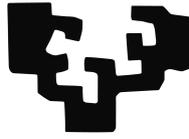


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA
MEDIKUNTZA ETA ODONTOLOGIA FAKULTATEA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR E HISTOLOGÍA

**Efecto antitumoral de la terfenadina,
antagonista del receptor H1 de la
histamina, mediado por el complejo I
mitocondrial**

Erika Alonso Tejerina

Leioa, 2015

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido gracias a la financiación recibida a través de los siguientes proyectos y ayudas de investigación:

-Proyecto SAIOTEK. Dpto de Industria. "Identificación de nuevas dianas terapéuticas de la terfenadina en el tratamiento del cáncer. Ensayos preclínicos." (2013)

-Subvención a grupos del sistema universitario. Gobierno Vasco. (2012-2015)

La autora de esta Tesis Doctoral, Erika Alonso, durante la realización de la misma ha sido financiada gracias a:

-Beca Fundación Jesús de Gangoiti Barrera

Duración: 2011-2012 y 2012-2013

-Contrato como personal investigador no doctor.

Duración: Marzo 2013-Septiembre 2013

Duración: Junio 2014-Agosto 2014

A Ama, Aita y Alex

AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer cuando entré en el labo y han pasado ya 5 años. Durante este tiempo han pasado y he vivido un montón de cosas que siempre asociaré a "cuando estaba haciendo la tesis...". No ha sido un camino fácil, pero no me voy a poner dramática diciendo que ha sido un "infierno", porque no ha sido así. Han sido 5 años luchando por una beca predoctoral que nunca ha llegado, y es la espinita que me queda clavada al final de este camino. Pero por ello no he dejado de trabajar y creer en poder sacar adelante esta tesis. Siempre que he recurrido a una tesis para consultar algo he leído los agradecimientos, porque creo que es la parte más personal y la que mejor refleja el paso por el labo durante la tesis. Para mí, era la parte que siempre soñaba con escribir cuando llegara el momento de ponerme a escribir y hoy me está resultando más difícil de lo que pensaba...

Durante estos 5 años, además de formarme como investigadora y científica creo que he crecido y he madurado mucho como persona y me gustaría dar las gracias a todas las personas que han estado conmigo, tanto dentro como fuera del labo, durante este proceso. Espero no dejarme a nadie...

En primer lugar me gustaría darles las gracias a las directoras de esta tesis: M^ª Dolores Boyano y Aintzane Asumendi.

Lola, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y darme la posibilidad de llevar a cabo esta tesis, pero sobre todo gracias por confiar en mí desde el primer día y creer en mi capacidad para sacar adelante este trabajo, animarme cuando me he venido abajo y no dejarme abandonar.

Aintzane, gracias por acogerme con los brazos abiertos e involucrarte al máximo. Por haberme hecho pensar y razonar en cada paso que he dado en este proyecto y confiar en mí.

Gracias a las dos por haberme dado la oportunidad de acudir a congresos, por darme toda la formación que he necesitado y por haber hecho todo lo posible por financiarme.

También me gustaría agradecer a todo el personal administrativo y técnico (Mila, Txus, Asún, M^a Jose, Cristina...) por su eficacia y ayuda con el papeleo y las funciones técnicas. M^a Jose eres la eficiencia personificada, ojalá todas las secretarías fueran así. Txus, sé que te hemos mareado con los pedidos y has tenido más paciencia que un santo. Gracias!

A los de SGIKER (Ricardo, Alex y Jon), por su paciencia y por haberme enseñado a usar los microscopios, Gracias!

Me gustaría agradecer su colaboración e implicación a Gabriel y Egoitz de IMG Pharma y a todo su equipo. Gracias por vuestra implicación y porque habéis hecho posible ponerle el punto final a la tesis.

A todos los profesores del departamento y a todas las personas (jefes y becarios) de otros departamentos (como fisio y neuro) que me han ayudado cuando lo he necesitado con la experimentación. Gracias!

A todos mis compañeros del departamento, tanto a los que se han ido como a los que continúan o han entrado recientemente. Agur, Aintzane, Jairo, María, Pablo, Eli, Amaia, Aitor, Raquel, Mai, Patri, Jon, Igor, Alan, Lutxa, Olatz, Miren, Aitor,... Porque junto a vosotros he compartido muchos momentos, cenas, casas rurales, bodas, nacimientos,... y puedo tener la suerte de decir que entre ellos me llevo grandes amig@s! Gracias!

A mis "lola-Aas", Ane, Idoia y Rocío. Idoia, fuiste la primera a la que conocí cuando entré al labo y me recibiste con los brazos abiertos, juntas hemos vivido un montón de cosas fuera del labo.

Ane, porque desde el primer día has desprendido energía, ganas de aprender, compañerismo y enseguida has sido una más. Fuera y dentro del labo, gracias por estar ahí!

Pero sobre todo a ti, Ro, porque sabes que si no fuera "por tu culpa" no estaría escribiendo esto jeje. Por ser una buena compañera y una mejor amiga. Creo que después de más de 10 años nos entendemos a la perfección y se me va a hacer muy raro el día que deje de trabajar a tu lado, porque juntas hacemos el equilibrio perfecto. Por todos esos momentos en el refu riendo, llorando, quejándonos de todo, tomando una coke, un café y arreglando el mundo a nuestra manera. Porque has sido mi GRAN apoyo aquí, Gracias!

Gracias también a todos los alumnos de grado, máster o prácticas que han pasado por el labo y a las "nuevas incorporaciones", porque de todos se aprende, no sólo a nivel científico. Gracias!

A las de la uni, Arantza, Cata, Mai y Marta. Por todos los cafés de después de comer, las largas conversaciones (hablando únicamente de la tesis), las kedadas, las cenas y las "terapias de grupo" que hemos hecho, Gracias!

A mi cuadrilla de amigas, Aitzi, Eider, Esti, Garbi, Marta, Oli y Silvia. Gracias por haberme escuchado y estar siempre ahí, para pasarlo bien y para ayudarme cuando lo he necesitado en los momentos de bajón. Por preocuparos por mí constantemente y por haber escuchado todas las "frikadas" de una bióloga. Gracias!

A mis tías, Carmen y Nieves, que siempre han sido como otras dos amaxus para mí. Por vuestro apoyo incondicional, Gracias!

Pero sobre todo, GRACIAS a mis padres y hermano, por que si no fuera por ellos no estaria escribiendo estas palabras. Por todo el apoyo moral y económico que me habéis dado. Amatxu, gracias por confiar en mi desde el día en que empecé la carrera, por no dejar que me rinda, por ser mi paño de lágrimas y por alegrarte de mis logros como si fueran los tuyos, Gracias!

Apa, gracias porque desde la distancia siempre estás ahí. Por empujarme a acabar mis objetivos y animarme a seguir hacia delante, Gracias!

Alex, porque además de mi hermano eres mi amigo y has sabido siempre escucharme y darme tu visión "no científica" de las cosas, por todos esos ratos, comidas y sobremesas en casa. Gracias!

A ti, Jago, básicamente por aguantarme! Jaja. Por llegar a entender "de que va eso de hacer una tesis", por ser mi mejor amigo, el que siempre tiene las palabras perfectas para sacarme una sonrisa, por apoyarme en todo, por ser mi familia. Gracias!

Y por último, agradecer a mis "bitxitos" (Calcetines y Hristo) porque durante toda la redacción y maquetación de la tesis me han hecho más compañía que nunca y me han dado todo su cariño!

Eskerrik Asko Guztioi!

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
I. El Cáncer	7
1-Tipos de cáncer	7
2-Epidemiología del cáncer	10
3-Genes y cáncer	12
4-Epigenética y cáncer	16
5-Tratamiento del cáncer	17
II. Muerte Celular	26
1-Clasificación de la muerte celular	26
2-Apoptosis	28
2.1-Fases de la apoptosis	30
2.2-Rutas apoptóticas	30
2.3-Proteínas reguladoras de la apoptosis	36
3-Autofagia	45
3.1-Vías de señalización de la autofagia	45
3.2-Formación del autofagosoma	47
3.3-Autofagia y muerte celular	47
III. Histamina y Antihistamínicos	50
1-Receptores de la histamina	51
1.1-Receptores H1 (HRH1)	52
1.1.1-Terfenadina	54
1.1.2-Fexofenadina	55
1.2-Receptores H2 (HRH2)	55
1.3-Receptores H3 (HRH3)	56
1.4-Receptores H4 (HRH4)	57
2-Histamina, antihistamínicos y cáncer	57

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	65
I. Materiales	67
1.1-Tratamientos	67
1.2-Anticuerpos primarios	67
1.3-Anticuerpos secundarios	68
1.4-Medios	68
II. Métodos	69
1-Cultivos celulares	69
1.1-Líneas celulares	69
1.2-Cultivo de células	71
1.3-Congelación y descongelación de líneas celulares	73
2-Ensayo de viabilidad celular	74
3-Extracción y cuantificación de proteínas	75
3.1-Extracción de lisados celulares	75
3.2-Cuantificación de proteínas	76
4-Western Blot	77
4.1-Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	77
4.2-Transferencia	80
4.3-Inmunomarcaje	82
4.4-Revelado	83
5-Microscopía de fluorescencia	83
5.1-Preparación del soporte para la inmunofluorescencia	84
5.2-Reacción de inmunofluorescencia	84
6-Citometría de flujo	85
6.1-Detección de apoptosis	85
7-Análisis de la expresión de los receptores de la histamina mediante PCR	86
7.1-Extracción y purificación de ARN	86
7.2-Cuantificación y verificación del estado del ARN	87
7.3-Retrotranscripción	88
7.4-Diseño de cebadores	89
7.5-PCR	90
8-Expresión de receptores muscarínicos en las líneas celulares y estudio de la afinidad de la terfenadina por dichos receptores	91

9-Desplazamiento de la fijación de [³ H]-Dihidrorotenona por terfenadina en microarrays de membranas aisladas de líneas celulares	92
10- Determinación de la actividad NADH deshidrogenasa (Complejo I)	93 92
11- Determinación de la actividad CcO (Complejo IV)	
12-Análisis del calcio intracelular	93
13-Análisis estadístico	94
RESULTADOS	95
I. Efecto de la terfenadina y fexofenadina sobre diferentes líneas tumorales humanas	97
1-La terfenadina induce citotoxicidad en las líneas de Adenocarcinoma de colon, de mama, neuroblastoma y melanoma	97
2- La fexofenadina, metabolito activo de la terfenadina, no tiene actividad antitumoral	100
3- La terfenadina induce apoptosis y autofagia en células de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama, neuroblastoma y melanoma	102
4- La terfenadina produce daño en ADN de las células de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama, neuroblastoma y melanoma	104
5- Activación de la vía de señalización p53/p73	107
II. Estudio de las dianas moleculares de la terfenadina	110
1- Expresión de los receptores H1 y H4 de la histamina en las diferentes líneas tumorales	110
2- La apoptosis inducida por terfenadina depende de la actividad tirosina quinasa, pero no de los receptores tirosina quinasa	113
3- Análisis de la implicación de los receptores muscarínicos en la muerte inducida por terfenadina	117
4- Canales ERG y su posible papel en la muerte celular inducida por terfenadina	121
5- Implicación del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en la apoptosis inducida por terfenadina	126
6- Detección de la actividad NADH deshidrogenasa	128
7- Detección de la actividad Citocromo c Oxidasa (CcO)	131
8- La terfenadina y la rotenona aumentan el calcio citosólico	132

DISCUSIÓN	137
I. La terfenadina induce en células tumorales apoptosis y autofagia de manera independiente a la expresión de los receptores H1 y H4 de la histamina	139
II. Identificación de la diana molecular de la terfenadina en las células tumorales	146
CONCLUSIONES	158
BIBLIOGRAFÍA	160

ABREVIATURAS

[³ H]-DHR	[³ H]-Dihidrorotenona
[³ H]-NMS	[³ H]N-metilescopolamina
AACR	<i>American Association for Cancer Research</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia Telangectasia Mutated</i>
Atg	<i>Autophagy-related Gene</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
BRCA-1	<i>Breast Cancer type 1 susceptibility protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca ⁺²	Calcio
CcO	Citocromo C Oxidasa
c-FLIP	<i>FLICE Inhibitory Protein</i>
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CARD	<i>Caspase Activation Recruitment Domain</i>
CoQ	Ubiquinona
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CTE	Cadena de transporte de electrones
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DAO	Diamina oxidasa
DAPI	<i>4'-6'diamine-2-phenylindole dihydrochloride</i>
DD	Dominio de muerte
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	<i>Double Strand Break</i>
DTT	Ditiotreitol
E1A	<i>Adenovirus early region 1A</i>
E1B	<i>Adenovirus early region 1B</i>
FADD	<i>FAS-Associated protein with a DD</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEX	Fexofenadina
FR	Receptor de ácido fólico
g	Gramo
g	Galga, medida de jeringas
GABA	Ácido γ -aminobutírico
HAT	Acetil transferasas de histonas
HDAC	Deacetilasa de histonas
HDC	L-histidina descarboxilasa
HDM	Demetilasa de histonas
hERG	<i>Human Ether-à-go-go Related Gene</i>
HMT	Metiltransferasa de histonas
HNMT	Histamina-N-metiltransferasa
HPV	Virus del papiloma humano

Abreviaturas

HRH1	<i>Histamine Receptor H1</i>
HRH2	<i>Histamine Receptor H2</i>
HRH3	<i>Histamine Receptor H3</i>
HRH4	<i>Histamine Receptor H4</i>
HTLV	Virus de la leucemia humana
IC	Inmunocitoquímica
IAPs	<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>
IC₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
KCl	Cloruro sódico
kDa	Kilodáltons
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MAM	Membranas asociadas a Mitocondria
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
μl	Micro litro
μM	Micromolar
NCCD	<i>Nomenclature Committee on Cell Death</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanómetro
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEN-STREP	Penicilina-estreptomicina
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteinkinasa C
PLCβ	Fosfolipasa C
pRB	Proteína del Retinoblastoma
RAF	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RE	Retículo endoplasmático
RIP1	<i>Receptor-Interacting Protein kinase 1</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	Receptor tirosin quinasa
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema Nervioso Central
SOCs	<i>Store-Operated Channels</i> (canales activados por depósitos)
t.a.	Temperatura ambiente
TEF	Terfenadina
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
U/ml	Unidades por mililitro
UI	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta
VHB	Virus de la hepatitis B

VEB	Virus de Epstein-Barr
WB	<i>Western blot</i>
XTT	Hidróxido de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfenil)-5- [(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio
YP	Yoduro de propidio

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras del apartado Introducción

-Figura 1. Incidencia de cáncer en España en ambos sexos en 2012 y predicción para 2015	11
-Figura 2. Aspectos morfológicos de la apoptosis mediante microscopía electrónica de transmisión	28
-Figura 3. Cambios ultraestructurales de la apoptosis mediante microscopía electrónica de transmisión	29
-Figura 4. Vía intrínseca de la apoptosis	32
-Figura 5. Activación de la vía extrínseca de la apoptosis a través de los receptores mortales o a través de los receptores de dependencia	35
-Figura 6. Procaspasas involucradas en la apoptosis	36
-Figura 7. Activación de caspasas	37
-Figura 8. Familia de las proteínas Bcl-2	39
-Figura 9. Activación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2	40
-Figura 10. Clasificación de las proteínas sólo-BH3 y patrón de interacción con las proteínas antiapoptóticas	41
-Figura 11. Estructura de p53	42
-Figura 12. Activación de p53	44
-Figura 13. Influencia del daño en el ADN en la activación de p53	44
-Figura 14. Esquemática de la ruta molecular de la autofagia	46
-Figura 15. Fases de la formación del autofagosoma y su degradación	47
-Figura 16. Posibles interacciones entre la apoptosis y la autofagia cuando se induce muerte celular	49
-Figura 17. Síntesis y metabolismo de la histamina	51

Figuras del apartado Materiales y Métodos

-Figura 18. Representación esquemática de la electroforesis en acrilamida con SDS	80
-Figura 19. Representación esquemática de la transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa en medio húmedo	81
-Figura 20. Representación esquemática de la hibridación de la membrana de nitrocelulosa con los anticuerpos primario y secundario	82
-Figura 21. Representación esquemática de la detección quimioluminiscente de las bandas de proteínas	83
-Figura 22. Ciclo de temperaturas para la reacción de retrotranscripción con iScript™	89
-Figura 23. Condiciones de amplificación para la PCR	90

