu, B., F. Liu, L. Li, C. Ding, K. Chen, Q. Sun, Z. Shen, Y. Tan, C. Tan and Y. Jiang (2015). A benzimidazole derivative exhibiting antitumor activity blocks EGFR and HER2 activity and upregulates DR5 in breast cancer cells. *Cell Death Dis* 6: e1686.

Cliby, W. A., K. A. Lewis, K. K. Lilly and S. H. Kaufmann (2002). S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. *J Biol Chem* 277(2): 1599-1606.

Costello, L. C., Y. Liu, R. B. Franklin and M. C. Kennedy (1997). Zinc inhibition of mitochondrial aconitase and its importance in citrate metabolism of prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 272(46): 28875-28881.

Coutinho, I., T. K. Day, W. D. Tilley and L. A. Selth (2016). Androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer: a lesson in persistence. *Endocr Relat Cancer* 23(12): T179-T197.

Curtin, N. J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 12(12): 801-817.

Dahllof, B., A. Billstrom, F. Cabral and B. Hartley-Asp (1993). Estramustine depolymerizes microtubules by binding to tubulin. *Cancer Res* 53(19): 4573-4581.

Darnell, J. E., Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277(5332): 1630-1635.

- Davalieva, K., I. M. Kostovska, S. Kiprijanovska, K. Markoska, K. Kubelka-Sabit, V. Filipovski, S. Stavridis, O. Stankov, S. Komina, G. Petrussevska and M. Polenakovic (2015). Proteomics analysis of malignant and benign prostate tissue by 2D DIGE/MS reveals new insights into proteins involved in prostate cancer. *Prostate* 75(14): 1586-1600.
- Davies, M. A., D. Koul, H. Dhesi, R. Berman, T. J. McDonnell, D. McConkey, W. K. Yung and P. A. Steck (1999). Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res* 59(11): 2551-2556.
- Dhir, R., Z. Ni, W. Lou, F. DeMiguel, J. R. Grandis and A. C. Gao (2002). Stat3 activation in prostatic carcinomas. *Prostate* 51(4): 241-246.
- Disis, M. L. (2010). Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol* 28(29): 4531-4538.
- Dizeyi, N., A. Bjartell, E. Nilsson, J. Hansson, V. Gadaleanu, N. Cross and P. A. Abrahamsson (2004). Expression of serotonin receptors and role of serotonin in human prostate cancer tissue and cell lines. *Prostate* 59(3): 328-336.
- Dizeyi, N., P. Hedlund, A. Bjartell, M. Tinzl, K. Austild-Tasken and P. A. Abrahamsson (2011). Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. *Urol Oncol* 29(4): 436-445.
- Don-Doncow, N., Z. Escobar, M. Johansson, S. Kjellstrom, V. Garcia, E. Munoz, O. Sterner, A. Bjartell and R. Hellsten (2014). Galiellalactone is a direct inhibitor of the transcription factor STAT3 in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 289(23): 15969-15978.
- Don-Doncow, N., F. Marginean, I. Coleman, P. S. Nelson, R. Ehrnstrom, A. Krzyzanowska, C. Morrissey, R. Hellsten and A. Bjartell (2017). Expression of STAT3 in Prostate Cancer Metastases. *Eur Urol* 71(3): 313-316.
- Drake, J. M., N. A. Graham, T. Stoyanova, A. Sedghi, A. S. Goldstein, H. Cai, D. A. Smith, H. Zhang, E. Komisopoulou, J. Huang, T. G. Graeber and O. N. Witte (2012). Oncogene-specific activation of tyrosine kinase networks during prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(5): 1643-1648.
- Eisermann, K., D. Wang, Y. Jing, L. E. Pascal and Z. Wang (2013). Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. *Transl Androl Urol* 2(3): 137-147.
- Endo, K., M. Mizuguchi, A. Harata, G. Itoh and K. Tanaka (2010). Nocodazole induces mitotic cell death with apoptotic-like features in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 584(11): 2387-2392.
- Escobar, Z., A. Bjartell, G. Canesin, S. Evans-Axelsson, O. Sterner, R. Hellsten and M. H. Johansson (2016). Preclinical Characterization of 3beta-(N-Acetyl l-cysteine methyl ester)-2alpha,3-dihydrogaliellalactone (GPA512), a Prodrug of a Direct STAT3 Inhibitor for the Treatment of Prostate Cancer. *J Med Chem* 59(10): 4551-4562.
- Esteller, M. (2000). Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* 36(18): 2294-2300.

Referencias bibliográficas

- Ezkurdia, I., D. Juan, J. M. Rodriguez, A. Frankish, M. Diekhans, J. Harrow, J. Vazquez, A. Valencia and M. L. Tress (2014). Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet* 23(22): 5866-5878.
- Fakhrejahani, F., R. A. Madan and W. L. Dahut (2017). Management Options for Biochemically Recurrent Prostate Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 18(5): 26.
- Fang, Y., R. Sullivan and C. H. Graham (2007). Confluence-dependent resistance to doxorubicin in human MDA-MB-231 breast carcinoma cells requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Exp Cell Res* 313(5): 867-877.
- Fenton, M. A., T. D. Shuster, A. M. Fertig, M. E. Taplin, G. Kolvenbag, G. J. Bubley and S. P. Balk (1997). Functional characterization of mutant androgen receptors from androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 3(8): 1383-1388.
- Ferlay, J., I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman and F. Bray (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5): E359-386.
- Gajer, J. M., S. D. Furdas, A. Grunder, M. Gothwal, U. Heinicke, K. Keller, F. Colland, S. Fulda, H. L. Pahl, I. Fichtner, W. Sippl and M. Jung (2015). Histone acetyltransferase inhibitors block neuroblastoma cell growth in vivo. *Oncogenesis* 4: e137.
- Gao, X., J. Pang, L. Y. Li, W. P. Liu, J. M. Di, Q. P. Sun, Y. Q. Fang, X. P. Liu, X. Y. Pu, D. He, M. T. Li, Z. L. Su and B. Y. Li (2010). Expression profiling identifies new function of collapsin response mediator protein 4 as a metastasis-suppressor in prostate cancer. *Oncogene* 29(32): 4555-4566.
- Garcia, V., M. Lara-Chica, I. Cantarero, O. Sterner, M. A. Calzado and E. Munoz (2016). Galiellalactone induces cell cycle arrest and apoptosis through the ATM/ATR pathway in prostate cancer cells. *Oncotarget* 7(4): 4490-4506.
- Garrido, C., P. Ottavi, A. Fromentin, A. Hammann, A. P. Arrigo, B. Chauffert and P. Mehlen (1997). HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res* 57(13): 2661-2667.
- Georgoulas, V. (2002). Docetaxel (taxotere) in the treatment of non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem* 9(8): 869-877.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25(51): 6680-6684.
- Giskeodegard, G. F., H. Bertilsson, K. M. Selnaes, A. J. Wright, T. F. Bathen, T. Viset, J. Halgunset, A. Angelsen, I. S. Gribbestad and M. B. Tessem (2013). Spermine and citrate as metabolic biomarkers for assessing prostate cancer aggressiveness. *PLoS One* 8(4): e62375.
- Glunde, K., Z. M. Bhujwala and S. M. Ronen (2011). Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer* 11(12): 835-848.

- Grasso, C. S., Y. M. Wu, D. R. Robinson, X. Cao, S. M. Dhanasekaran, A. P. Khan, M. J. Quist, X. Jing, R. J. Lonigro, J. C. Brenner, I. A. Asangani, B. Ateeq, S. Y. Chun, J. Siddiqui, L. Sam, M. Anstett, R. Mehra, J. R. Prensner, N. Palanisamy, G. A. Ryslik, F. Vandin, B. J. Raphael, L. P. Kunju, D. R. Rhodes, K. J. Pienta, A. M. Chinnaiyan and S. A. Tomlins (2012). The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487(7406): 239-243.
- Grivennikov, S. I. and M. Karin (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21(1): 11-19.
- Gross, M., I. Top, I. Laux, J. Katz, J. Curran, C. Tindell and D. Agus (2007). Beta-2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13(7): 1979-1986.
- Habraken, Y. and J. Piette (2006). NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol* 72(9): 1132-1141.
- Han, Z., J. Feng, Z. Hong, L. Chen, W. Li, S. Liao, X. Wang, T. Ji, S. Wang, D. Ma, G. Chen and Q. Gao (2013). Silencing of the STAT3 signaling pathway reverses the inherent and induced chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 435(2): 188-194.
- Han, Z., X. Wang, L. Ma, L. Chen, M. Xiao, L. Huang, Y. Cao, J. Bai, D. Ma, J. Zhou and Z. Hong (2014). Inhibition of STAT3 signaling targets both tumor-initiating and differentiated cell populations in prostate cancer. *Oncotarget* 5(18): 8416-8428.
- Handy, C. E. and E. S. Antonarakis (2016). Sequencing Treatment for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 17(12): 64.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28(5): 739-745.
- Hassan, M. I., V. Kumar, T. Kashav, N. Alam, T. P. Singh and S. Yadav (2007). Proteomic approach for purification of seminal plasma proteins involved in tumor proliferation. *J Sep Sci* 30(12): 1979-1988.
- Hausding, M., M. Tepe, C. Ubel, H. A. Lehr, B. Rohrig, Y. Hohn, A. Pautz, T. Eigenbrod, T. Anke, H. Kleinert, G. Erkel and S. Finotto (2011). Induction of tolerogenic lung CD4+ T cells by local treatment with a pSTAT-3 and pSTAT-5 inhibitor ameliorated experimental allergic asthma. *Int Immunol* 23(1): 1-15.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 26(3): 203-234.

Referencias bibliográficas

He, B., R. B. Lanz, W. Fiskus, C. Geng, P. Yi, S. M. Hartig, K. Rajapakshe, J. Shou, L. Wei, S. S. Shah, C. Foley, S. A. Chew, V. K. Eedunuri, D. J. Bedoya, Q. Feng, T. Minami, C. S. Mitsiades, A. Frolov, N. L. Weigel, S. G. Hilsenbeck, D. G. Rosen, T. Palzkill, M. M. Ittmann, Y. Song, C. Coarfa, B. W. O'Malley and N. Mitsiades (2014). GATA2 facilitates steroid receptor coactivator recruitment to the androgen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(51): 18261-18266.

Heinlein, C. A. and C. Chang (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev* 25(2): 276-308.

Helleday, T., S. Eshtad and S. Nik-Zainal (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet* 15(9): 585-598.

Hellsten, R., M. Johansson, A. Dahlman, N. Dizeyi, O. Sterner and A. Bjartell (2008). Galiellalactone is a novel therapeutic candidate against hormone-refractory prostate cancer expressing activated Stat3. *Prostate* 68(3): 269-280.

Hellsten, R., M. Johansson, A. Dahlman, O. Sterner and A. Bjartell (2011). Galiellalactone inhibits stem cell-like ALDH-positive prostate cancer cells. *PLoS One* 6(7): e22118.

Heng, Y. W. and C. G. Koh (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 42(10): 1622-1633.

Henkels, K. M. and J. J. Turchi (1999). Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 59(13): 3077-3083.

Hirota, T., T. Morisaki, Y. Nishiyama, T. Marumoto, K. Tada, T. Hara, N. Masuko, M. Inagaki, K. Hatakeyama and H. Saya (2000). Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor. *J Cell Biol* 149(5): 1073-1086.

Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411(6835): 366-374.

Hoesel, B. and J. A. Schmid (2013). The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12: 86.

Holliday, R. and G. A. McFarland (1996). Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. *Br J Cancer* 73(8): 966-971.

Hu, X., C. Garcia, L. Fazli, M. Gleave, M. P. Vitek, M. Jansen, D. Christensen and D. J. Mulholland (2015). Inhibition of Pten deficient Castration Resistant Prostate Cancer by Targeting of the SET - PP2A Signaling axis. *Sci Rep* 5: 15182.

Huber, M. A., N. Azoitei, B. Baumann, S. Grunert, A. Sommer, H. Pehamberger, N. Kraut, H. Beug and T. Wirth (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 114(4): 569-581.