Figuras del apartado Resultados

- Figura 24. Efecto de la terfenadina sobre la viabilidad de células de melanoma humano	97
- Figura 25. Efecto de la terfenadina sobre la viabilidad de células HCT8, MCF7 y SMS-KCNR	99
- Figura 26. Efecto de la fexofenadina y de la terfenadina sobre la viabilidad de células HCT8, MCF7, SMS-KCNR y MEL-HO	101
- Figura 27. Participación de la apoptosis y autofagia en la muerte inducida por terfenadina	102
- Figura 28. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las líneas celulares tratadas con terfenadina	103
- Figura 29. Daño en el ADN inducido por la terfenadina en diferentes líneas tumorales	104
- Figura 30. Activación de ATM inducida por terfenadina	105
- Figura 31. Activación de la expresión de p53y NOXA inducida por Terfenadina	107
- Figura 32. Localización de la proteína p73 tras el tratamiento con terfenadina	108
- Figura 33. Expresión de los receptores H1 y H4 de la histamina en diferentes líneas tumorales	111
- Figura 34. Expresión del ARNm de los receptores H1 y H4 de la histamina en las líneas celulares	111
- Figura 35. Ensayo de citotoxicidad de la genisteína en SMS-KCNR y MEL-HO	114
- Figura 36. Efecto de la terfenadina sobre la viabilidad de células HCT8, MCF7, SMS-KCNR y MEL-HO	115
- Figura 37. Efecto de la genisteína sobre la citotoxicidad inducida por terfenadina	116
- Figura 38. Imagen representativa de un microarray de membranas teñido con Bradford, del autorradiograma obtenido tras la incubación con el radioligando [³ H]-NMS e histograma con la densidad de lugares de unión para la [³ H]-NMS	118
- Figura 39. Autorradiograma y curvas desplazamiento de la fijación del antagonista de los receptores muscarínicos [³ H]-NMS en presencia de concentraciones crecientes de terfenadina	120
- Figura 40. Efecto de la terfenadina sobre la viabilidad de células HEK-293	122
- Figura 41. Imágenes de los cultivos celulares de HEK-293 tratadas con terfenadina y sin tratar	122
- Figura 42. Efecto del tratamiento con KCl sobre las células MEL-HO y SMS-KCNR	123
- Figura 43. Imágenes de cultivos celulares de MEL-HO control y tratadas con diferentes concentraciones de KCl	124
- Figura 44. Caracterización y cuantificación de la muerte inducida	

por KCl	125
-Figura 45. Fijación de [³ H]-DHR a membranas celulares	126
-Figura 46. Imagen representativa de un autorradiograma obtenido tras la incubación con el radioligando [³ H]-DHR y tras la tinción de dicho microarray con Bradford	127
-Figura 47. Autorradiograma representativo del desplazamiento de la [³ H]-DHR por la terfenadina en MEL-HO, A375 y HEM-2710 y curva de competición de la fijación de [³ H]-DHR en presencia de concentraciones crecientes de terfenadina	128
-Figura 48. Efecto generado por la rotenona y la terfenadina sobre el complejo I mitocondrial en presencia de decilubiquinona en homogenizados de membranas celulares de rata Sprague Dawley (corazón) durante 730 segundos	129
-Figura 49. Efecto generado por la rotenona y terfenadina sobre el complejo I en ausencia de decilubiquinona en homogenizados de membranas celulares de rata Sprague Dawley (corazón) durante 40 minutos	130
-Figura 50. Efecto generado por la rotenona y terfenadina sobre la actividad CcO en homogenizados de membranas celulares de rata Sprague Dawley (corazón) durante 960 minutos	131
-Figura 51. Efecto de la terfenadina sobre los niveles de calcio intracelulares de las células HCT8	134
-Figura 52. Efecto de la rotenona en los niveles de calcio intracelulares de las células HCT8	135

Figuras del apartado Discusión

-Figura 53. Esquema representativo de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en la mitocondria	152
--	-----

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas del apartado Introducción

- Tabla 1. Incidencia de cáncer (excluyendo cáncer de piel no melanoma) en España por edad en 2012 y predicción para 2015	11
- Tabla 2. Localizaciones de cáncer más frecuentes en España en 2012 (según total de nº de casos, siguiendo orden decreciente)	12
- Tabla 3. Combinaciones de quimioterápicos más habituales en algunos de los cánceres más comunes	20
- Tabla 4. Clasificación funcional basada en características bioquímicas de los tipos de muerte celular	27
- Tabla 5. Localización y funciones de los receptores de la histamina en los seres humanos	52
- Tabla 6. Antihistamínicos H1 comercializados	53

Tablas del apartado Materiales y Métodos

- Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados	67
- Tabla 8. Anticuerpos secundarios utilizados	68
- Tabla 9. Medios de cultivo requeridos por las diferentes líneas celulares utilizadas	72
- Tabla 10. Concentraciones de BSA utilizadas en la recta patrón para la cuantificación de proteína	77
- Tabla 11. Porcentaje de poliacrilamida utilizado en función de la proteína de interés	78
- Tabla 12. Composición del <i>running gel</i> según su porcentaje de acrilamida	78
- Tabla 13. Composición del <i>stacking gel</i> al 4% de acrilamida	78
- Tabla 14. Componentes del gel de poliacrilamida con SDS y su función	79
- Tabla 15. Composición del tampón de transferencia	81
- Tabla 16. Composición de las soluciones bloqueantes de bloqueo	82
- Tabla 17. Reacción de retrotranscripción con iScript™	88
- Tabla 18. Cebadores utilizados para PCR convencional	90

Tablas del apartado Resultados

- Tabla 19. Efecto de la terfenadina y la fexofenadina en la viabilidad celular en 7 líneas tumorales. Cálculo del IC50	100
- Tabla 20. Cuantificación relativa de la expresión de HRH1 y de HRH4	112
- Tabla 21. Efecto del tratamiento con terfenadina y fexofenadina en la viabilidad celular en 4 líneas tumorales en medio sin SBF. Cálculo del IC50	115

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial y un problema de salud prioritario. Cada año la incidencia del cáncer aumenta, y a pesar de que la mortalidad disminuye gracias a los avances en el tratamiento y al diagnóstico precoz, la tasa de supervivencia a esta enfermedad continúa siendo preocupante. Por ello, es primordial fomentar la búsqueda y conocimiento de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

Trabajos previos del grupo han demostrado que la terfenadina, un antagonista del receptor H1 de la histamina, tiene un potencial antitumoral en el melanoma. Este antihistamínico induce, en líneas celulares de melanoma humano, muerte celular por apoptosis, estrés reticular, liberación de calcio al citosol, activación de la ruta mitocondrial apoptótica y daño en el ADN. El tratamiento con terfenadina induce, además, autofagia y producción de radicales libres. Sin embargo, en células de melanoma, la muerte celular inducida es independiente de la expresión del receptor H1 de la histamina, por lo que su acción antitumoral parece ser debida a rutas moleculares independientes de la ruta que utiliza la histamina cuando se une a sus receptores específicos.

El objetivo general de esta tesis doctoral es analizar el efecto antitumoral de la terfenadina en otros tipos tumorales humanos como son el adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama y neuroblastoma. Además queremos identificar la diana molecular a través de la cual la terfenadina ejerce su acción antitumoral.

Los resultados han demostrados que la terfenadina induce apoptosis de manera dosis-dependiente en las líneas tumorales humanas de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama y neuroblastoma, además de en otras 4 líneas de melanoma humano. Este efecto citotóxico se debe exclusivamente a la molécula de la terfenadina y no a su metabolito activo fexofenadina, ya que al tratar las células con éste, la viabilidad de las células tumorales no se modifica. Como en el melanoma, el tratamiento con terfenadina indujo apoptosis acompañado del proceso de autofagia.

Hemos estudiado también el mecanismo molecular mediante el cual la terfenadina induce apoptosis en las diferentes líneas tumorales. En este sentido el análisis de la

fosforilación de la histona H2A.X y de la quinasa ATM corrobora que la terfenadina provoca daño en el ADN lo que estimula la activación de la ruta p53/p73 y desencadena la muerte de las células a través de la vía apoptótica mitocondrial.

En cuanto a la identificación de la diana molecular de la terfenadina, hemos descartado la participación de los receptores H1 y H4 de la histamina, los receptores muscarínicos y los canales de potasio hERG en la muerte celular inducida por terfenadina y hemos demostrado que la terfenadina actúa sobre el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. En microarrays de membranas aisladas de las líneas tumorales, la terfenadina desplaza la fijación la [³H]-Dihidrorotenona ([³H]-DHR), un conocido inhibidor del complejo I mitocondrial, lo que demuestra que se une con gran afinidad y especificidad al complejo I mitocondrial. Esta unión tiene, además, un efecto inhibitorio de la actividad del complejo I tal y como se demuestra en ensayos de detección de la actividad NADH deshidrogenasa. Para comprobar si la inhibición del complejo I mitocondrial explica el efecto antitumoral de la terfenadina, analizamos la salida de calcio al citosol en presencia de terfenadina o rotenona. Comprobamos que ambas drogas incrementan de manera similar la salida del calcio al citosol, lo que desencadena los acontecimientos que conducen a la apoptosis. En conclusión, este estudio nos permite afirmar que la diana molecular de la terfenadina es el complejo I mitocondrial lo cual proporciona una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer y demuestra el gran potencial de la terfenadina como agente antitumoral.

INTRODUCCIÓN

I-EL CÁNCER

El cáncer puede definirse como una enfermedad en la cual las células normales comienzan a multiplicarse sin control debido a una serie de mutaciones que controlan los mecanismos de crecimiento y división de las células que hacen que éstas se dividan incesantemente y tiendan a acumularse dando lugar a una masa, que generalmente se denomina tumor (AACR Cancer Progress Report 2013, American Cancer Society). Además, las células tumorales habitualmente presentan también alteraciones en los mecanismos de muerte celular.

1-Tipos de cáncer

Neoplasia es el término que se utiliza en medicina para designar una masa anormal de tejido y se produce porque las células que lo constituyen se multiplican a un ritmo superior al normal. Los tumores o neoplasias pueden clasificarse en dos tipos:

-Tumores benignos: la neoplasia o tumor se extiende solo localmente; esto implica que el tumor no crece de forma desproporcionada ni agresiva, no invade tejidos adyacentes y no metastatiza en tejidos u órganos distantes. Las células de los tumores benignos permanecen juntas y a menudo están rodeadas por una membrana de contención o cápsula. Los tumores benignos no constituyen generalmente una amenaza para la vida, pueden extirparse y en la mayoría de los casos, no reaparecen (Lowell y cols., 2008).

-Tumores malignos: el tumor se comporta de una forma agresiva invadiendo los tejidos próximos y diseminándose a distancia. Estos tumores tienen un crecimiento rápido e infiltrante que destruye los tejidos y originan metástasis con facilidad. Así, las células pueden invadir y dañar tejidos y órganos cercanos al tumor o pueden separarse del tumor primario y, a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo alcanzar otros órganos distantes propagándose y dando lugar a metástasis (Clark, 1991).

Existen muchos tipos de cáncer y son numerosas las clasificaciones que se han realizado a lo largo de los años. En general, podemos clasificarlos en 5 categorías

genéricas en función del tejido celular a partir del cual se originan (U.S. National Cancer Institute 2014; www.cancer.gov):

-Carcinoma: tipo de cáncer de origen epitelial, es decir, de los tejidos que recubren una superficie o cavidad del cuerpo o que forman las glándulas. Son tumores malignos y representan el 80-90% de todos los casos de cáncer, por lo que se considera uno de los cánceres más comunes. Los carcinomas se dividen en dos subtipos principales:

*Adenocarcinoma: se origina a partir de tejido glandular, es decir, a partir de las células que constituyen el revestimiento interno de las glándulas de secreción externa que son las encargadas de sintetizar y verter los productos generados. Adenocarcinoma de pulmón, próstata, colon y mama son algunos de los tumores que se incluyen en esta categoría.

*Carcinoma de células escamosas: aparece en la capa superior de las células de la piel y por lo general, crece lentamente. Es el segundo tipo más frecuente de cáncer de piel. Se diferencian dos formas:

-Carcinoma de Células basales o basocelular: se originan en las células del estrato basal de la epidermis y raramente dan lugar metástasis. Abarca alrededor del 78% de todos los cánceres cutáneos.

-Carcinoma de células escamosas o espinocelular: se origina a partir de las células espinosas de la epidermis y es el responsable del 20% de los cánceres de piel.

-Sarcoma: se origina en los huesos o en los tejidos blandos del organismo, es decir, los tejidos que componen el sistema musculoesquelético o encargados del sostén de los distintos órganos (tendones, grasa, músculos nervios, pared de vasos sanguíneos, etc.). Representa cerca del 1% de los tumores de adultos y el 15-20% de los tumores de niños. Frecuentemente son diagnosticados erróneamente ya que pueden ser confundidos con lesiones deportivas. Muchos de los sarcomas son resistentes a los tratamientos utilizados actualmente.

Dependiendo de la célula que lo origina pueden recibir diferentes nombres:

*Osteosarcoma: neoplasia maligna de células fusiformes que tiene como rasgo común la producción de hueso inmaduro u "osteoides". Es el cáncer óseo más común en los niños, generalmente se presenta en adolescentes ya que es la etapa en la que están creciendo de manera rápida.

*Liposarcoma: sarcoma de origen mesodérmico derivado del tejido adiposo. La localización más frecuente es en las extremidades inferiores, aunque también puede estar localizado en el retroperitoneo, brazos, tórax, y cuello. Los tumores del tejido adiposo constituyen uno de los grupos más numerosos de neoplasias de los tejidos blandos y los liposarcomas, en particular, son los sarcomas más comunes en el adulto (Weiss y cols., 2001).

*Condrosarcoma: tumor maligno que se produce a partir de células cartilaginosas. El condrosarcoma primario es muy poco común, aparece principalmente en el hueso, y se encuentra en los niños. El condrosarcoma secundario se debe a defectos benignos del cartílago como osteocondroma o encondroma.

*Angiosarcoma: Sarcoma que se origina en la capa más interna - endotelio - de los vasos sanguíneos, o vasos linfáticos, de cualquier tejido del organismo. Es una variedad de sarcoma poco frecuente que representa el 2% del total de sarcomas extirpados. Aparece con más frecuencia en áreas de la cabeza, cuello, mama, hueso, hígado y bazo. Es un tumor bastante agresivo y de rápido crecimiento que tiene la particularidad de tender a reproducirse en el mismo lugar en el que se ha extirpado, por ello la cirugía no siempre es satisfactoria y se suele complementar con tratamientos de quimioterapia o radioterapia.

-Leucemia: se origina en el tejido hematopoyético, a partir de la transformación de células hematopoyéticas; generalmente comienza en la médula ósea y se extiende por la sangre a otras partes del cuerpo, incluyendo los ganglios linfáticos. En la leucemia no existe tumoración, sino que se afecta la sangre y la médula ósea. Se

clasifican en función del tipo de célula alterada en: leucemia mieloide y leucemia linfoide.

Asimismo, en función del estado de maduración de las células, se pueden diferenciar:

*Leucemia aguda: formada fundamentalmente por células inmaduras.

*Leucemia crónica: constituida por células que se encuentran en el último paso de la maduración.

-Linfoma: neoplasia que se desarrolla en el sistema linfático, que forma parte del sistema inmunitario. Es una proliferación maligna de linfocitos, generalmente dentro de los nódulos o ganglios linfáticos, pero que en ocasiones también afecta a otros tejidos como el hígado o el bazo. Los dos tipos principales de linfomas son el linfoma de Hodgkin y los linfomas no-Hodgkin (AECC, Asociación Española Contra el Cáncer 2014, www.aecc.es).

-Mieloma: tipo de cáncer cuyo origen es la médula ósea y que se produce por una proliferación descontrolada de las células plasmáticas, que forman parte del sistema inmune, encargadas de la producción de anticuerpos en respuesta a infecciones y enfermedades de origen externo. Es una enfermedad relativamente frecuente que incide principalmente en personas mayores de 50 años; es responsable del 10 % de los cánceres hematológicos.

2-Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial y por ello un problema de salud prioritario. En 2012, por ejemplo, fue la causa de 8,2 millones de defunciones (O.M.S., Organización Mundial de la Salud 2012, <http://www.who.int/es/>). Cada año la incidencia del cáncer aumenta en España (tabla 1), pero también disminuye su mortalidad, lo cual refleja los avances en el diagnóstico precoz y su tratamiento. El envejecimiento de la población y la supervivencia cada vez mayor de los enfermos de cáncer han supuesto un

aumento significativo del número de pacientes que padecen o han padecido cáncer.

Tabla 1. Incidencia de cáncer (excluyendo cáncer de piel no melanoma) en España en 2012 y predicción para 2015. (Ferlay y cols., 2012).

Año	Número estimado de nuevos casos	Hombre	Mujer	Ambos sexos
2012		128550	86984	215534
	< 65 años	46202	39225	85427
	> = 65 años	82348	47759	130107
2015		135954	91122	227076
	< 65 años	48555	40487	89042
	> = 65 años	87399	50635	138034
Cambio demográfico		7404	4138	11542
	< 65 años	2353	1262	3615
	> = 65 años	5051	2876	7927

Los tipos de cáncer más frecuentes son el cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon, mama y esófago. Existen diferencias entre hombre y mujeres a la hora de desarrollar cáncer, siendo la incidencia mayor en hombres respecto a mujeres así como también lo es el incremento previsto para 2015 (figura 1).