- Huggins, C. and C. V. Hodges (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol* 168(1): 9-12.
- Hurwitz, M. (2015). Chemotherapy in Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep* 17(10): 44.
- Ismail, H. A., L. Lessard, A. M. Mes-Masson and F. Saad (2004). Expression of NF-kappaB in prostate cancer lymph node metastases. *Prostate* 58(3): 308-313.
- Iyer, J., S. Moghe, M. Furukawa and M. Y. Tsai (2011). What's Nu(SAP) in mitosis and cancer? *Cell Signal* 23(6): 991-998.
- Johansson, M. and O. Sterner (2002). Synthesis of (-)-galiellalactone. *J Antibiot (Tokyo)* 55(7): 663-665.
- Jang, M. J., S. H. Baek and J. H. Kim (2011). UCH-L1 promotes cancer metastasis in prostate cancer cells through EMT induction. *Cancer Lett* 302(2): 128-135.
- Jayakumar, S., A. Kunwar, S. K. Sandur, B. N. Pandey and R. C. Chaubey (2014). Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. *Biochim Biophys Acta* 1840(1): 485-494.
- Jentzmik, F., C. Stephan, K. Miller, M. Schrader, A. Erbersdobler, G. Kristiansen, M. Lein and K. Jung (2010). Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumours. *Eur Urol* 58(1): 12-18; discussion 20-11.
- Jin, R., J. A. Sterling, J. R. Edwards, D. J. DeGraff, C. Lee, S. I. Park and R. J. Matusik (2013). Activation of NF-kappa B signaling promotes growth of prostate cancer cells in bone. *PLoS One* 8(4): e60983.
- Jin, R. J., Y. Lho, L. Connelly, Y. Wang, X. Yu, L. Saint Jean, T. C. Case, K. Ellwood-Yen, C. L. Sawyers, N. A. Bhowmick, T. S. Blackwell, F. E. Yull and R. J. Matusik (2008). The nuclear factor-kappaB pathway controls the progression of prostate cancer to androgen-independent growth. *Cancer Res* 68(16): 6762-6769.
- Jordan, M. A. and L. Wilson (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4(4): 253-265.
- Joshi, G., P. K. Singh, A. Negi, A. Rana, S. Singh and R. Kumar (2015). Growth factors mediated cell signalling in prostate cancer progression: Implications in discovery of anti-prostate cancer agents. *Chem Biol Interact* 240: 120-133.
- Kantoff, P. W., S. Halabi, M. Conaway, J. Picus, J. Kirshner, V. Hars, D. Trump, E. P. Winer and N. J. Vogelzang (1999). Hydrocortisone with or without mitoxantrone in men with hormone-refractory prostate cancer: results of the cancer and leukemia group B 9182 study. *J Clin Oncol* 17(8): 2506-2513.

Referencias bibliográficas

Karanika, S., T. Karantanos, L. Li, P. G. Corn and T. C. Thompson (2015). DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. *Oncogene* 34(22): 2815-2822.

Keshari, K. R., H. Tsachres, R. Iman, L. Delos Santos, Z. L. Tabatabai, K. Shinohara, D. B. Vigneron and J. Kurhanewicz (2011). Correlation of phospholipid metabolites with prostate cancer pathologic grade, proliferative status and surgical stage - impact of tissue environment. *NMR Biomed* 24(6): 691-699.

Khan, A. P., T. M. Rajendiran, B. Ateeq, I. A. Asangani, J. N. Athanikar, A. K. Yocum, R. Mehra, J. Siddiqui, G. Palapattu, J. T. Wei, G. Michailidis, A. Sreekumar and A. M. Chinnaiyan (2013). The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. *Neoplasia* 15(5): 491-501.

Kim, T. R., H. M. Lee, S. Y. Lee, E. J. Kim, K. C. Kim, S. G. Paik, E. W. Cho and I. G. Kim (2010). SM22alpha-induced activation of p16INK4a/retinoblastoma pathway promotes cellular senescence caused by a subclinical dose of gamma-radiation and doxorubicin in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 400(1): 100-105.

Kim, Y., J. Jeon, S. Mejia, C. Q. Yao, V. Ignatchenko, J. O. Nyalwidhe, A. O. Gramolini, R. S. Lance, D. A. Troyer, R. R. Drake, P. C. Boutros, O. J. Semmes and T. Kislinger (2016). Targeted proteomics identifies liquid-biopsy signatures for extracapsular prostate cancer. *Nat Commun* 7: 11906.

Kinoshita, K., T. L. Noetzel, L. Pelletier, K. Mechtler, D. N. Drechsel, A. Schwager, M. Lee, J. W. Raff and A. A. Hyman (2005). Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *J Cell Biol* 170(7): 1047-1055.

Kirby, M., C. Hirst and E. D. Crawford (2011). Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *Int J Clin Pract* 65(11): 1180-1192.

Koganti, S., J. Hui-Yuen, S. McAllister, B. Gardner, F. Grasser, U. Palendira, S. G. Tangye, A. F. Freeman and S. Bhaduri-McIntosh (2014). STAT3 interrupts ATR-Chk1 signaling to allow oncovirus-mediated cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(13): 4946-4951.

Kohen, R., Y. Yamamoto, K. C. Cundy and B. N. Ames (1988). Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(9): 3175-3179.

Konstantakou, E. G., G. E. Voutsinas, P. K. Karkoulis, G. Aravantinos, L. H. Margaritis and D. J. Stravopodis (2009). Human bladder cancer cells undergo cisplatin-induced apoptosis that is associated with p53-dependent and p53-independent responses. *Int J Oncol* 35(2): 401-416.

Koppenol, W. H., P. L. Bounds and C. V. Dang (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11(5): 325-337.