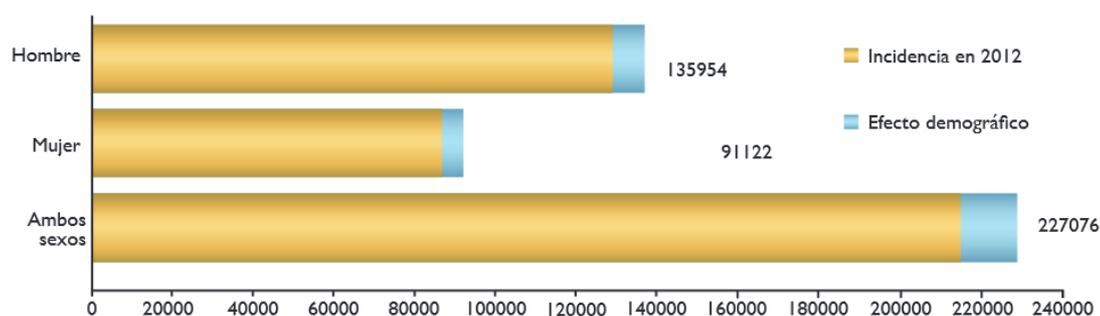


Figura 1. Incidencia de cáncer en España en ambos sexos en 2012 y predicción para 2015. (Ferlay y cols., 2012).

Además, las localizaciones más frecuentes de cáncer también son diferentes según el sexo, siendo más frecuente en hombres el cáncer de próstata y pulmón, y en mujeres el cáncer de mama y el colorrectal (tabla 2)

Tabla 2. Localizaciones de cáncer más frecuentes en España en 2012 (según total de n° de casos, siguiendo orden decreciente). (Ferlay y cols., 2012).

	Hombre	Mujer	Ambos Sexos
1°	Próstata	Mama	Colorrectal
2°	Pulmón	Colorrectal	Próstata
3°	Colorrectal	Cuerpo de Útero	Pulmón
4°	Vejiga	Pulmón	Mama
5°	Estómago	Ovario	Vejiga

En 2013, la OMS puso en marcha el Plan de Acción Global para la Prevención y el Control de las Enfermedades No Transmisibles 2013-2030 que tiene como objetivo reducir la mortalidad prematura en un 25% por el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades respiratorias crónicas.

La OMS y el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, organismo especializado que depende de ella, colaboran con otras organizaciones de las Naciones Unidas y asociados con el fin de aumentar el compromiso con la prevención y control del cáncer, coordinar la investigación y fortalecer los sistemas de salud locales y nacionales.

3-Genes y cáncer

La identificación e interpretación de las alteraciones genéticas presentes en la célula cancerosa han sido objetivo de la investigación oncológica durante más de un siglo. La secuenciación exhaustiva del genoma del cáncer en una amplia variedad de tumores humanos ha supuesto un avance muy importante a la investigación del cáncer. En los próximos años se dispondrá de catálogos completos de mutaciones somáticas en decenas de miles de distintos cánceres humanos. Esta información genética está ya siendo utilizada para mejorar el diagnóstico y dirigir el tratamiento de esta enfermedad.

El cáncer es una enfermedad genética y epigenética con mutaciones somáticas en una o varias células que se expanden clonalmente de manera no regulada junto a cambios epigenéticos que se heredan de forma estable en cada división celular. Las mutaciones somáticas pueden ser de diversos tipos: sustituciones, inserciones

o deleciones de bases; reordenamientos más extensos, variaciones en el número de copias, etc. Los genes que participan en la carcinogénesis constituyen un subconjunto específico del genoma cuyos productos proteicos están implicados en actividades celulares tales como la progresión a través del ciclo celular, la reparación de daño en el ADN y la adhesión celular (Stratton, 2011).

El 90-95% de los individuos que desarrolla un cáncer lo hace de forma espontánea, es decir, no existe ningún factor hereditario que aumente su probabilidad de padecer la enfermedad. En estos casos la enfermedad suele aparecer a una edad avanzada y generalmente como consecuencia de la acumulación gradual de las mutaciones somáticas ocurridas desde el estado de embrión hasta la edad adulta del individuo. Existe, en cambio, un pequeño porcentaje de pacientes, entre un 5 y un 10%, en el que la aparición del cáncer guarda una estrecha relación con la presencia de factores genéticos de susceptibilidad que porta el individuo desde su nacimiento. Se habla entonces de cáncer hereditario, que son consecuencia de mutaciones germinales en genes concretos que incrementan la susceptibilidad para padecer un cáncer. Esta susceptibilidad se transmite entre los miembros de la familia de acuerdo a distintos patrones de herencia aunque no implica la certeza de desarrollarlo en todos los casos. En los últimos años se han identificado alrededor de 50 genes implicados en otros tantos síndromes de predisposición hereditaria al cáncer y se han desarrollado técnicas para su estudio y la caracterización de sus mutaciones (Cascón, 2011).

*** Protooncogenes y oncogenes**

Los protooncogenes son genes incluidos en el genoma humano que regulan el crecimiento y la diferenciación celular. Las proteínas se expresan en diferentes momentos del ciclo y son imprescindibles para su regulación. Determinados cambios estructurales y/o funcionales en los protooncogenes contribuyen a la malignización de la estirpe celular, convirtiéndolos en oncogenes. Estos oncogenes originan proteínas con expresión/función alterada que favorece el crecimiento y/o la invasividad tumoral (Todd y cols., 1999).

La investigación de estos genes ha ido asociada a los avances que se han realizado en biología molecular sobre los oncogenes virales. De esta manera se descubrió la

relación entre el virus del papiloma humano (HPV) y el cáncer de cérvix, virus de la hepatitis B (VHB) y cáncer hepático, o virus de Epstein-Barr (VEB), y linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo, entre otros.

Los oncogenes sólo precisan estar mutados en un alelo para que se produzca la sobreexpresión de una proteína dada y ésta ejerza su acción promotora. El paso/activación de protooncogén a oncogén se puede producir por diferentes mecanismos:

-*Translocación*: cuando una parte de un cromosoma se liga a otro. El resultado es un híbrido de cromosoma, detectable en el cariotipo. Esto da lugar a una alteración en la transcripción del ADN.

-*Mutaciones puntuales*: sustitución de un par de bases por otro par en una secuencia de ADN, por ejemplo G:C por A:T.

-*Amplificación*: una de las copias de un gen se multiplica miles de veces, aumentando su tasa de expresión y dando lugar a la amplificación del gen. Es uno de los mecanismos más habitualmente implicados en la carcinogénesis.

-*Mutagénesis por inserción*: producida por la inserción del ADN del virus en el genoma del huésped.

Entre los virus oncogénicos, podemos distinguir entre los pertenecientes al grupo de los retrovirus y los pertenecientes al grupo de los ADN-virus.

En una infección retroviral, el virus se integra en el cromosoma de la célula infectada, previa conversión de su ARN en cadena doble de ADN en el citoplasma. Este provirus puede insertarse en el genoma cerca de un protooncogén. Cuando el virus se reproduce, el protooncogén (o parte de él) puede incorporarse en el genoma viral. Tras ciclos repetidos de infección viral y reproducción, el protooncogén que porta puede mutar y/o reordenarse en el genoma de modo que se convierte en oncogén. Algunos ejemplos de estos virus son los virus de la leucemia humana 1 y 2 (HTLV-1 y HTLV-2).

Por otro lado, los ADN-virus se integran en el genoma del huésped de forma permanente. Pueden expresar de esta manera genes como E1A y E1B que inactivan p53 y pRB, y también estimular la ciclina A y E. Algunos ejemplos son el

Ag E1A de los adenovirus, el Ag T del SV-40, y la proteína E6 en el HPV. Se han constatado tres tipos de virus con importancia oncogénica clínica (Chial, 2008):

- Los herpesvirus, como el virus de Epstein-Barr en relación con linfoma Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo.
- Los hepadnavirus, como el virus de la hepatitis B en relación con el hepatocarcinoma.
- Los papilomavirus en relación con el carcinoma de cérvix, anorrectal, esófago y piel.

***Genes supresores de tumores**

Los genes supresores de tumores controlan el ciclo celular evitando el crecimiento excesivo e inhiben el crecimiento celular en condiciones normales. Cuando se produce una mutación en estos genes, sus proteínas no se expresan o dan lugar a proteínas no funcionales, favoreciendo la carcinogénesis al no existir un control de la proliferación celular. Para que estos genes supresores adquieran su capacidad oncogénica, necesitan sufrir mutaciones independientes en ambos alelos, de manera que pierdan completamente su capacidad funcional. Como consecuencia, el crecimiento celular queda sin regulación, produciéndose una proliferación descontrolada que puede conducir a la formación de tumores. La alteración, por lo tanto, se manifiesta con carácter recesivo. También puede ser heredada esta alteración en la línea germinal, lo que explicaría el carácter hereditario de determinados tumores cuya frecuencia es elevada en una misma familia. En este caso, uno de los alelos ya se hereda alterado, por lo que sólo se necesita una mutación en el otro alelo para que se manifieste la enfermedad (sensibilidad familiar).

Los mecanismos por los cuales se puede alterar la expresión de los genes supresores son similares a los descritos para los protooncogenes. Son numerosos los genes supresores de tumores estudiados, entre los más conocidos tenemos p53, retinoblastoma (RB), DCC, MCC, APC, NF1, NF2 y WT-1 (Sherr, 2004).

4-Epigenética y cáncer

La epigenética estudia procesos químicos que regulan la cromatina sin afectar a la secuencia del ADN. En los últimos años estos procesos han adquirido un especial protagonismo en el estudio del genoma humano. Los procesos epigenéticos tienen un papel fundamental en la regulación de la diferenciación celular y sus alteraciones están relacionadas con numerosas patologías como el cáncer.

La metilación del ADN genómico es una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas. En mamíferos, la metilación ocurre principalmente en citosinas seguidas de guaninas (dinucleótidos CpG). Los dinucleótidos CpGs se encuentran distribuidos de manera asimétrica en el genoma humano. Así, las regiones promotoras de muchos de genes tienen una elevada densidad de estos dinucleótidos que se agrupan en unas estructuras denominadas islas CpGs. En células sanas, estas islas CpG están generalmente no metiladas. Sin embargo, muchas de estas islas se hipermetilan aberrantemente en el cáncer. La hipermetilación de las mismas se asocia normalmente con la represión de la expresión del gen en el que se encuentran. Por tanto, cuando la hipermetilación ocurre en genes supresores de tumores, favorece de forma específica el proceso tumoral.

Otro tipo de modificaciones epigenéticas importantes son las modificaciones postranslacionales de las histonas. Se trata de modificaciones reversibles que tienen lugar en su cola amino-terminal y que incluyen acetilación de lisinas y argininas, metilación de lisinas, fosforilación de residuos de serina y ubiquitinización de lisinas entre otras. Estas modificaciones químicas están mediadas por enzimas como las acetil transferasas de histonas (HATs), metil transferasas de histonas (HMTs), deacetilasas de histonas (HDACs) y demetiladas de histonas (HDMs). Se ha propuesto que la combinación de las diferentes modificaciones de las histonas podría participar en la regulación de las funciones de la cromatina (grado de compactación, estabilidad genómica, regulación de la expresión génica, etc.) (Feil y cols., 2012).

5-Tratamiento del cáncer

En los últimos 30 años el tratamiento del cáncer ha evolucionado significativamente en la medida que se han perfeccionado las diferentes modalidades terapéuticas. El desarrollo de un abordaje multidisciplinar ha incrementado la probabilidad de recibir un tratamiento curativo eficaz y personalizado (Ross y cols., 2005).

Los tratamientos existentes son muy variables y dependen de un gran número de factores que incluyen el tipo de cáncer, el lugar del cuerpo donde se desarrolla el tumor, el tamaño del tumor así como el estado físico del paciente. Los diferentes tipos de tratamientos se utilizan normalmente combinados, ya sea simultáneamente o secuencialmente. Algunos de los tratamientos más comunes usados para el tratamiento contra el cáncer son los siguientes:

-Cirugía: es el tratamiento más antiguo para el cáncer y muchas veces la primera elección para tratar los tumores sólidos. En los casos donde el cáncer se detecta en un estadio temprano, la cirugía puede ser suficiente para curar al paciente y eliminar todas las células cancerosas. Se aplica especialmente en aquellos casos en los que el tumor está bien delimitado y no se ha extendido a otras partes del cuerpo. Gracias a los avances de las técnicas quirúrgicas cada vez es más factible retirar el tumor sin causar daños en los tejidos sanos o en las funciones vitales de los órganos; sin embargo, es habitual extirpar parte del tejido circundante (denominado márgenes) (AACR Cancer Progress Report 2011, American Cancer Society).

Hoy en día, la cirugía es una importante arma terapéutica para la prevención del cáncer. Cuando se conoce de antemano que una persona tiene una elevada probabilidad de desarrollar cáncer, se hace necesaria una intervención quirúrgica. Esta situación se presenta, por ejemplo, en las personas que tienen pólipos en el colon, los cuales pueden ser premalignos. En tal caso, la cirugía de extirpación se considera una medida preventiva. Otras situaciones de alto riesgo se presentan cuando hay una predisposición genética; tal es el caso del gen BRCA-1 en el caso del cáncer de mama, en el que se sugiere a las pacientes la extirpación preventiva

de la glándula mamaria, puesto que las mujeres con esta mutación presentan un 80% de probabilidad de desarrollar dicho cáncer (Hartmann y cols., 1999).

-Radiación: La radioterapia consiste en administrar radiación ionizante que es capaz de alterar el ADN de las células. Dicho efecto es más notable en células en división activa y rápida, y es menor en las células que permanecen sin cambios o que se dividen despacio. Por ello afecta a las células cancerosas, pero también a otras células sanas con un alto índice proliferativo como es el caso de las células sanguíneas, células de los folículos pilosos o células que recubren el tracto gastrointestinal, de ahí sus efectos secundarios.

Este tipo de tratamiento puede ser utilizado en conjunto con la cirugía y/o con otros tratamientos quimioterápicos. La radiación se utiliza frecuentemente antes de la cirugía con el objeto de reducir el tumor todo lo posible si bien se puede aplicar también después de la cirugía para prevenir recidivas. Más de la mitad de todas las personas que padecen cáncer reciben algún tipo de radioterapia.

Para algunos tipos de cáncer, la radioterapia sola resulta un tratamiento eficaz; sin embargo, otros tipos de cáncer responden mejor a los enfoques de tratamientos combinados, que pueden incluir radiación más cirugía, quimioterapia o inmunoterapia (N.C.I., National Cancer Institute 2008, <http://www.cancer.gov/>).

-Quimioterapia: La quimioterapia puede definirse como el uso de diferentes fármacos (solos o en combinación) en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas cuya función es impedir la reproducción de las células cancerosas y detener su crecimiento. Estos fármacos, también denominados citostáticos o fármacos citotóxicos, tienen una gran limitación que es su escasa especificidad. Debido a esta inespecificidad, estos fármacos afectan también a las células y tejidos normales del organismo, sobre todo a aquellos que tienen una división muy activa (como son las células sanguíneas, los folículos pilosos y las células del epitelio de la boca, estómago e intestino), lo que provoca ciertos efectos secundarios: importante pérdida de pelo, trastornos gastrointestinales (náuseas,

vómitos, anorexia, cambios en el sentido del gusto, estreñimiento, diarrea, pérdida de peso, etc.), daños en el riñón o en los nervios periféricos, etc.

Los objetivos de la quimioterapia dependen del tipo de cáncer, del estadio en el que se encuentre el tumor y de si se ha diseminado. La quimioterapia puede administrarse antes del tratamiento quirúrgico o del tratamiento con radioterapia (en cuyo caso se denomina quimioterapia neoadyuvante) con la finalidad de evaluar la efectividad del tratamiento y disminuir el tumor pudiendo mejorar los resultados de la cirugía y de la radioterapia posterior.

En otras ocasiones la quimioterapia se administra después del tratamiento principal (quimioterapia adyuvante), como es la cirugía, con el objetivo de disminuir la posible diseminación a distancia del cáncer. Cuando el tratamiento quimioterápico y la radioterapia se administran a la vez, hablamos de quimiorradioterapia o radioquimioterapia concomitante. En este caso, el fin es potenciar el efecto local de la radiación y actuar de forma sistémica con la quimioterapia (Airley, 2009).

Existen más de 100 fármacos antineoplásicos que habitualmente se usan en combinación, entre los cuales se encuentran agentes alquilantes cuyo mecanismo de acción general es dañar el ADN incorporando grupos alquilo y evitando así la duplicación celular, sustancias análogas de componentes naturales como el 5-fluoracilo, alcaloides vegetales, antibióticos antitumorales e inhibidores de las topoisomerasas. Los tratamientos habituales de quimioterapia incluyen la asociación de varios citotóxicos que actúan con diferentes mecanismos de acción, sinérgicamente, con el fin de disminuir la dosis de cada fármaco individual y aumentar la potencia terapéutica de todas las sustancias juntas (tabla 3) (Corrie, 2011).

Tabla 3. Combinaciones de quimioterápicos más habituales en algunos de los cánceres más comunes. (Corrie y cols., 2011).