- Kops, G. J., B. A. Weaver and D. W. Cleveland (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5(10): 773-785.
- Kotian, S., T. Banerjee, A. Lockhart, K. Huang, U. V. Catalyurek and J. D. Parvin (2014). NUSAP1 influences the DNA damage response by controlling BRCA1 protein levels. *Cancer Biol Ther* 15(5): 533-543.
- Kroon, P., P. A. Berry, M. J. Stower, G. Rodrigues, V. M. Mann, M. Simms, D. Bhasin, S. Chettiar, C. Li, P. K. Li, N. J. Maitland and A. T. Collins (2013). JAK-STAT blockade inhibits tumor initiation and clonogenic recovery of prostate cancer stem-like cells. *Cancer Res* 73(16): 5288-5298.
- Kurz, E. U., P. Douglas and S. P. Lees-Miller (2004). Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 279(51): 53272-53281.
- Landis, M. W., B. S. Pawlyk, T. Li, P. Sicinski and P. W. Hinds (2006). Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* 9(1): 13-22.
- Lau, A., N. F. Villeneuve, Z. Sun, P. K. Wong and D. D. Zhang (2008). Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* 58(5-6): 262-270.
- Lee, H., A. Herrmann, J. H. Deng, M. Kujawski, G. Niu, Z. Li, S. Forman, R. Jove, D. M. Pardoll and H. Yu (2009). Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell* 15(4): 283-293.
- Lee, S. O., W. Lou, K. M. Qureshi, F. Mehraein-Ghomi, D. L. Trump and A. C. Gao (2004). RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate* 60(4): 303-309.
- Leibovici, D., P. E. Spiess, P. K. Agarwal, S. M. Tu, C. A. Pettaway, K. Hitzhusen, R. E. Millikan and L. L. Pisters (2007). Prostate cancer progression in the presence of undetectable or low serum prostate-specific antigen level. *Cancer* 109(2): 198-204.
- Levy, D. E. and C. K. Lee (2002). What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109(9): 1143-1148.
- Li, F. and G. Sethi (2010). Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1805(2): 167-180.
- Li, Y. and F. H. Sarkar (2002). Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res* 8(7): 2369-2377.
- Lim, S. and P. Kaldis (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140(15): 3079-3093.

Referencias bibliográficas

Linja, M. J., K. P. Porkka, Z. Kang, K. J. Savinainen, O. A. Janne, T. L. Tammela, R. L. Vessella, J. J. Palvimo and T. Visakorpi (2004). Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 10(3): 1032-1040.

Liu, X., Z. He, C. H. Li, G. Huang, C. Ding and H. Liu (2012). Correlation analysis of JAK-STAT pathway components on prognosis of patients with prostate cancer. *Pathol Oncol Res* 18(1): 17-23.

Locke, J. A., E. S. Guns, A. A. Lubik, H. H. Adomat, S. C. Hendy, C. A. Wood, S. L. Ettinger, M. E. Gleave and C. C. Nelson (2008). Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. *Cancer Res* 68(15): 6407-6415.

Lonergan, P. E. and D. J. Tindall (2011). Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog* 10: 20.

Macurek, L., A. Lindqvist and R. H. Medema (2009). Aurora-A and hBora join the game of Polo. *Cancer Res* 69(11): 4555-4558.

Madu, C. O. and Y. Lu (2010). Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *J Cancer* 1: 150-177.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30(11): 630-641.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3): 153-166.

Malumbres, M., R. Sotillo, D. Santamaria, J. Galan, A. Cerezo, S. Ortega, P. Dubus and M. Barbacid (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* 118(4): 493-504.

Matsunaga, S., H. Takata, A. Morimoto, K. Hayashihara, T. Higashi, K. Akatsuchi, E. Mizusawa, M. Yamakawa, M. Ashida, T. M. Matsunaga, T. Azuma, S. Uchiyama and K. Fukui (2012). RBMX: a regulator for maintenance and centromeric protection of sister chromatid cohesion. *Cell Rep* 1(4): 299-308.

May, M. J. and S. Ghosh (1998). Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19(2): 80-88.

McDunn, J. E., Z. Li, K. P. Adam, B. P. Neri, R. L. Wolfert, M. V. Milburn, Y. Lotan and T. M. Wheeler (2013). Metabolomic signatures of aggressive prostate cancer. *Prostate* 73(14): 1547-1560.

McNeely, S., R. Beckmann and A. K. Bence Lin (2014). CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol Ther* 142(1): 1-10.
Meek, D. W. (2004). The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 1049-1056.

- Meng, Z., T. Moroishi and K. L. Guan (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 30(1): 1-17.
- Mikhailov, A. and G. G. Gundersen (1998). Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol. *Cell Motil Cytoskeleton* 41(4): 325-340.
- Mora, L. B., R. Buettner, J. Seigne, J. Diaz, N. Ahmad, R. Garcia, T. Bowman, R. Falcone, R. Fairclough, A. Cantor, C. Muro-Cacho, S. Livingston, J. Karras, J. Pow-Sang and R. Jove (2002). Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res* 62(22): 6659-6666.
- Morse, D. L., H. Gray, C. M. Payne and R. J. Gillies (2005). Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 4(10): 1495-1504.
- Muller, S. A., K. Holzapfel, C. Seidl, U. Treiber, B. J. Krause and R. Senekowitsch-Schmidtke (2009). Characterization of choline uptake in prostate cancer cells following bicalutamide and docetaxel treatment. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36(9): 1434-1442.
- Mycielska, M. E., A. Patel, N. Rizaner, M. P. Mazurek, H. Keun, A. Patel, V. Ganapathy and M. B. Djamgoz (2009). Citrate transport and metabolism in mammalian cells: prostate epithelial cells and prostate cancer. *Bioessays* 31(1): 10-20.
- Nadiminty, N., W. Lou, M. Sun, J. Chen, J. Yue, H. J. Kung, C. P. Evans, Q. Zhou and A. C. Gao (2010). Aberrant activation of the androgen receptor by NF-kappaB2/p52 in prostate cancer cells. *Cancer Res* 70(8): 3309-3319.
- Nehme, A., P. Varadarajan, G. Sellakumar, M. Gerhold, H. Niedner, Q. Zhang, X. Lin and R. D. Christen (2001). Modulation of docetaxel-induced apoptosis and cell cycle arrest by all- trans retinoic acid in prostate cancer cells. *Br J Cancer* 84(11): 1571-1576.
- Ngan, E. S., Y. Hashimoto, Z. Q. Ma, M. J. Tsai and S. Y. Tsai (2003). Overexpression of Cdc25B, an androgen receptor coactivator, in prostate cancer. *Oncogene* 22(5): 734-739.
- Nikonova, A. S., I. Astsaturov, I. G. Serebriiskii, R. L. Dunbrack, Jr. and E. A. Golemis (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci* 70(4): 661-687.
- Okamoto, A., M. Higo, M. Shiiba, D. Nakashima, T. Koyama, I. Miyamoto, H. Kasama, A. Kasamatsu, K. Ogawara, H. Yokoe, H. Tanzawa and K. Uzawa (2015). Down-Regulation of Nucleolar and Spindle-Associated Protein 1 (NUSAP1) Expression Suppresses Tumor and Cell Proliferation and Enhances Anti-Tumor Effect of Paclitaxel in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One* 10(11): e0142252.
- Ortega, S., I. Prieto, J. Odajima, A. Martin, P. Dubus, R. Sotillo, J. L. Barbero, M. Malumbres and M. Barbacid (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet* 35(1): 25-31.

Referencias bibliográficas

Overbye, A., T. Skotland, C. J. Koehler, B. Thiede, T. Seierstad, V. Berge, K. Sandvig and A. Llorente (2015). Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget* 6(30): 30357-30376.

Ozaki, T. and A. Nakagawara (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)* 3(1): 994-1013.

Ozen, M. and M. Ittmann (2005). Increased expression and activity of CDC25C phosphatase and an alternatively spliced variant in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 11(13): 4701-4706.

Ozers, M. S., B. D. Marks, K. Gowda, K. R. Kupcho, K. M. Ervin, T. De Rosier, N. Qadir, H. C. Eliason, S. M. Riddle and M. S. Shekhani (2007). The androgen receptor T877A mutant recruits LXXLL and FXXLF peptides differently than wild-type androgen receptor in a time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay. *Biochemistry* 46(3): 683-695.

Pang, J., W. P. Liu, X. P. Liu, L. Y. Li, Y. Q. Fang, Q. P. Sun, S. J. Liu, M. T. Li, Z. L. Su and X. Gao (2010). Profiling protein markers associated with lymph node metastasis in prostate cancer by DIGE-based proteomics analysis. *J Proteome Res* 9(1): 216-226.

Patel, A. R. and E. A. Klein (2009). Risk factors for prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 6(2): 87-95.

Perez, M., R. Soler-Torronteras, J. A. Collado, C. G. Limones, R. Hellsten, M. Johansson, O. Sterner, A. Bjartell, M. A. Calzado and E. Munoz (2014). The fungal metabolite galiellalactone interferes with the nuclear import of NF-kappaB and inhibits HIV-1 replication. *Chem Biol Interact* 214: 69-76.

Perkins, N. D. (2012). The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nat Rev Cancer* 12(2): 121-132.

Perlmutter, M. A. and H. Lepor (2007). Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer. *Rev Urol* 9 Suppl 1: S3-8.

Pettazzoni, P., E. Ciamporcerro, C. Medana, S. Pizzimenti, F. Dal Bello, V. G. Minero, C. Toaldo, R. Minelli, K. Uchida, M. U. Dianzani, R. Pili and G. Barrera (2011). Nuclear factor erythroid 2-related factor-2 activity controls 4-hydroxynonenal metabolism and activity in prostate cancer cells. *Free Radic Biol Med* 51(8): 1610-1618.

Pflueger, D., S. Terry, A. Sboner, L. Habegger, R. Esgueva, P. C. Lin, M. A. Svensson, N. Kitabayashi, B. J. Moss, T. Y. MacDonald, X. Cao, T. Barrette, A. K. Tewari, M. S. Chee, A. M. Chinnaiyan, D. S. Rickman, F. Demichelis, M. B. Gerstein and M. A. Rubin (2011). Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. *Genome Res* 21(1): 56-67.

Pin, E., C. Fredolini and E. F. Petricoin, 3rd (2013). The role of proteomics in prostate cancer research: biomarker discovery and validation. *Clin Biochem* 46(6): 524-538.

- Poruchynsky, M. S., E. Komlodi-Pasztor, S. Trostel, J. Wilkerson, M. Regairaz, Y. Pommier, X. Zhang, T. Kumar Maity, R. Robey, M. Burotto, D. Sackett, U. Guha and A. T. Fojo (2015). Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(5): 1571-1576.
- Principe, S., Y. Kim, S. Fontana, V. Ignatchenko, J. O. Nyalwidhe, R. S. Lance, D. A. Troyer, R. Alessandro, O. J. Semmes, T. Kislinger, R. R. Drake and J. A. Medin (2012). Identification of prostate-enriched proteins by in-depth proteomic analyses of expressed prostatic secretions in urine. *J Proteome Res* 11(4): 2386-2396.
- Prior, C., F. Guillen-Grima, J. E. Robles, D. Rosell, J. M. Fernandez-Montero, X. Agirre, R. Catena and A. Calvo (2010). Use of a combination of biomarkers in serum and urine to improve detection of prostate cancer. *World J Urol* 28(6): 681-686.
- Putluri, N., A. Shojaie, V. T. Vasu, S. Nalluri, S. K. Vareed, V. Putluri, A. Vivekanandan-Giri, J. Byun, S. Pennathur, T. R. Sana, S. M. Fischer, G. S. Palapattu, C. J. Creighton, G. Michailidis and A. Sreekumar (2011). Metabolomic profiling reveals a role for androgen in activating amino acid metabolism and methylation in prostate cancer cells. *PLoS One* 6(7): e21417.
- Qin, J., H. J. Lee, S. P. Wu, S. C. Lin, R. B. Lanz, C. J. Creighton, F. J. DeMayo, S. Y. Tsai and M. J. Tsai (2014). Androgen deprivation-induced NCoA2 promotes metastatic and castration-resistant prostate cancer. *J Clin Invest* 124(11): 5013-5026.
- Qu, M., S. C. Ren and Y. H. Sun (2014). Current early diagnostic biomarkers of prostate cancer. *Asian J Androl* 16(4): 549-554.
- Raemaekers, T., K. Ribbeck, J. Beaudouin, W. Annaert, M. Van Camp, I. Stockmans, N. Smets, R. Bouillon, J. Ellenberg and G. Carmeliet (2003). NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J Cell Biol* 162(6): 1017-1029.
- Rane, S. G., P. Dubus, R. V. Mettus, E. J. Galbreath, G. Boden, E. P. Reddy and M. Barbacid (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 22(1): 44-52.
- Ravery, V., K. Fizazi, S. Oudard, L. Drouet, J. C. Eymard, S. Culine, G. Gravis, C. Hennequin and M. Zerbib (2011). The use of estramustine phosphate in the modern management of advanced prostate cancer. *BJU Int* 108(11): 1782-1786.
- Reitman, Z. J., G. Jin, E. D. Karoly, I. Spasojevic, J. Yang, K. W. Kinzler, Y. He, D. D. Bigner, B. Vogelstein and H. Yan (2011). Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(8): 3270-3275.
- Rudolph, K., A. Serwe and G. Erkel (2013). Inhibition of TGF-beta signaling by the fungal lactones (S)-curvularin, dehydrocurvularin, oxacyclododecindione and galiellalactone. *Cytokine* 61(1): 285-296.