Tipo de cáncer	Acrónimo	Fármacos
Mama	CMF	Ciclofosfamida, metotrexato, fluorouracilo
	AC	Adriamicina [®] (doxorrubicina), ciclofosfamida
Linfoma de Hodgkin	MOPP	Mustina (mostaza nitrogenada), Oncovin [®] (vincristina), procarbazona, prednisolona
	ABVD	Adriamicina [®] (doxorrubicina), bleomicina, vinblastina, dacarbazina
Linfoma no Hodgkin	CHOP	Ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina (doxorrubicina), Oncovin [®] (vincristina), prednisolona
Tumor de células germinales	BEP	Bleomicina, etoposido, cisplatino
Estómago	ECF	Epirubicina, cisplatino, fluorouracilo
	ECX	Epirubicina, cisplatino, capecitabina
Vejiga	MVAC	Metotrexato, vincristina, cisplatino
Pulmón	CAV(E)	Ciclofosfamida, Adriamicina [®] (doxorrubicina), vincristina (etoposido)
Colorrectal	FOLFOX	Fluorouracilo, ácido polínico, oxaliplatino

-Vacunas: Las vacunas contra el cáncer están diseñadas para reforzar la capacidad natural del organismo para defenderse, por medio del sistema inmunitario, de las células cancerosas. Las vacunas generalmente contienen proteínas que se encuentran o que son producidas por las células cancerosas y al administrarlas el objetivo se centra en aumentar la respuesta inmune del cuerpo contra las mismas.

Las vacunas contra el cáncer son medicamentos que pertenecen a una clase de sustancias conocidas como modificadores de la respuesta biológica. Los modificadores de la respuesta biológica trabajan al estimular o restaurar la capacidad del sistema inmunitario para combatir las infecciones y enfermedades. Se diferencian dos tipos generales de vacunas contra el cáncer: las vacunas preventivas o profilácticas, cuya finalidad es impedir que se forme el cáncer en

personas sanas; y las vacunas de tratamiento o terapéuticas, cuyo fin es el tratamiento del cáncer ya existente reforzando las defensas naturales del organismo (Lollini y cols., 2006).

La Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado dos tipos de vacunas profilácticas del cáncer: vacunas contra el virus de la hepatitis B, el cual puede causar cáncer de hígado, y vacunas contra los virus del papiloma humano tipos 16 y 18, los cuales son responsables de 70% de los casos de cáncer de cuello uterino o cérvix. La FDA también ha aprobado una vacuna para el tratamiento de cáncer en algunos hombres con cáncer de próstata metastático (Parmiani y cols., 2007).

Aunque los investigadores han identificado muchos antígenos asociados con el cáncer, estas moléculas varían mucho en su capacidad de estimular una fuerte reacción inmunitaria. La identificación de nuevos antígenos asociados con el cáncer que pueden resultar más efectivos en estimular las reacciones inmunitarias que los antígenos ya conocidos así como la creación de métodos para mejorar la capacidad de los antígenos asociados con el cáncer para estimular el sistema inmunitario son dos áreas importantes de investigación. Actualmente, se están creando vacunas de tratamiento contra muchos tipos de cáncer y las están probando en estudios clínicos. También se están realizando investigaciones para determinar cómo combinar muchos antígenos dentro de una sola vacuna de tratamiento del cáncer para producir reacciones inmunitarias óptimas contra esta enfermedad (Schlom y cols., 2007).

-Inhibidores específicos: El desarrollo de los inhibidores específicos representa un enfoque nuevo hacia los tratamientos para el cáncer. Estos fármacos inhiben específicamente la función de ciertas proteínas impidiendo el crecimiento y división de las células cancerosas. No son directamente tóxicos, ya que sólo afectan a las células tumorales, por lo que poseen pocos efectos secundarios.

La especificidad de estos medicamentos también posee una desventaja: bloquear un solo proceso de la célula cancerosa puede ser suficiente para retardar su

proliferación, pero a veces no es suficiente para eliminarla. Es por ello que se utilizan varios tipos de medicamentos específicos junto con la quimioterapia convencional. La combinación de un medicamento específico que es capaz de bloquear funciones concretas de la célula cancerosa, junto con el uso de la quimioterapia convencional, resulta una estrategia más poderosa para erradicar el tumor (U.S. National Cancer Institute 2014; www.cancer.gov).

La identificación de mutaciones activadoras en *BRAF* en el 50-60% de los melanomas abrió la puerta a la investigación de la terapia dirigida. Sorafenib, un inhibidor de las quinasas RAF, ha demostrado un moderado efecto inhibitor de la actividad de la vía de las MAPKs, y poca eficacia clínica cuando es usado como único agente de tratamiento. Sin embargo, se han desarrollado inhibidores de BRAF más potentes y selectivos: PLX4032 (vemurafenib, RG-7204, Zelboraf®) y GSK2118436. Estos fármacos interrumpen la vía de las MAPKs sólo cuando el gen *BRAF* contiene la mutación V600E. Un ensayo clínico de fase III demostró que el tratamiento con PLX4032 reduce el tumor e incrementa la supervivencia en pacientes con la mutación V600E en BRAF de manera más significativa que el tratamiento con dacarbazina. La F.D.A aprobó Zelboraf® (Hoffmann-La Roche Inc.) el 17 de agosto de 2011 para el tratamiento del melanoma metastásico (U S Food and Drug Administration; [/www.fda.gov/](http://www.fda.gov/)).

GSK2118436 también ha mostrado su eficacia en ensayos clínicos de fase I. La ventaja esperada de este fármaco sobre el anterior es su actividad antitumoral en el cerebro, ya que vemurafenib no actúa contra las metástasis cerebrales debido a su dificultad para cruzar la barrera hematoencefálica (Flaherty, 2011).

-Anticuerpos monoclonales: Los anticuerpos monoclonales son un tipo relativamente nuevo de terapia dirigida contra el cáncer. Estos anticuerpos son diseñados para que se unan a antígenos específicos expresados en las células tumorales y ausentes, o con baja expresión, en células normales. Este tipo de tratamiento permite dirigir el tratamiento hacia células específicas, causando una menor toxicidad para las células normales (Creus y cols., 2002). La terapia con anticuerpos monoclonales puede usarse sólo en cánceres cuyos antígenos (y sus

respectivos anticuerpos) hayan sido identificados. Existen varios fármacos de este tipo como Alemtuzumab, Gemtuzumab ozogamicina, Rituximab, Trastuzumab, Ibritumomab tiuxetan que ya se usan para el tratamiento de algunos cánceres (Dillman y cols., 2011).

-Nanomedicina:

Dentro de los avances tecnológicos más recientes para el tratamiento contra el cáncer, la nanomedicina y nanotecnología son una de las vertientes más prometedoras. La nanotecnología se define como el estudio y desarrollo de sistemas a escala nanométrica; y su aplicación a la medicina, nanomedicina. Esta disciplina se encuentra en plena expansión y se están desarrollando importantes avances en el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías. Actualmente existen en uso apenas una decena de medicamentos fruto de la nanotecnología para el tratamiento del cáncer.

Lo habitual en la quimioterapia para el tratamiento del cáncer es utilizar altas dosis de drogas muy potentes como la mitomicina C o la camptotecina, para inducir una respuesta efectiva y destruir las células tumorales. La muerte celular generalmente es proporcional a la exposición al fármaco antitumoral. La solución ideal sería la administración de una concentración efectiva de agentes antitumorales que tuviera gran selectividad de acción sobre los tejidos tumorales (U.S. National Cancer Institute 2014; www.cancer.gov).

En los últimos años se han desarrollado sistemas basados en polímeros hidrófilos reticulados para la liberación de fármacos que tienen gran interés a nivel químico para la ciencia de los materiales y especialmente para su aplicación en farmacología. Estos “sistemas inteligentes” mejoran la eficacia de los fármacos y reducen muy significativamente los efectos adversos.

Los nanogeles o nanohidrogeles son particularmente útiles para la liberación selectiva de fármacos debido a su pequeño tamaño (10-100 nm) ya que en su interior pueden incorporar y retener fluidos biológicos. Además, en su superficie pueden conjugarse con moléculas específicas que les permitan unirse a determinadas células diana de forma muy selectiva debido a la interacción del

ligando conjugado con su receptor específico en la superficie de las células diana. En el interior de la célula diana, los nanogeles liberan su contenido en respuesta a cambios de pH o de temperatura. La variación en cualquiera de estos dos parámetros provoca cambios estructurales en el material que fundamentan su potencial aplicación en biomedicina. En el caso de los nanogeles sensibles a cambios de pH del medio, una pequeña variación en el pH hace que el nanogel se hinche, lo que conlleva el aumento del tamaño de los poros de la red polimérica, facilitando así la liberación de los fármacos (Blanco y cols., 2010).

El ácido fólico es un miembro de la familia de la vitamina B que juega un papel fundamental en la supervivencia celular participando en la síntesis de ácidos nucleicos y aminoácidos (Cortes y cols., 2000). Esta vitamina esencial es también un ligando de alta afinidad que aumenta la especificidad si se conjugan con los fármacos antitumorales y se utilizan contra células tumorales positivas para el receptor del ácido fólico (FR). Se ha demostrado que el FR está sobreexpresado en más del 90% de los carcinomas de ovario, riñón, cerebro, pulmón y mama; en cambio, la mayor parte de los tejidos normales presentan niveles inferiores (Vergote y cols., 2015).

El FR es una proteína de anclaje al glicosilfosfatidilinositol que interactúa con alta afinidad con el ácido fólico conjugado en la nanopartícula y la célula inicia el proceso de endocitosis mediada por receptores. Los endosomas se fusionan con el lisosoma y la variación de pH hace que cambie la conformación del nanogel liberando el fármaco que contiene en su interior.

-Tratamiento con células madre: Las células madre adultas se han utilizado durante décadas para tratar ciertos tipos de cáncer a través de trasplantes de médula ósea. Los trasplantes de médula ósea y de células madre de sangre periférica se usan comúnmente en el tratamiento de leucemias y linfomas, pero también se emplean para el tratamiento de otros cánceres como el neuroblastoma y el mieloma múltiple (AACR Cancer Progress Report 2013, American Cancer Society).

El trasplante de médula ósea y el trasplante de células madre de sangre periférica son procedimientos que restauran las células madre que se destruyen por las dosis elevadas de quimioterapia o de radioterapia. El trasplante de células hematopoyéticas reduce los efectos secundarios de la quimioterapia. Este es un tratamiento vital y con frecuencia puede salvar la vida del paciente debido a que la quimioterapia y la radioterapia afectan generalmente las células que se dividen con rapidez.

Puesto que las células de la médula ósea se dividen con frecuencia, los tratamientos con dosis elevadas de citotóxicos pueden dañar gravemente o destruir la médula ósea del paciente. Si la médula ósea del paciente no está sana, el paciente no puede producir glóbulos sanguíneos necesarios para transportar oxígeno, para combatir las infecciones y para impedir las hemorragias. Los trasplantes de médula ósea y de células madre de sangre periférica reemplazan las células madre destruidas por el tratamiento. Las células madre sanas trasplantadas pueden restaurar la capacidad de la médula ósea para producir los glóbulos sanguíneos que necesita el paciente.

II-MUERTE CELULAR

La muerte celular es consecuencia de la pérdida de estructura o energía de la célula (Clark, 1991). Ocurre debido a la incapacidad de las células para revertir el daño sufrido por algún tipo de agente endógeno o exógeno. La muerte celular es un proceso estrechamente relacionado con el desarrollo fisiológico normal de los tejidos y también juega un papel fundamental como mecanismo de defensa contra numerosas enfermedades humanas, entre ellas el cáncer.

Aunque durante muchos años las investigaciones en el campo de la muerte celular han estado dominadas por criterios morfológicos, son posibles varias clasificaciones en función de distintos parámetros, entre ellos: criterios bioquímicos, características inmunológicas y aspectos funcionales.

1-Clasificación de la muerte celular

La nomenclatura y clasificación utilizada en relación a la muerte celular ha sido confusa a lo largo de los años. Uno de los primeros intentos por clasificar los fenotipos de muerte celular, basado en el análisis morfológico de modelos del desarrollo, fue realizado por Schweichel y Merkel en 1973, quienes identificaron 3 tipos de muerte celular, posteriormente reconocidas como apoptosis, autofagia y necrosis (Scheweichel y cols., 1973).

Desde entonces se han realizado numerosas clasificaciones y debido a la discrepancia existente en la bibliografía en 2005 se creó un comité de nomenclatura sobre la muerte celular (NCCD, *The Nomenclature Committee on Cell Death*) con el fin de unificar criterios. Este comité ha emitido publicaciones de forma periódica (Kroemer y cols., 2005; Kroemer y cols., 2009; Galluzzi y cols., 2012); según la última clasificación realizada en el 2011 (tabla 4), existen diferentes mecanismos que pueden conducir a la muerte celular.

Tabla 4. Clasificación funcional basada en características bioquímicas de los tipos de muerte celular. (Galluzzi y cols., 2012).

Nomenclatura	Bioquímica	Dependencia de caspasas	Inhibidores
Anoikis	-Disminución de EGFR. -Inhibición de ERK1. -Ausencia de β 1-integrina. -Sobreexpresión de BIM. -Activación de caspasa-3, -6 y -7.	++	-Sobreexpresión de Bcl-2. -Administración de Z-VADfmk.
Muerte celular asociada a autofagia	-Lipidación de MAP1LC3. -Degradación de SQSTM1/p62	--	-Inhibidores VPS34. -Silenciamiento de AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12 ó BCN1.
Apoptosis intrínseca dependiente de caspasas	-MOMP. -Disipación irreversible del $\Delta\psi_m$.	++	-Sobreexpresión de Bcl-2. -Administración de Z-VADfmk.
Apoptosis intrínseca independiente de caspasas	-Liberación de proteínas IMS. -Inhibición de la cadena respiratoria.	--	-Sobreexpresión de Bcl-2.
Cornificación	-Activación transglutaminasas y de la caspasa-14.	+	-Silenciamiento de las caspasa-14, de TG1, TG3 ó TG5.
Entosis	-Activación de RHO y de ROCK1.	--	-Silenciamiento de la metalotionina.
Apoptosis extrínseca por receptores mortales	-Señalización de receptores mortales. Activación de caspasa-3, -6, -7, -8 y -10. -Proteólisis de BID y MOMP.	++	-Expresión de CrmA. -Silenciamiento de la caspasa-3 y -8. -Administración de Z-VADfmk.
Apoptosis extrínseca por receptores de dependencia	-Señalización por receptores de dependencia. -Activación de DAPK1. -Activación de caspasa-3, -6, -7 y -9.	++	-Silenciamiento de la caspasa-3, -9 y PP2A. -Administración de Z-VADfmk.
Catástrofe mitótica	-Activación de caspasa-2, de TP53 y TP73. -Arresto mitótico.	--	-Silenciamiento de TP53 y de la caspasa-2.
Necroptosis	-Señalización por receptores mortales. -Activación de RIP1 y/o RIP3. -Inhibición de caspasas.	--	-Administración de necrostatinas. -Silenciamiento de RIP1 y/o RIP3.
Netosis	-Inhibición de caspasas. -Liberación de NET. -Activación de NADPH oxidasa.	--	-Inhibición de la autofagia. -Silenciamiento de PAD4. -Inhibición de NADPH oxidasa.
Partenatos	-Disipación irreversible del $\Delta\psi_m$. -Acumulación de PAR mediada por PARP1.	--	-Inhibición de AIF y PARP1.

	-Depleción de NADH y ATP. -Translocación nuclear de AIF y unión de AIF a PAR.		
Pirotosis	-Activación de la caspasa-1 y -8. -Secreción de IL-1 β e IL-18.	++	-Administración de Z-YVADfmk. -Silenciamiento de la caspasa-1.

Como se aprecia en la tabla 4, existen muchos tipos de muerte celular pero solo algunos tienen importancia desde el punto de vista farmacológico en las células tumorales. Por ello, esta introducción se centrará, fundamentalmente, en los mecanismos de muerte celular por apoptosis y muerte celular asociada a autofagia.

2-Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular estrictamente controlado a través del cual la célula se autodegrada sin dañar a las células colindantes. Es un proceso coordinado y dependiente de energía que implica la activación secuencial de diferentes vías moleculares responsables de las características morfológicas y bioquímicas de la célula.

La pérdida de la regulación de la apoptosis, tanto por exceso como por defecto, es la causa de numerosas patologías. Una de las características del cáncer es la pérdida de la capacidad apoptótica de las células; ahí radica el gran interés en el estudio terapéutico de fármacos inductores de apoptosis.

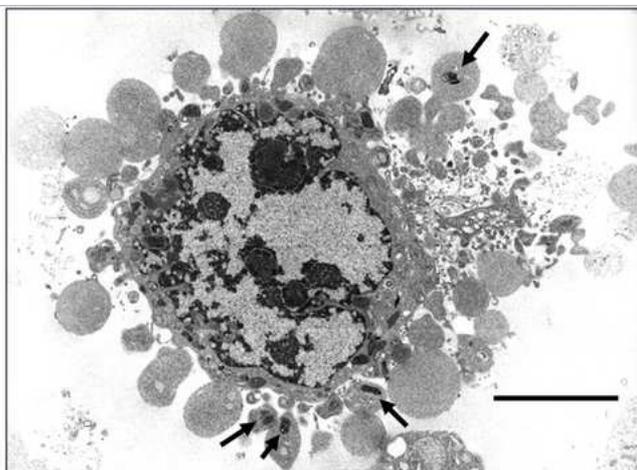


Figura 2. Aspectos morfológicos de la apoptosis mediante microscopía electrónica de transmisión. Apoptosis en fibroblastos de ratón 3T3. Se puede observar la alteración de la membrana plasmática y la formación de *blebbs apoptoticos* (flechas) (barra: 5 μ m). (Croft y cols., 2005).