Referencias bibliográficas

- Russell, P. and P. Nurse (1986). Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided. *Cell* 45(6): 781-782.
- Sakakura, C., E. A. Sweeney, T. Shirahama, Y. Igarashi, S. Hakomori, H. Tsujimoto, T. Imanishi, M. Ogaki, T. Ohyama, J. Yamazaki, A. Hagiwara, T. Yamaguchi, K. Sawai and T. Takahashi (1997). Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide. *Surg Today* 27(7): 676-679.
- Salaun, P., Y. Rannou and C. Prigent (2008). Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards. *Adv Exp Med Biol* 617: 41-56.
- Sandvig, K. and A. Llorente (2012). Proteomic analysis of microvesicles released by the human prostate cancer cell line PC-3. *Mol Cell Proteomics* 11(7): M111 012914.
- Santamaria, D., C. Barriere, A. Cerqueira, S. Hunt, C. Tardy, K. Newton, J. F. Caceres, P. Dubus, M. Malumbres and M. Barbacid (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448(7155): 811-815.
- Santoni, M., A. Conti, F. Piva, F. Massari, C. Ciccarese, L. Burattini, L. Cheng, A. Lopez-Beltran, M. Scarpelli, D. Santini, G. Tortora, S. Cascinu and R. Montironi (2015). Role of STAT3 pathway in genitourinary tumors. *Future Sci OA* 1(3): FSO15.
- Sarrouilhe, D., J. Clarhaut, N. Defamie and M. Mesnil (2015). Serotonin and cancer: what is the link? *Curr Mol Med* 15(1): 62-77.
- Schafer, K. A. (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35(6): 461-478.
- Schneider, G., A. Henrich, G. Greiner, V. Wolf, A. Lovas, M. Wiczorek, T. Wagner, S. Reichardt, A. von Werder, R. M. Schmid, F. Weih, T. Heinzl, D. Saur and O. H. Kramer (2010). Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53. *Oncogene* 29(19): 2795-2806.
- Schweizer, M. T. and E. Y. Yu (2015). Persistent androgen receptor addiction in castration-resistant prostate cancer. *J Hematol Oncol* 8: 128.
- Seki, A., J. A. Coppinger, C. Y. Jang, J. R. Yates and G. Fang (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 320(5883): 1655-1658.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46(5): 705-716.
- Serkova, N. J., E. J. Gamito, R. H. Jones, C. O'Donnell, J. L. Brown, S. Green, H. Sullivan, T. Hedlund and E. D. Crawford (2008). The metabolites citrate, myo-inositol, and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *Prostate* 68(6): 620-628.

- Sheng, X., W. B. Li, D. L. Wang, K. H. Chen, J. J. Cao, Z. Luo, J. He, M. C. Li, W. J. Liu and C. Yu (2015). YAP is closely correlated with castration-resistant prostate cancer, and downregulation of YAP reduces proliferation and induces apoptosis of PC-3 cells. *Mol Med Rep* 12(4): 4867-4876.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13(12): 1501-1512.
- Shin, K. H., M. K. Kang, R. H. Kim, R. Christensen and N. H. Park (2006). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 12(10): 3222-3228.
- Shruthi, B. S., P. Vinodhkumar and Selvamani (2016). Proteomics: A new perspective for cancer. *Adv Biomed Res* 5: 67.
- Shukla, S., G. T. MacLennan, P. Fu, J. Patel, S. R. Marengo, M. I. Resnick and S. Gupta (2004). Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression. *Neoplasia* 6(4): 390-400.
- Singh, S. K., S. Banerjee, E. P. Acosta, J. W. Lillard and R. Singh (2017). Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway. *Oncotarget* 8(10): 17216-17228.
- Siveen, K. S., S. Sikka, R. Surana, X. Dai, J. Zhang, A. P. Kumar, B. K. Tan, G. Sethi and A. Bishayee (2014). Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1845(2): 136-154.
- Skvortsov, S., G. Schafer, T. Stasyk, C. Fuchsberger, G. K. Bonn, G. Bartsch, H. Klocker and L. A. Huber (2011). Proteomics profiling of microdissected low- and high-grade prostate tumors identifies Lamin A as a discriminatory biomarker. *J Proteome Res* 10(1): 259-268.
- Smith, J., L. M. Tho, N. Xu and D. A. Gillespie (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108: 73-112.
- Smyth, M. J., G. P. Dunn and R. D. Schreiber (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90: 1-50.
- Song, Y. H., M. Shiota, K. Kuroiwa, S. Naito and Y. Oda (2011). The important role of glycine N-methyltransferase in the carcinogenesis and progression of prostate cancer. *Mod Pathol* 24(9): 1272-1280.
- Soussi, T. and K. G. Wiman (2007). Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 12(4): 303-312.

Referencias bibliográficas

Sreekumar, A., L. M. Poisson, T. M. Rajendiran, A. P. Khan, Q. Cao, J. Yu, B. Laxman, R. Mehra, R. J. Lonigro, Y. Li, M. K. Nyati, A. Ahsan, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Cao, J. Byun, G. S. Omenn, D. Ghosh, S. Pennathur, D. C. Alexander, A. Berger, J. R. Shuster, J. T. Wei, S. Varambally, C. Beecher and A. M. Chinnaiyan (2009). Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457(7231): 910-914.

Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, R. European Organisation for, T. Treatment of Cancer Brain, G. Radiotherapy and G. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10): 987-996.

Subramaniam, A., M. K. Shanmugam, E. Perumal, F. Li, A. Nachiyappan, X. Dai, S. N. Swamy, K. S. Ahn, A. P. Kumar, B. K. Tan, K. M. Hui and G. Sethi (2013). Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1835(1): 46-60.