El proceso apoptótico implica cambios morfológicos visibles en la célula. Así, inicialmente se produce una constricción o encogimiento de la membrana (figura 2), disminuye el tamaño celular y se agrupan los orgánulos, pareciendo el citoplasma más denso.

La cromatina se condensa en la periferia, debajo de la membrana celular, en masas bien definidas (figura 3). Posteriormente el núcleo se fragmenta, formándose al mismo tiempo vesículas citoplasmáticas y los denominados cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos se componen de citoplasma y orgánulos empaquetados; pueden contener también fragmentos nucleares, pero siempre rodeados de membrana. Son rápidamente fagocitados por los macrófagos y por las células sanas adyacentes del parénquima, donde se degradan con rapidez dentro de los lisosomas, gracias a su actividad enzimática. Seguidamente las células adyacentes son capaces de migrar o proliferar reemplazando así el espacio ocupado por la célula muerta (Galluzzi y cols., 2012).

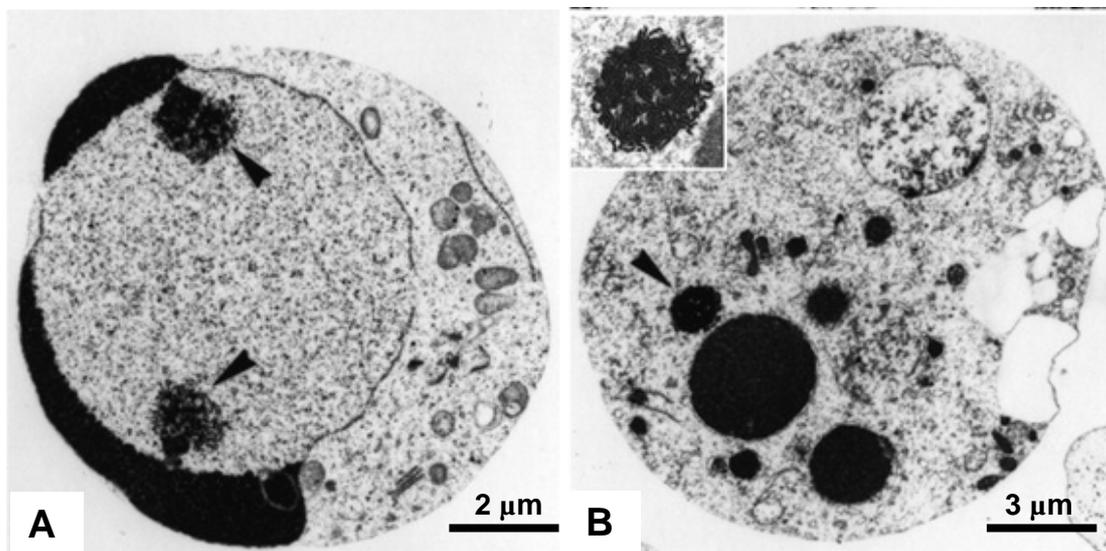


Figura 3. Cambios ultraestructurales de la apoptosis mediante microscopía electrónica de transmisión. Apariencia microscópica electrónica de transmisión de las células de eritroleucemia K562. Fase temprana (A) y tardía (B) de la apoptosis en la que se aprecia la condensación de la cromatina y la posterior fragmentación del núcleo. Las flechas apuntan a los nucleolos. Podemos observar con aumento mayor uno de los nucleolos (B). (Ziegler y cols., 2004).

2.1-Fases de la apoptosis

El proceso apoptótico puede dividirse en 3 etapas: la primera fase es la de iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; la segunda fase o de ejecución, es en la que acontecen la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos del proceso; y por último la etapa de degradación o eliminación, en la que los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes (Elmore, 2007).

-Fase de iniciación: la muerte celular puede ser desencadenada por diferentes señales, y dependiendo de la naturaleza del estímulo la vía apoptótica activada será diferente. Se pueden definir 3 vías de iniciación de la apoptosis: la vía intrínseca, originada generalmente por un estrés biológico; la vía extrínseca, provocada por la unión de un ligando a un receptor de membrana asociada a una señal extracelular; y la vía citotóxica que se produce en la respuesta inmune mediada por linfocitos T.

-Fase de ejecución: la célula ya ha recibido la señal inductora, pierde el contacto con las células colindantes y empiezan los cambios morfológicos más característicos de la apoptosis. En esta fase se activa la cascada de caspasas y es el punto donde convergen prácticamente todos los estímulos iniciadores de la apoptosis.

-Fase de degradación: se compacta la cromatina y se condensa el citoplasma. Las membranas celulares permanecen intactas, formando unas protuberancias en sus superficies, que finalmente engloban los orgánulos celulares, formando los denominados cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos.

2.2-Rutas apoptóticas

La apoptosis puede ser activada principalmente por dos vías de señalización:

-Vía intrínseca o mitocondrial: las señales de muerte provienen del interior de la célula, normalmente en respuesta a señales de estrés celular, daño en el ADN, niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS), infecciones virales o activación de oncogenes. Las diferentes señalizaciones de estrés celular convergen

en la mitocondria (figura 4), frecuentemente a través de la activación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Ortega-Camarillo y cols., 2001). Éstas regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la liberación al citosol de proteínas apoptogénicas (citocromo *c*, AIF, Smac/DIABLO, etc.), que en condiciones normales se encuentran retenidas en el espacio intermembrana. La mitocondria, por tanto, funciona como un reservorio de moléculas proapoptóticas (Korsmeyer, 1992; Mikhailov y cols., 2001). Entre éstas la más conocida es el citocromo *c*, que al ser liberado al citoplasma se asocia con la proteína adaptadora Apaf-1, la procaspasa-9 y ATP formando un gran complejo proteico denominado apoptosoma (Strasser y cols., 2000). La formación de este complejo provoca la activación de la caspasa iniciadora -9, cuya función es activar la caspasa-3.

Ambas rutas apoptóticas, intrínseca y extrínseca, convergen a nivel de la activación de la caspasa-3.

La salida del citocromo *c* de la mitocondria al citosol no sólo actúa como un factor proapoptótico esencial para la formación del apoptosoma, sino que también da lugar al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, al cese de la producción de ATP, que contribuye también a conducir a la célula a la muerte (Evan y cols., 1998).

Según la intensidad del estímulo inicial, la muerte celular puede desencadenarse por apoptosis o necrosis. Un daño severo con afectación de la mayoría de la población mitocondrial provocará una muerte celular por necrosis; un estímulo moderado que tan sólo afecte a una parte de la población mitocondrial, permitirá mantener el aporte suficiente de ATP para que concluya el proceso apoptótico (Bossy-Wetzel E y cols., 1998).

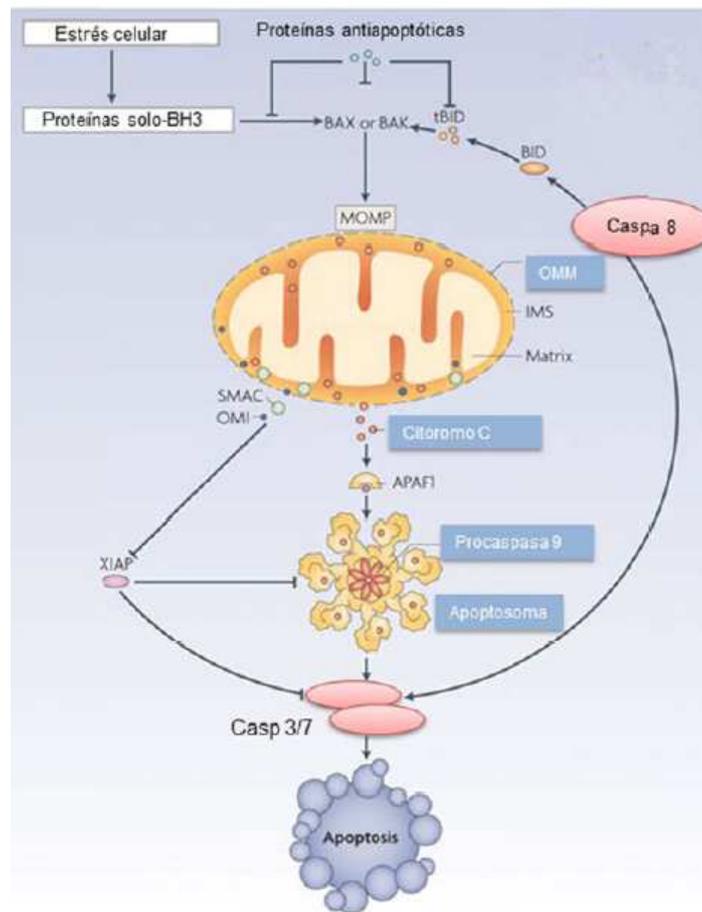


Figura 4. Vía intrínseca de la apoptosis. La mitocondria ocupa el eje central de esta vía. Una vez activada Bax/Bak permite la salida de los factores apoptogénicos de la mitocondria. (Adaptado de Tait y cols., 2010).

-Vía extrínseca o mediada por receptores: esta vía es inducida por señales de estrés extracelular que son detectadas y propagadas por receptores transmembrana específicos. La vía extrínseca de la apoptosis es iniciada por la unión de un ligando de muerte, como Fas/CD95 y su ligando (FasL/CD95L), factor de necrosis tumoral α (TNF α) y Apo2L/ TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), a sus correspondientes receptores de muerte. De forma alternativa la vía extrínseca de inducción de la apoptosis también puede ser activada por “receptores de dependencia”; éstos sólo ejercen su función letal cuando la concentración de su ligando disminuye por debajo de ciertos límites críticos (Wajant 2002; Schutze y cols., 2008; Mehlen y cols., 2011).

El factor de necrosis tumoral TNF- α es una citocina compuesta por 185 aminoácidos y descrita por primera vez en 1975 (Carswell y cols., 1975). Se sintetiza inicialmente como un precursor inactivo de 212 aminoácidos y es procesada posteriormente por la enzima convertidora de TNF- α , (*TACE: TNF- α converting enzyme*). Esta enzima media la rotura de una forma de TNF- α asociada a membrana, lo que induce la formación de la molécula activa (Goto y cols., 2004). Muchos tipos de células la secretan tras su estimulación, como macrófagos, monocitos, neutrófilos, granulocitos, eosinófilos, fibroblastos, células endoteliales, células T y células NK. La molécula secretada es un complejo multimérico compuesto por dos, tres o cinco moléculas unidas no covalentemente (Beutler y cols., 1986).

Otro de los ligandos mortales es CD95L/FasL, una glicoproteína de membrana que se acumula en el citoplasma dentro de cuerpos multivesiculares y es secretado al exterior celular insertado en microvesículas (Martinez-Lorenzo y cols., 1999; Monleon y cols., 2001). FasL se expresa principalmente en linfocitos B, T, NK y células dendríticas, y su capacidad de inducir apoptosis es fundamental tanto en la inmunidad antitumoral como en el mantenimiento de la homeostasis tisular. En el primer caso, la expresión de este ligando en las células efectoras del sistema inmune produce la muerte de la célula diana. En el segundo, su expresión produce la muerte de células T aloreactivas o permanentemente activadas en un proceso conocido como muerte celular producida por activación, AICD (*activation induced cell death*) (Brunner y cols., 1996; Hildeman y cols., 2002).

El último de los ligandos mortales descrito ha sido Apo2L/TRAIL que fue descubierto en 1995 por dos grupos independientes (Wiley y cols., 1995; Pitti y cols., 1996). Consiste en una proteína transmembrana que, en humanos, se expresa en todos los tejidos. La rotura de su extremo C terminal da lugar a la forma soluble de TRAIL. Este ligando se une a sus receptores en la superficie de la célula en forma de homotrímeros, potenciándose así la transmisión de la señal respecto a la unión de la forma monomérica (Kimberley y cols., 2004). Apo2L/TRAIL se puede

unir a cinco receptores, TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1) y TRAIL-R4 (DcR2), aunque sólo dos de ellos inducen apoptosis: DR4 y DR5.

Cuando los ligando mortales se unen a sus receptores específicos (figura 5), la conformación se estabiliza en forma de trímero, que es la manera en la que son activos estos receptores. Además, el ligando induce cambios conformacionales que permiten el ensamblaje de un complejo multiproteico dinámico en la parte citosólica de dichos receptores, lo cual tiene lugar en un dominio de aproximadamente 80 restos aminoacídicos llamado dominio de muerte (DD) (Boldin y cols., 1995). Entre las proteínas reclutadas por el DD en la parte citosólica del receptor se encuentran RIP1 (*receptor-interacting protein kinase 1*), FADD (FAS-associated protein with a DD), múltiples isoformas de c-FLIP, múltiples c-IAP, E3 ubiquitin ligasas y las procaspasas-8 y -10 (Wang y cols., 2001; Lavrik y cols., 2005a). El complejo supramolecular así formado se denomina DISC (*death-inducing signaling complex*) y constituye la plataforma que regula la activación de las caspasas-8 y -10 (Kischkel y cols., 1995). En el caso de TNF, el complejo DISC formado, aunque presenta muchas similitudes, también difiere en algunas proteínas con las anteriormente mencionadas.

La activación de los receptores de muerte no siempre transducen señales de muerte celular, también transducen señales intracelulares tan diferentes como proliferación o supervivencia (Schutze y cols., 2008).

La unión de las caspasas iniciadoras al DISC, vía interacciones homotípicas entre los dominios DED de FAAD y la correspondiente caspasa, induce su cambio conformacional, lo que permite que interaccionen entre ellas produciéndose una ruptura autoproteolítica que las activa completamente. La activación de las caspasas iniciadoras -8 y -10 provoca la activación por proteólisis de las caspasas ejecutoras -3 y -7 (Lavrik y cols., 2005b).

Aunque los mencionados son los receptores más ampliamente estudiados como inductores de muerte por señales extracelulares, no son los únicos. Cada día emergen nuevas evidencias de las vías moleculares por la cual otros receptores también transducen señales intracelulares de muerte celular por apoptosis. Uno de

estos son los receptores de dependencia (figura 5) los cuales inducen la activación de las caspasas, en particular de la caspasa-3. Estos receptores, como Patched y DCC, en ausencia de su ligando, parecen interactuar con la proteína adaptadora citoplasmática DRAL que ensambla un complejo que activa a las caspasa-9. Otro receptor de dependencia, UNC5B, responde a la falta de netrina-1 con el reclutamiento de un complejo de señalización que incluye a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y a la proteína quinasa-1 asociada a muerte (DAPK-1). Estas interacciones multiproteicas conducen a la desfosforilación de DAPK lo cual dispara el potencial proapoptótico de esta proteína (Bialik y cols., 2006; Mille y cols., 2009; Guenebeaud y cols., 2010).

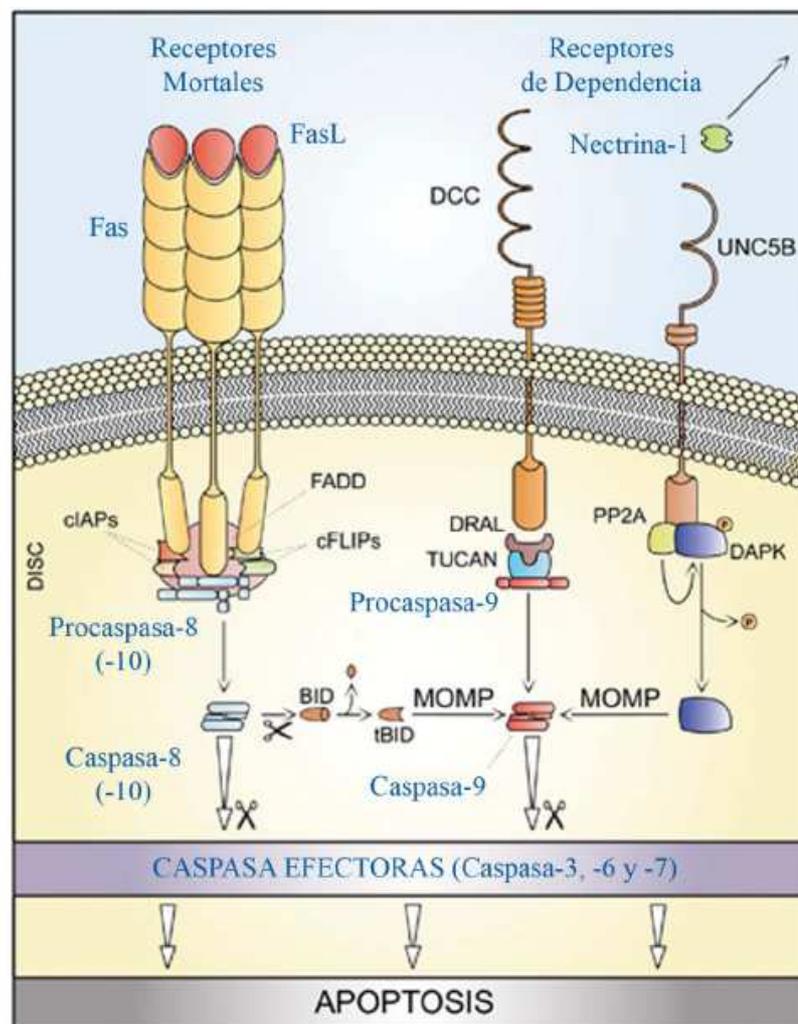


Figura 5. Activación de la vía extrínseca de la apoptosis a través de los receptores mortales o a través de los receptores de dependencia. (Modificado de Galluzi y cols., 2012).