Sugie, S., S. Mukai, K. Yamasaki, T. Kamibeppu, H. Tsukino and T. Kamoto (2015). Significant Association of Caveolin-1 and Caveolin-2 with Prostate Cancer Progression. *Cancer Genomics Proteomics* 12(6): 391-396.

Sun, C., X. Zhao, K. Xu, J. Gong, W. Liu, W. Ding, Y. Gou, G. Xia and Q. Ding (2011). Periostin: a promising target of therapeutical intervention for prostate cancer. *J Transl Med* 9: 99.

Sur, S. and D. K. Agrawal (2016). Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies. *Mol Cell Biochem* 416(1-2): 33-46.

Tam, L., L. M. McGlynn, P. Traynor, R. Mukherjee, J. M. Bartlett and J. Edwards (2007). Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer* 97(3): 378-383.

Tan, M. H., J. Li, H. E. Xu, K. Melcher and E. L. Yong (2015). Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 36(1): 3-23.

Tanaka, T., H. D. Halicka, F. Traganos, K. Seiter and Z. Darzynkiewicz (2007). Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. *Cell Cycle* 6(3): 371-376.

Tannock, I. F., D. Osoba, M. R. Stockler, D. S. Ernst, A. J. Neville, M. J. Moore, G. R. Armitage, J. J. Wilson, P. M. Venner, C. M. Coppin and K. C. Murphy (1996). Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol* 14(6): 1756-1764.

- Tavoosidana, G., G. Ronquist, S. Darmanis, J. Yan, L. Carlsson, D. Wu, T. Conze, P. Ek, A. Semjonow, E. Eltze, A. Larsson, U. D. Landegren and M. Kamali-Moghaddam (2011). Multiple recognition assay reveals prostasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(21): 8809-8814.
- Teodoro, J. G., S. K. Evans and M. R. Green (2007). Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *J Mol Med (Berl)* 85(11): 1175-1186.
- Teply, B. A. and R. J. Hauke (2016). Chemotherapy options in castration-resistant prostate cancer. *Indian J Urol* 32(4): 262-270.
- Theodorescu, D., E. Schiffer, H. W. Bauer, F. Douwes, F. Eichhorn, R. Polley, T. Schmidt, W. Schofer, P. Zurbig, D. M. Good, J. J. Coon and H. Mischak (2008). Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer. *Proteomics Clin Appl* 2(4): 556-570.
- Thysell, E., I. Surowiec, E. Hornberg, S. Crnalic, A. Widmark, A. I. Johansson, P. Stattin, A. Bergh, T. Moritz, H. Antti and P. Wikstrom (2010). Metabolomic characterization of human prostate cancer bone metastases reveals increased levels of cholesterol. *PLoS One* 5(12): e14175.
- Toji, S., N. Yabuta, T. Hosomi, S. Nishihara, T. Kobayashi, S. Suzuki, K. Tamai and H. Nojima (2004). The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells* 9(5): 383-397.
- Trock, B. J. (2011). Application of metabolomics to prostate cancer. *Urol Oncol* 29(5): 572-581.
- Ummanni, R., E. Jost, M. Braig, F. Lohmann, F. Mundt, C. Barrett, T. Schlomm, G. Sauter, T. Senff, C. Bokemeyer, H. Sultmann, C. Meyer-Schwesinger, T. H. Brummendorf and S. Balabanov (2011). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation. *Mol Cancer* 10: 129.
- van Alphen, R. J., E. A. Wiemer, H. Burger and F. A. Eskens (2009). The spliceosome as target for anticancer treatment. *Br J Cancer* 100(2): 228-232.
- van Bokhoven, A., M. Varella-Garcia, C. Korch, W. U. Johannes, E. E. Smith, H. L. Miller, S. K. Nordeen, G. J. Miller and M. S. Lucia (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 57(3): 205-225.
- Vargas-Roig, L. M., F. D. Cuello-Carrion, N. Fernandez-Escobar, P. Daguerre, M. Leuzzi, J. Ibarra, F. E. Gago, S. B. Nadin and D. R. Ciocca (2008). Prognostic value of Bcl-2 in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline based chemotherapy. *Mol Oncol* 2(1): 102-111.

Referencias bibliográficas

Vaughan, C. A., S. Singh, B. Windle, H. M. Sankala, P. R. Graves, W. Andrew Yeudall, S. P. Deb and S. Deb (2012). p53 mutants induce transcription of NF-kappaB2 in H1299 cells through CBP and STAT binding on the NF-kappaB2 promoter and gain of function activity. *Arch Biochem Biophys* 518(1): 79-88.

Vax, V. V., R. Bibi, S. Diaz-Cano, M. Gueorguiev, B. Kola, N. Borboli, B. Bressac-de Paillerets, G. J. Walker, Dedov, II, A. B. Grossman and M. Korbonits (2003). Activating point mutations in cyclin-dependent kinase 4 are not seen in sporadic pituitary adenomas, insulinomas or Leydig cell tumours. *J Endocrinol* 178(2): 301-310.

Vazquez-Santillan, K., J. Melendez-Zajgla, L. Jimenez-Hernandez, G. Martinez-Ruiz and V. Maldonado (2015). NF-kappaB signaling in cancer stem cells: a promising therapeutic target? *Cell Oncol (Dordr)* 38(5): 327-339.

Veerakumarasivam, A., L. D. Goldstein, K. Saeb-Parsy, H. E. Scott, A. Warren, N. P. Thorne, I. G. Mills, A. Venkitaraman, D. E. Neal and J. D. Kelly (2008). AURKA overexpression accompanies dysregulation of DNA-damage response genes in invasive urothelial cell carcinoma. *Cell Cycle* 7(22): 3525-3533.

Velonas, V. M., H. H. Woo, C. G. dos Remedios and S. J. Assinder (2013). Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci* 14(6): 11034-11060.

Vermeersch, K. A. and M. P. Styczynski (2013). Applications of metabolomics in cancer research. *J Carcinog* 12: 9.

Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36(3): 131-149.

Waltering, K. K., A. Urbanucci and T. Visakorpi (2012). Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 360(1-2): 38-43.

Wang, G. W., C. Lv, Z. R. Shi, R. T. Zeng, X. Y. Dong, W. D. Zhang, R. H. Liu, L. Shan and Y. H. Shen (2014). Abieslactone induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinomas through the mitochondrial pathway and the generation of reactive oxygen species. *PLoS One* 9(12): e115151.