2.3-Proteínas reguladoras de la apoptosis:

-Caspasas

Las caspasas comprenden una familia de proteínas que contienen un residuo nucleofílico de cisteína en el centro activo, el cual participa en la ruptura proteolítica de sustratos que presentan residuos de ácido aspártico; de aquí proviene su nombre (Caspases: “*cysteiny-l-aspartic-acidproteases*”) (Alnemri y cols., 1996). La familia de las caspasas está compuesta por 15 miembros en los cuales se distinguen funcionalmente dos grupos: las caspasas procesadoras de citocinas e involucradas en la inflamación, también llamadas caspasas del grupo I; y las caspasas involucradas en la apoptosis (figura 6). En éstas, a su vez, se diferencian las caspasas iniciadoras o del grupo II (caspasas -8, -9 y -10) y las caspasas ejecutoras o del grupo III (caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7).

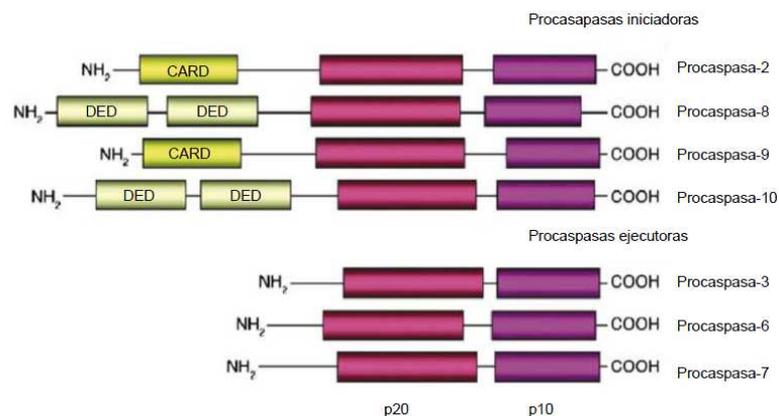


Figura 6. Procaspasas involucradas en la apoptosis. Procaspasas iniciadoras (-2,-8,-9,-10) y procaspasas ejecutoras (-3,-6,-7). (Modificado de Rupinder y cols., 2007).

Las caspasas se expresan en forma de zimógenos como precursores inactivos. Sin embargo, las caspasas iniciadoras son capaces de activarse autocatalíticamente, mientras que las caspasas ejecutoras necesitan activarse mediante su ruptura proteolítica por las caspasas iniciadoras u otras enzimas (Siegel 2006). Todas las caspasas tienen un dominio proteasa de alta homología y este dominio puede ser dividido en dos subunidades, una mayor de aproximadamente 20 kDa y otra menor de aproximadamente 10 kDa. Las caspasas iniciadoras poseen además una cola N-terminal de longitud variable en la que se pueden encontrar diferentes elementos reguladores, como el dominio efector de muerte (DED: *death effector*

domain), presente en las procaspasas -8 y -10 o el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD: *caspase activation recruitment domain*), presentes en las procaspasas -2 y -9 (figura 6). Estos dominios son muy importantes en la activación de estas caspasas ya que median las interacciones homo y heterofílicas entre las caspasas y sus adaptadores (Rupinder y cols., 2007).

Una vez que las caspasas se activan (figura 7), se asocian en tetrámeros de dos subunidades p10 en el interior y dos subunidades p20 en el exterior formando dos centros activos por cada tetrámero. En la subunidad mayor es donde se encuentran los aminoácidos responsables de la acción catalítica, el residuo sulfhidrilo de la cisteína 285 y el residuo imidazólico de la histidina 237. No obstante, el centro activo está formado por restos aminoacídicos tanto de la subunidad pequeña como de la subunidad grande. Durante el proceso de activación de las procaspasas se elimina el extremo N-terminal y el segmento peptídico que une las subunidades catalíticas p20 y p10 (Chowdhury y cols., 2008).

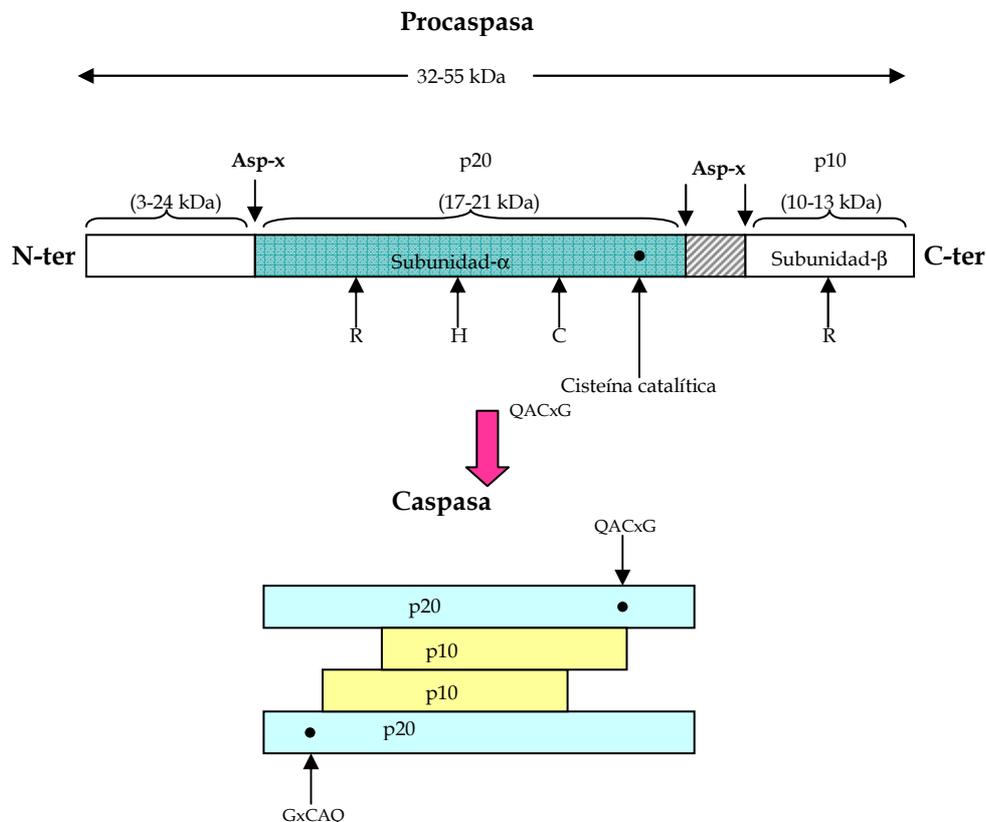


Figura 7. Activación de caspasas. La activación de las procaspasas requiere la formación del tetrámero para constituir las caspasas activas. Son necesarios tres cortes proteolíticos para eliminar el DD y el segmento peptídico que une las subunidades p10 y p20. (Modificado de Chowdhury y cols., 2008).

La activación de las caspasas iniciadoras puede ser tanto por oligomerización (autoactivación) como por acción proteolítica y puede ser desencadenada tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca de la apoptosis. Sin embargo, las caspasas efectoras sólo pueden activarse por acción de enzimas proteolíticas ya sean caspasas iniciadoras u otras enzimas. Una vez activadas destruyen los componentes claves de la estructura celular y con ello desencadenan la muerte celular (Rupinder y cols., 2007; Chowdhury y cols., 2008).

Debido al papel tan importante que juegan estas proteasas en la célula, se encuentran estrictamente reguladas mediante diferentes mecanismos. Uno de ellos lo compone una familia de proteínas denominadas IAPs (*inhibitor of apoptosis protein*), capaces de unirse a caspasas e inhibir su función. Esta familia de proteínas está formada por 8 proteínas muy conservadas en mamíferos y con diferentes patrones de expresión en varios tejidos. En humanos se han identificado 6 de estas proteínas: NAIP, c-IAP1/HIAP-2, c-IAP2/HIAP-1, XIAP/hILP, survivina y BRUCE; todas se caracterizan por la presencia del dominio de 70-80 aminoácidos, de forma que todos los miembros de esta familia contienen de uno a tres copias de este dominio. Las IAPs se unen e inhiben a las caspasas-3, -7 y -9 pero son incapaces de unirse, y por tanto de inhibir, a la caspasa-8 (Roy y cols., 1997; Deveraux y cols., 1999; Mace y cols., 2010).

Las IAPs no son las únicas proteínas capaces de inhibir las caspasas. La proteína c-FLIP (*FLICE inhibitory protein*) por ejemplo, inhibe la activación de la caspasa-8 inducida por la vía extrínseca de activación apoptótica. Esta proteína posee dos copias del dominio DED en su extremo N-terminal, el cual es esencial para su mecanismo de acción. Existen 3 isoformas principales descritas de esta proteína: c-FLIP_L, c-FLIP_S y c-FLIP_R (Oztürk y cols., 2012). Cuando cualquiera de estas isoformas están sobreexpresadas se inhibe la activación de la caspasa-8. Sin embargo, la presencia en baja concentración de la isoforma larga (c-FLIP_L) facilita la activación de la caspasa-8 por heterodimerización (Cantarella y cols., 2014).

-Familia Bcl-2

Las proteínas que conforman la familia Bcl-2 desempeñan un papel clave en el control de la vía intrínseca de la apoptosis y constituyen una pieza clave en la regulación apoptótica. Todas las proteínas de la familia contienen de uno a cuatro dominios de homología BH con Bcl-2, denominados BH1, BH2, BH3 y BH4; y se dividen en dos grupos en función de su similitud estructural y funcional: proteínas antiapoptóticas y proteínas proapoptóticas (figura 8) (Adams, 2003; Youle y cols., 2008; Chipuk y cols., 2010).

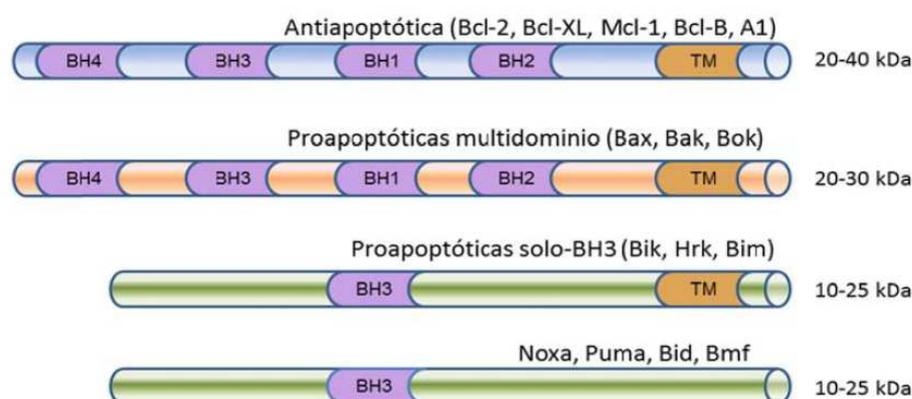


Figura 8. Familia de las proteínas Bcl-2. Esta familia se divide en dos grupos: antiapoptóticas y proapoptóticas. Las antiapoptóticas presentan cuatro dominios, mientras que las proapoptóticas pueden poseer cuatro dominios o sólo el dominio BH3 y estas a su vez pueden presentar o no el dominio transmembrana (TM).

Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, Bcl-B y A1 son las proteínas antiapoptóticas y, excepto Mcl-1 y A1, todas contienen los cuatro dominios BH y una cola hidrofóbica que ancla la proteína a las membranas. Los dominios BH1, BH2 y BH3 forman una cavidad hidrofóbica que permite la interacción con las proteínas sólo-BH3 (Cory y cols., 2002; Michels y cols., 2005; Certo y cols., 2006). Se localizan principalmente en la membrana mitocondrial externa, retículo endoplásmico y membrana nuclear. Estas proteínas evitan la ejecución de la apoptosis por unión directa a las proteínas proapoptóticas (Chipuk y cols., 2010).

Por otro lado, las proteínas proapoptóticas se dividen en dos subtipos: las multidominios o efectoras y las que sólo poseen el dominio BH3 (sólo-BH3) (figura

8). Originalmente se planteó que las proteínas proapoptóticas multidominios carecían del dominio BH4, es decir, que las proteínas Bak y Bax sólo contenían los dominios BH1, BH2 y BH3 (Wei y cols., 2001). Sin embargo, estudios estructurales más recientes revelan la presencia de un motivo BH4 conservado en estas proteínas (Kvansakul y cols., 2008).

La activación de estas proteínas conduce a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (figura 9) mediante la formación del poro mitocondrial (Rasola y cols., 2007). En condiciones normales, estas proteínas están presentes como monómeros inactivos, Bax en el citosol y Bak anclado en la membrana mitocondrial externa. Una vez activadas Bax es traslocada a la membrana mitocondrial externa y ambas sufren cambios conformacionales que les permiten oligomerizar y formar el poro mitocondrial.

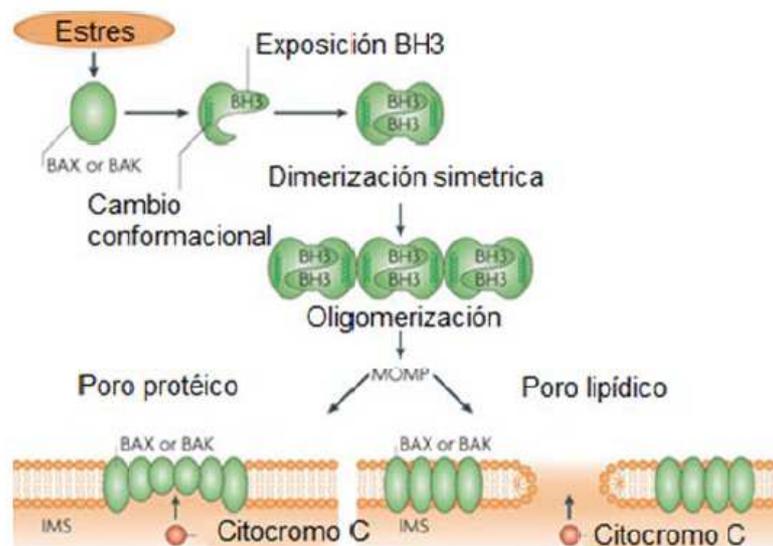


Figura 9. Activación de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2. Cuando Bax y Bak son activadas, sufren un cambio conformacional que hace que se exponga el dominio BH3 a través del cual dimerizan y dan lugar a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Modificado de Tait y cols., 2010).

Las proteínas sólo-BH3 juegan un papel crucial como sensores del estrés celular y como su nombre indica, sólo presentan el dominio BH3. Este dominio, formado por 9 aminoácidos, es necesario y suficiente para inducir apoptosis (Huang y cols., 2000; Willis y cols., 2005; Shibue y cols., 2006). Miembros de esta subfamilia son las

proteínas Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa, Bmf, Hrk y Bik entre otras. Éstas, a su vez pueden interactuar con las proteínas antiapoptóticas o bien con las multidominio. Las que interactúan sólo con las antiapoptóticas se llaman sensibilizadoras y/o de- represoras. En cambio, las que pueden interactuar con ambas, antiapoptóticas y proapoptóticas, se denominan activadoras directas (Bid, Bim y Puma), y son capaces de inducir la activación de Bax y Bak (figura 10). Estas proteínas están muy reguladas, tanto a nivel transcripcional, como es el caso de Puma, Noxa y Hrk, como a nivel post-transcripcional, como Bad y Bim. Algunas proteínas sólo BH3 también pueden ser activadas por proteólisis como ocurre con Bid, que es fragmentada por la caspasa-8 generando su forma activa tBid, el cual expone el dominio BH3. Además, cada una de estas proteínas tiene un perfil único y característico de unión a las proteínas antiapoptóticas, lo que posiblemente permite un control más preciso y específico en cada tejido y para cada estímulo apoptótico (Chipuk y cols., 2010).

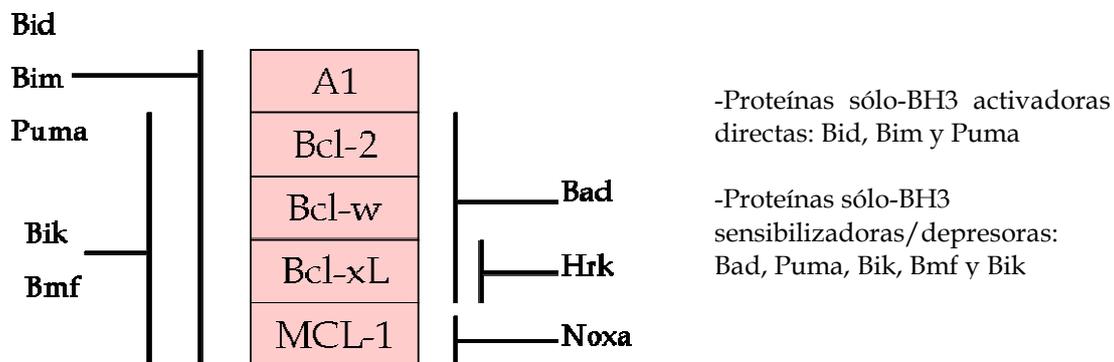


Figura 10. Clasificación de las proteínas sólo-BH3 y patrón de interacción con las proteínas antiapoptóticas. (Modificado de Chipuk y cols., 2010).

La activación de las proteínas de la familia de Bcl-2 determina que se ejecute el proceso apoptótico en la célula. De todas estas proteínas, es la activación de Bax y Bak la que provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial y la activación de las caspasas, con el consiguiente desmantelamiento de la célula. La activación de Bax/Bak va a depender de las interacciones entre las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas, las proteínas sólo-BH3 y las propias proteínas Bax y Bak.

-Familia p53

El gen *P53*, localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), es uno de los genes supresores de tumores más importantes y mejor conocidos. Pertenece a una familia de factores de transcripción de la que forman parte también *P63* y *P73* (Levrero y cols., 2000). El gen *P53* se encuentra mutado en el 50% de los cánceres humanos, por lo que ha sido objeto de numerosos estudios (Levine, 1997).

P53 codifica la fosfoproteína homotetramérica p53 (figura 11), cuyo nombre hace referencia a su masa molecular aparente, debido a que en un gel SDS-PAGE migra como proteína de 53kDa. Actúa como factor de transcripción regulando la expresión de genes involucrados en la parada del ciclo celular y en la apoptosis como respuesta al daño genómico o al estrés celular. No solo está involucrada en la inducción de la apoptosis sino también tiene un papel clave en la regulación del ciclo celular, diferenciación, desarrollo, amplificación génica, recombinación del DNA, segregación cromosómica y senescencia celular, por lo que frecuentemente se le ha denominado “guardián del genoma” (Lane, 1992).



Figura 11. Estructura de p53. p53 es una fosfoproteína formada por 393 aminoácidos y tres dominios funcionales: un dominio amino-terminal (N-) implicado en la activación transcripcional; un dominio central que contiene la zona de unión al ADN específica de la secuencia y que es la región más conservada de la proteína; y un dominio carboxilo-terminal (C-) donde hay una región flexible, una zona de tetramerización y un extremo básico.

Los factores de transcripción son proteínas que, sin formar parte de la ARN polimerasa, intervienen en la regulación de la transcripción. Actúan reconociendo y uniéndose a secuencias específicas del ADN en la región promotora de los genes conocidas como elementos de respuesta (RE). Para poder ejercer su función, necesitan ser activados por señales citoplasmáticas, y una vez activos, se translocan al núcleo donde activan o reprimen la expresión de determinados genes (Latchman, 1997).

Mutaciones en los genes que codifican a ciertos factores de transcripción hacen que éstos se mantengan permanentemente activos, incluso en ausencia de señales

externas. Estas mutaciones generan la síntesis descontrolada de proteínas implicadas en el desarrollo del ciclo celular ocasionando la aparición de tumores (Libermann y cols., 2006).

En condiciones normales, la proteína p53 está presente en su forma inactiva a muy baja concentración, mientras que en situaciones de estrés celular o de daño en el ADN, se produce su activación y estabilización. Si el daño es leve actúa deteniendo la progresión del ciclo celular para permitir así su reparación para posteriormente reiniciarlo. Sin embargo, ante un daño grave o irreparable, p53 activa el proceso de apoptosis, reduciendo de esta manera la posibilidad de que células con mutaciones puedan sobrevivir y contribuir a la carcinogénesis (Rotter y cols., 1994).

Para realizar su función como factor de transcripción, los complejos homotetraméricos de p53, en su forma activa, se unen a secuencias específicas de ADN dentro de la región promotora de algunos genes. Los genes que regula, positiva o negativamente, están implicados en la parada del ciclo celular, reparación de ADN dañado, inhibición de la angiogénesis e inducción de apoptosis (Xiong y cols., 1993; El-Deiry y cols., 1993; Tanaka y cols., 2000; Robles y cols., 2001).

Las señales o sucesos que conducen a la activación de p53 están principalmente asociados a daños en el ADN (por radiación ionizante o ultravioleta), hipoxia, estrés celular y acción de oncogenes. Estas señales son detectadas por una serie de sistemas de reconocimiento (ATM/ATR/ADN-PK/ChK1/ChK2/JNK) que avisan de la presencia de dicho daño modificando postraduccionalmete (fosforilaciones, ubiquitinaciones, metilaciones, acetilaciones y sumolizaciones) algunos de los dominios de p53, principalmente el amino y el carboxilo terminal. Estas modificaciones provocan la activación de la proteína y el aumento de su estabilidad (acumulación de p53). Una vez activa, p53 forma un complejo tetramérico con secuencias específicas de ADN de algunos genes implicados en la parada ciclo celular, reparación del daño en el ADN, inhibición de la angiogénesis e inducción de la apoptosis (Kastan y cols., 1991) (figura 12).

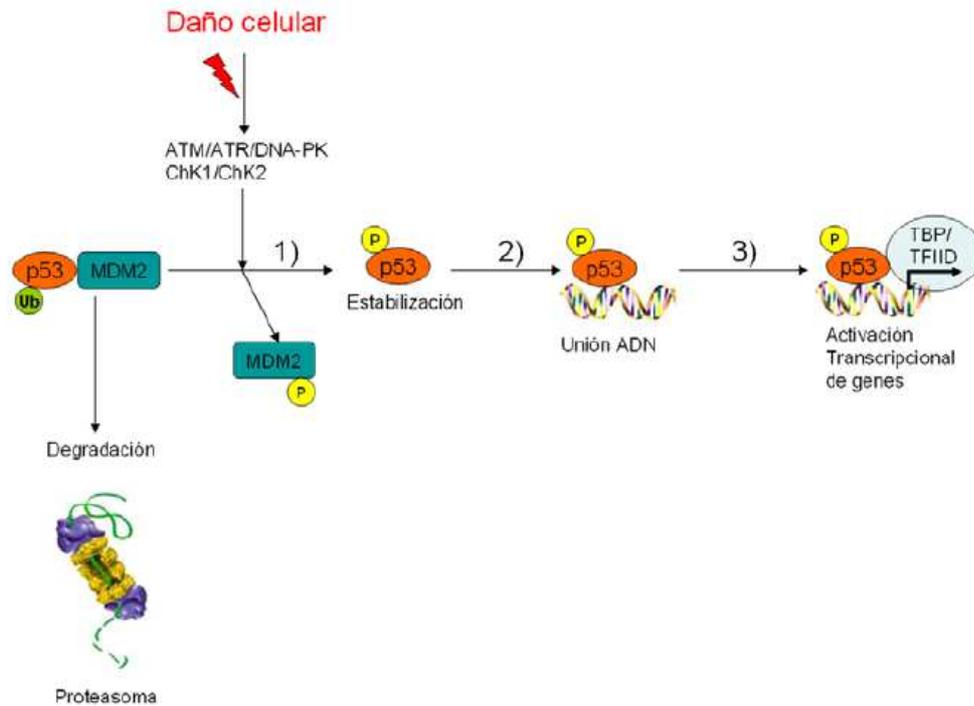


Figura 12. Activación de p53. Consiste en tres pasos. 1) Estabilización de p53: modificaciones postraduccionales generadas por sistemas de reconocimiento de daño celular rompen su interacción con MDM2, aumentando así su estabilidad y acumulación. 2) Unión a secuencias específicas de genes. 3) Regulación de la maquinaria transcripcional. (Adaptado de Fahraeus y cols., 2005).

En el caso que p53 no sea funcional, bien por tratarse de una forma mutada o bien por estar formando complejos con proteínas virales (LTA del virus SV40, E1b de adenovirus, E6 del virus del papiloma humano), permanece inactiva ante un daño celular, lo que puede conducir a una proliferación celular descontrolada (Linzer y cols., 1979; Sarnow y cols., 1982; Werness y cols., 1990) (figura 13).



Figura 13. Influencia del daño en el ADN en la activación de p53. El paso de p53 a su estado activo es necesario para que pueda generar algún tipo de respuesta (reparación de ADN o apoptosis) ante una señal de estrés, como por ejemplo daño en el ADN.

3-Autofagia

La autofagia fue definida por primera vez como tal en 1963 por C. de Duve; constituye un proceso de degradación y reciclaje de los componentes celulares que tiene lugar en respuesta a diferentes tipos de estrés, entre ellos la falta de nutrientes. El término engloba al menos tres mecanismos diferentes: macroautofagia (referida como autofagia y forma más prevalente), microautofagia y autofagia mediada por chaperonas.

La macroautofagia se caracteriza por la formación de vacuolas de doble membrana llamadas autofagosomas, las cuales secuestran el material citoplasmático que finalmente es degradado al fusionarse con los lisosomas. De la fusión con los lisosomas surgen unas vesículas llamadas autofagolisosomas o autolisosomas, donde tanto la membrana interna como el contenido interno son degradados por hidrolasas lisosomales.

3.1-Vías de señalización de la autofagia

La autofagia es un proceso crítico para mantener la homeostasis celular que ocurre constantemente en la célula; de hecho existe una autofagia basal. Sin embargo, este proceso se regula rápidamente cuando las células necesitan nutrientes, en periodos de escasez; por ejemplo, en ambientes con baja concentración de aminoácidos (Sato y cols., 2007).

La autofagia es fuertemente inhibida por la quinasa mTOR que fosforila a Atg13 e impide la formación del complejo Atg1, necesario para la formación del autofagosoma. Si bien se ha sugerido que la autofagia también puede producirse de modo independiente de mTOR (Mordier y cols., 2000; Köchl y cols., 2006), este punto se considera clave en la regulación del proceso.

Hasta el momento se han escrito unas 30 proteínas relacionadas con la autofagia, la mayoría pertenecientes a la familia Atg. Estas proteínas tienen diversas funciones, y encontramos entre ellas proteínas implicadas en el sistema de conjugación de ubiquitinas, proteína-quinasas o complejos PI3K específicos de autofagia (Hamasaki y cols., 2010).

Aún queda mucho por dilucidar sobre el proceso de formación del autofagosoma. Por ejemplo, se sabe que la beclina-1, un homólogo en mamíferos de Atg6 y esencial en la autofagia, forma un complejo con actividad quinasas.

La formación del estado final del autofagosoma requiere de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. El primero constituye el complejo Atg5-Atg12, que posteriormente interactúa con Atg16 para formar un gran complejo multimérico (Atg12-Atg5-Atg16) que se localiza en la superficie exterior de la membrana del fagóforo, denominado de esta manera hasta que termina su formación completa y pasa a denominarse autofagosoma. El segundo sistema interviene en la conjugación de LC3 (figura 14).

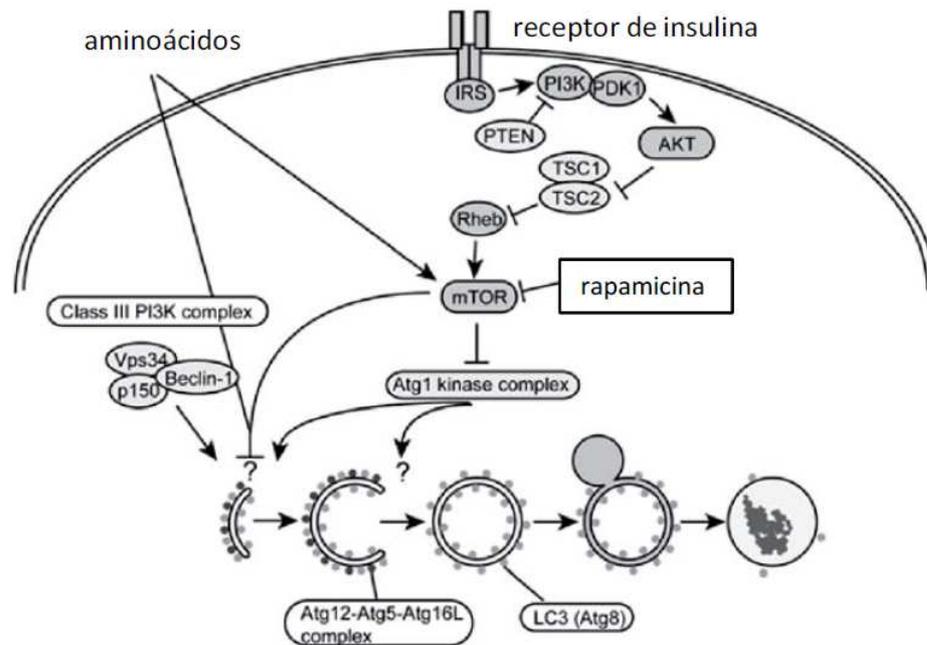


Figura 14. Esquemmatización de la ruta molecular de la autofagia. Se piensa que la insulina es uno de los principales inhibidores de la autofagia. En consecuencia, PI3K, PDK1, Rheb y mTOR inhiben la autofagia y PTEN y TSC1/TSC2 la inducen. La actividad de mTOR puede estar también influida por los niveles de aminoácidos y el ATP intracelular. Otros factores de crecimiento como la IL-3 también pueden inhibir la autofagia. Las funciones principales de las proteínas Atg es la formación del autofagosoma; sin embargo aún no se ha demostrado una relación directa entre estas proteínas y mTOR. (Mizushima, 2005).

3.2-Formación del autofagosoma

La formación del autofagosoma consta de 4 fases (figura 15). La primera fase, denominada de nucleación o ensamblaje, es en la que empieza a formarse la membrana pre-autofágica. La siguiente fase es la de elongación y formación de la vesícula denominada autofagosoma. Una vez formado el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar autolisosomas (o autofagolisosomas) y finalmente, mediante la acción de las hidrolasas lisosomales, se degrada el material contenido en su interior. A esta última fase se la conoce como la fase de degradación. Durante todo el proceso son numerosas las proteínas implicadas, entre ellas proteínas de la familia Atg (Atg7, Atg9 y el complejo Atg12-Atg5-Atg16) o la proteína LC3. Durante el proceso autofágico, la proteína LC3 sufre una modificación lipídica y pasa de su forma soluble LC3-I a su forma LC3-II localizada en la cara interna del autofagosoma. Esta proteína es el marcador más fiable de autofagia ya que una mayor relación LC3-I/LC3-II es indicador de una mayor cantidad de autofagosomas y por tanto una mayor actividad autofágica.

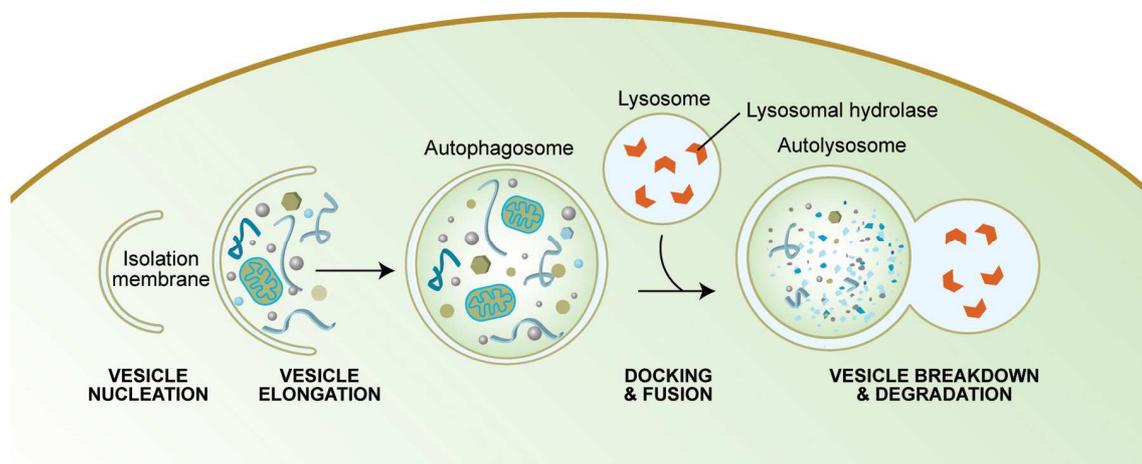


Figura 15. Fases de la formación del autofagosoma y su degradación. (Adaptado de Suzuki y cols., 2007).

3.3-Autofagia y muerte celular

La relación funcional entre apoptosis y autofagia es compleja, en el sentido de que la autofagia puede constituir una adaptación al estrés y evitar la muerte celular (inhibiendo la apoptosis) en determinadas condiciones, pero en otras

circunstancias puede constituir una ruta alternativa de muerte celular denominada muerte celular autofágica. El término “muerte celular autofágica” fue definido en base a hechos morfológicos, específicamente a la vacuolización masiva observada por acumulación de autofagosomas que acompaña en algunos casos la muerte celular (Galluzzi y cols., 2007).