Wang, H., X. Zhang, L. Teng and R. J. Legerski (2015). DNA damage checkpoint recovery and cancer development. *Exp Cell Res* 334(2): 350-358.

Wang, J., Y. Cai, L. J. Shao, J. Siddiqui, N. Palanisamy, R. Li, C. Ren, G. Ayala and M. Ittmann (2011). Activation of NF- κ B by TMPRSS2/ERG Fusion Isoforms through Toll-Like Receptor-4. *Cancer Res* 71(4): 1325-1333.

Wang, Q., W. Li, Y. Zhang, X. Yuan, K. Xu, J. Yu, Z. Chen, R. Beroukhim, H. Wang, M. Lupien, T. Wu, M. M. Regan, C. A. Meyer, J. S. Carroll, A. K. Manrai, O. A. Janne, S. P. Balk, R. Mehra, B. Han, A. M. Chinnaiyan, M. A. Rubin, L. True, M. Fiorentino, C. Fiore, M. Loda, P. W. Kantoff, X. S. Liu and M. Brown (2009). Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. *Cell* 138(2): 245-256.

Wang, X., Z. Ma, Z. Xiao, H. Liu, Z. Dou, X. Feng and H. Shi (2012). Chk1 knockdown confers radiosensitization in prostate cancer stem cells. *Oncol Rep* 28(6): 2247-2254.

Webster, G. A. and N. D. Perkins (1999). Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol* 19(5): 3485-3495.

Weidler, M., J. Rether, T. Anke and G. Erkel (2000). Inhibition of interleukin-6 signaling by galiellalactone. *FEBS Lett* 484(1): 1-6.

Wen, Z., Z. Zhong and J. E. Darnell, Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82(2): 241-250.

Whang, Y. E., X. Wu, H. Suzuki, R. E. Reiter, C. Tran, R. L. Vessella, J. W. Said, W. B. Isaacs and C. L. Sawyers (1998). Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9): 5246-5250.

Wu, X., L. Dong, R. Zhang, K. Ying and H. Shen (2014). Transgelin overexpression in lung adenocarcinoma is associated with tumor progression. *Int J Mol Med* 34(2): 585-591.

Xiao, G. and J. Fu (2011). NF-kappaB and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *Am J Cancer Res* 1(2): 192-221.

Xue, L., J. Hou, Q. Wang, L. Yao, S. Xu and D. Ge (2014). RNAi screening identifies HAT1 as a potential drug target in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 7(7): 3898-3907.

Yamamura, M., K. Noguchi, Y. Nakano, E. Segawa, Y. Zushi, K. Takaoka, H. Kishimoto, T. Hashimoto-Tamaoki and M. Urade (2013). Functional analysis of Zyxin in cell migration and invasive potential of oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 42(3): 873-880.

Yang, L., L. Wang, H. K. Lin, P. Y. Kan, S. Xie, M. Y. Tsai, P. H. Wang, Y. T. Chen and C. Chang (2003). Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 305(3): 462-469.

Yin, Z., Y. Zhang, Y. Li, T. Lv, J. Liu and X. Wang (2012). Prognostic significance of STAT3 expression and its correlation with chemoresistance of non-small cell lung cancer cells. *Acta Histochem* 114(2): 151-158.

Yocum, A. K., A. P. Khan, R. Zhao and A. M. Chinnaiyan (2010). Development of selected reaction monitoring-MS methodology to measure peptide biomarkers in prostate cancer. *Proteomics* 10(19): 3506-3514.

Yokokura, S., N. Kanaji, A. Tadokoro, S. Yokokura, N. Kadowaki and S. Bandoh (2016). Confluence-dependent resistance to cisplatin in lung cancer cells is regulated by transforming growth factor-beta. *Exp Lung Res* 42(4): 175-181.

Referencias bibliográficas

Yu, Q., Y. Geng and P. Sicinski (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411(6841): 1017-1021.

Zeisel, S. H. and K. A. da Costa (2009). Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr Rev* 67(11): 615-623.

Zhang, H. F. and R. Lai (2014). STAT3 in Cancer-Friend or Foe? *Cancers (Basel)* 6(3): 1408-1440.

Zhang, P., A. Singh, S. Yegnasubramanian, D. Esopi, P. Kombairaju, M. Bodas, H. Wu, S. G. Bova and S. Biswal (2010). Loss of Kelch-like ECH-associated protein 1 function in prostate cancer cells causes chemoresistance and radioresistance and promotes tumor growth. *Mol Cancer Ther* 9(2): 336-346.

Zhang, X., M. Chen, P. Zou, K. Kanchana, Q. Weng, W. Chen, P. Zhong, J. Ji, H. Zhou, L. He and G. Liang (2015). Curcumin analog WZ35 induced cell death via ROS-dependent ER stress and G2/M cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *BMC Cancer* 15: 866.

Zhao, B., X. Wei, W. Li, R. S. Udan, Q. Yang, J. Kim, J. Xie, T. Ikenoue, J. Yu, L. Li, P. Zheng, K. Ye, A. Chinnaiyan, G. Halder, Z. C. Lai and K. L. Guan (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21(21): 2747-2761.

Zhao, L., B. Y. Lee, D. A. Brown, M. P. Molloy, G. M. Marx, N. Pavlakis, M. J. Boyer, M. R. Stockler, W. Kaplan, S. N. Breit, R. L. Sutherland, S. M. Henshall and L. G. Horvath (2009). Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling. *Cancer Res* 69(19): 7696-7703.

Zheng, Y., Y. Xu, B. Ye, J. Lei, M. H. Weinstein, M. P. O'Leary, J. P. Richie, S. C. Mok and B. C. Liu (2003). Prostate carcinoma tissue proteomics for biomarker discovery. *Cancer* 98(12): 2576-2582.

Zhu, H. and J. A. Garcia (2013). Targeting the adrenal gland in castration-resistant prostate cancer: a case for orteronel, a selective CYP-17 17,20-lyase inhibitor. *Curr Oncol Rep* 15(2): 105-112.

Zuco, V., V. Benedetti and F. Zunino (2010). ATM- and ATR-mediated response to DNA damage induced by a novel camptothecin, ST1968. *Cancer Lett* 292(2): 186-196.

Referencias bibliográficas