En la mayoría de los casos conocidos, la autofagia constituye un mecanismo citoprotector que es activado en respuesta a diversos tipos de estrés y su inhibición acelera, más que prevenir, la muerte celular (Galluzzi y cols., 2012). Sin embargo, hay estudios en los que la autofagia parece ser responsable de la muerte en algunas células tumorales, especialmente en ausencia de algún factor apoptótico importante como Bax, Bak o caspasas, en respuesta a algunos agentes quimioterapéuticos *in vitro* (Fazi y cols., 2008; Grandér y cols., 2009; Laane y cols., 2009).

La interrelación entre la autofagia y la muerte celular apoptótica (e incluso necrótica) es compleja y no completamente comprendida. Se han identificado numerosos niveles de interconexión entre la autofagia y la apoptosis que pueden dividirse en 3 categorías (Eisenberg-Lerner y cols., 2009):

-Interacción cooperativa: tanto la autofagia como la apoptosis pueden ser ejecutadas en paralelo para contribuir a la muerte celular, o la autofagia puede inducir apoptosis. En cualquiera de los casos, el objetivo de ambas vías es el mismo: la eliminación de la célula (figura 16A).

-Interacción antagónica: la autofagia no es parte del mecanismo de muerte celular. En respuesta a diferentes tipos de estrés la célula activa la autofagia para contrarrestar o retrasar la muerte celular en un intento final de sobrevivir y hacer frente al estrés. La autofagia actúa bloqueando la muerte celular y promoviendo la supervivencia; en este caso ambos procesos tienen propósitos contrarios. Por ejemplo, en diversas situaciones de estrés reticular se ha demostrado que la autofagia puede mantener la función del RE a través de la degradación de agregados proteicos y de proteínas mal plegadas (Ding y cols., 2006) (figura 16B).

-Interacción facilitadora: la autofagia es parte del programa de apoptosis, y actúa tanto como ejecutora de la apoptosis como durante las etapas finales de la apoptosis para colaborar en la eliminación de los cuerpos apoptóticos. En este caso, la autofagia puede asistir a la apoptosis sin que conduzca a la muerte en sí misma, por lo que no interfiere con su ejecución. Por ejemplo, la autofagia es la responsable del mantenimiento de los niveles celulares de ATP que permite la exposición de fosfatidilserina, un proceso dependiente de ATP. De igual forma, la formación de *blebs apoptóticos* requiere ATP, que es proporcionada por la autofagia (Qu y cols., 2007) (figura 16C).

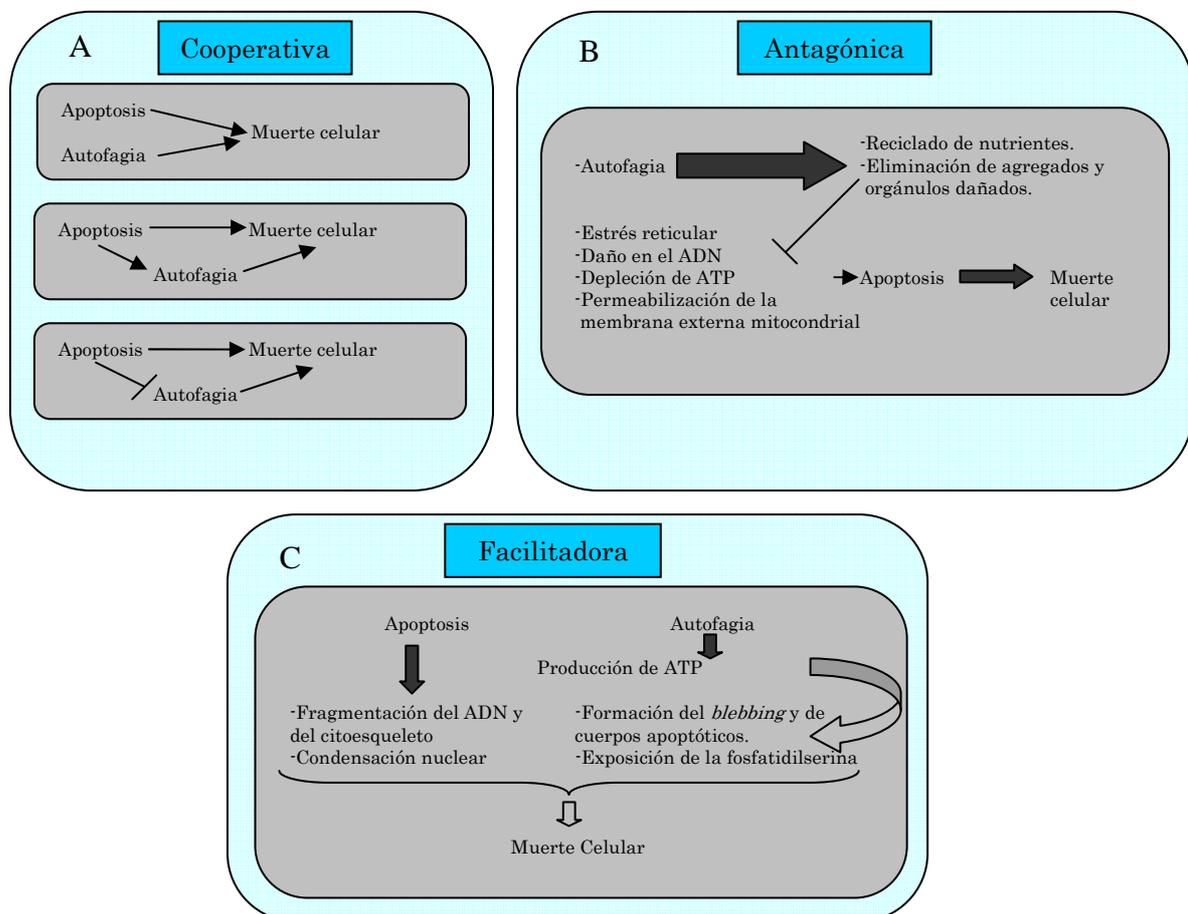


Figura 16. Posibles interacciones entre la apoptosis y la autofagia cuando se induce muerte celular. A) Interacción cooperativa, los dos procesos cooperan para inducir la muerte de la célula y en caso que uno de los procesos sea bloqueado el otro es suficiente para producir la muerte de la célula. B) Interacción antagónica, en este caso la autofagia representa un intento de la célula de adaptarse a las condiciones que inducen muerte celular. C) Interacción facilitadora, en este caso la autofagia contribuye a la completa ejecución de la apoptosis. (Modificado de Eisenberg-Lerner y cols., 2009).

III-HISTAMINA Y ANTIHISTAMÍNICOS

La histamina (2-(4-imidazolil)-etilamina) es una amina biogénica que se forma a partir del aminoácido histidina por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC). Fue aislada por primera vez en 1907 por Windaus y Vogt y fue en 1910 cuando Dale y Laidlaw estudiaron su efecto biológico y descubrieron que son numerosas las funciones fisiológicas en las que está implicada (Montes y cols., 2005). Se encuentra en la mayoría de tejidos del cuerpo humano en concentraciones variables, pero fundamentalmente en los pulmones, la piel y el tracto gastrointestinal. La histamina interviene en la inflamación, en la modulación de la respuesta inmune, en la secreción gástrica y en la transmisión neural.

Su síntesis se realiza mayoritariamente por los basófilos de la sangre y los mastocitos o células cebadas del tejido conectivo mediante decarboxilación en el interior del aparato de Golgi. La histamina es almacenada en gránulos citoplasmáticos en conjunción con una proteína ácida y macroheparina (Parsons y cols., 2006; Blaya y cols., 2010) que se liberará al exterior tras la estimulación adecuada. La histamina liberada se degrada rápidamente gracias a la acción de las enzimas Histamina-N-metiltransferasa (HNMT) y diamina oxidasa (DAO), dando lugar a los metabolitos inactivos ácido imidazolacético y ácido telemetilimidazólico (figura 17). La enzima DAO se almacena en vesículas de las células epiteliales y se libera a la circulación sanguínea. La enzima HNMT es una proteína citosólica que sólo puede metabolizar la histamina en el espacio intracelular (Ogasawara y cols., 2006).

La histamina ejerce múltiples funciones en el organismo y sus efectos biológicos están mediados por la activación de receptores de histamina específicos denominados H1, H2, H3 y H4.

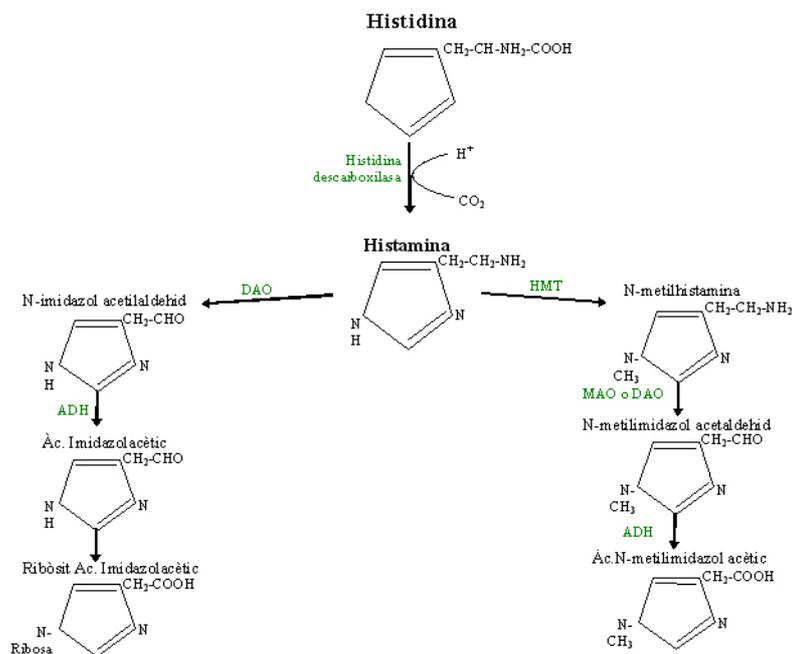


Figura 17. Síntesis y metabolismo de la histamina. (www.deficitdao.org)

1-Receptores de la histamina

La histamina produce una variedad enorme de acciones en distintas células y órganos. Al igual que ha ocurrido con otros ligandos endógenos, la aparición de sustancias análogas de la histamina que mostraban preferencia por unos u otros efectos ha permitido reconocer la existencia de 4 tipos fundamentales de receptores histamínicos (H1, H2, H3 y H4), todos ellos pertenecientes a la superfamilia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G. Los tipos H1 y H2 son los responsables fundamentalmente de la mayor parte de las acciones histamínicas conocidas, mientras que el receptor H3, que se encuentra principalmente en el sistema nervioso, tiene, al parecer, un papel esencialmente modulador de la liberación de histamina y de otros neurotransmisores (Pazos, 1997). El descubrimiento del receptor H4 es relativamente reciente y aún se investiga sobre el mismo aunque se sabe que su función está regulada por la producción de citocinas inflamatorias y está implicado en los fenómenos de activación y migración de mastocitos, eosinófilos, células dendríticas, y células T

(tabla 5) (Zhang y cols., 2007; Liu y cols., 2001; Nakamura y cols., 2000; Ling y cols., 2004).

Tabla 5. Localización y funciones de los receptores de la histamina en los seres humanos. (Montes y cols., 2005).

	Receptor H1	Receptor H2	Receptor H3	Receptor H4
Localización	Membrana de células musculares lisas de vasos, bronquios tracto gastrointestinal, tejido de conducción del corazón	Membranas de células parietales de la mucosa gástrica, células musculares lisas de vasos, células miocárdicas	Vías respiratorias, tubo digestivo y SNC	Medula ósea, células hematopoyéticas, aparato digestivo y medula ósea
Función	Causa vasodilatación, bronco-constricción, disminuye al conducción del impulso cardiaco a través del nodo AV, activación del músculo liso.	Regula principalmente la secreción de ácidos gástricos, favorece la entrada de calcio al interior de las células del miocardio y aumenta la fuerza de contracción.	Inhibe liberación de noradrenalina, acetilcolina, norepinefrina y serotonina.	Función fisiológica desconocida por el momento, aunque se sugiere que podría ser el reclutamiento de células generadoras de sangre (hematopoyéticas) como los eosinófilos.

1.1-Receptores H1 (HRH1)

Los receptores H1 de la histamina fueron los primeros en ser identificados al estudiarse la participación de la histamina en las respuestas alérgicas. Son el blanco de acción de los antihistamínicos clásicos, antagonistas de los receptores H1, utilizadas ampliamente en medicina. Estos receptores se encuentran expresados en una gran variedad de tejidos, incluyendo el músculo liso de bronquios, el intestino, las vías urinarias y los vasos sanguíneos.

Los HRH1 se encuentran acoplados a proteínas G α q/11 y al ser activados inducen la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) por acción de la fosfolipasa C (PLC β), generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) como segundos mensajeros. El IP3 se une a receptores presentes en el retículo endoplasmático promoviendo la liberación de Ca⁺² de los depósitos intracelulares. Además, el vaciamiento de los depósitos de Ca⁺² genera la apertura de canales situados en la membrana celular, denominados canales activados por depósitos (SOCs), lo cual produce la entrada de Ca⁺² desde el medio extracelular. Por su parte, el DAG activa a la proteinkinasa C (PKC), implicada en procesos de proliferación y supervivencia celular (Ramos-Jimenez y cols; 2009). La histamina produce muchos de los síntomas y signos de la alergia a través del receptor H1 de la histamina.

Existen dos tipos de antihistamínicos comercializados: los antihistamínicos de primera generación y los de segunda generación (tabla 6). Estos últimos se empezaron a sintetizar a finales de los años 80 y tienen menor efecto sobre el SNC. En la tabla siguiente se resumen los efectos más generales de ambos grupos de antihistamínicos, así como algunos de sus representantes farmacológicos.

Tabla 6. Antihistamínicos H1 comercializados. (Adaptado de Pazos y cols., 1997).

Primera generación	Efectos
-Difenhidramina -Dimenhidritano -Clorfeniramina -Triplolidina -Hidroxizina -Prometazina	Marcado efecto anticolinérgico y sedante, debido a la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Escasa selectividad, por lo que interfieren con los receptores de adrenalina y serotonina del SNC y los hace útiles para el tratamiento del mareo asociado al movimiento.
Segunda generación	Efectos
-Cetirizina -Astemizol -Ebastina -Loratadina -Terfenadina	Poseen mayor especificidad por los receptores H1 periféricos y atraviesan con más dificultad la BHE, por lo que tienen menos efectos secundarios asociados.

Los antihistamínicos de tercera generación son enantiómeros activos (como la levocetirizina) o metabolitos activos (como la desloratadina y fexofenadina) derivados de los antihistamínicos de segunda generación. Su objetivo es aumentar la eficacia sobre los síntomas alérgicos a la vez que disminuyen las reacciones adversas. Por ejemplo, la fexofenadina presenta un menor riesgo de producir arritmia cardíaca que la terfenadina. Sin embargo, hay escasa evidencia de alguna ventaja de la levocetirizina o la desloratadina en comparación con la cetirizina y la loratadina respectivamente. Por todo ello, aún existe cierta controversia en la utilización del término tercera generación para referirse a los mismos (Camelo-Nunes, 2006).

1.1.1-Terfenadina

La terfenadina es un antialérgico, antihistamínico H1 de segunda generación de larga duración de acción derivado de la piperidina. Actúa como antagonista competitivo de los receptores H1 de la histamina preferentemente a nivel periférico, evitando que la histamina liberada actúe sobre las células efectoras. De esta manera, se reducen o se previenen, pero no revierten, muchos de los efectos fisiológicos de la histamina. No atraviesa la barrera hematoencefálica y carece de propiedades sedantes clínicamente significativas. Fue el primer antihistamínico no sedante que fue aprobado en el año 1985.

Hoy en día se encuentra retirado del mercado desde 2003 debido al potencial peligro de provocar alteraciones en el ritmo cardíaco como son la prolongación del intervalo QT, taquicardia ventricular polimórfica y fibrilación. Puede ser inclusive mortal cuando se utiliza a dosis altas o asociada a otras drogas que se metabolizan por vía hepática. Hasta hace poco se consideraba que los beneficios de la terfenadina eran superiores a los riesgos, a pesar de los graves efectos cardíacos al utilizarse de forma indebida (Ołasińska-Wiśniewska y cols., 2014).

1.1.2-Fexofenadina

La fexofenadina es el metabolito activo de la terfenadina. Actúa como antagonista competitivo de los receptores H1 de la histamina y se utiliza en el tratamiento sintomático de la rinitis alérgica estacional. Su comercialización en España es relativamente reciente y se considera un antihistamínico de segunda generación, ya que a dosis terapéuticas no atraviesa la barrera hematoencefálica (y por tanto, no actúa sobre el sistema nervioso central) ni produce sedación (Pratt y cols., 1999).

La terfenadina se metaboliza rápidamente en el hígado, a través del citocromo P450, transformándose en un metabolito activo, la fexofenadina, con propiedades antihistamínicas pero sin efectos cardiacos (González y cols., 1998). La fexofenadina ofrece los beneficios terapéuticos de la terfenadina, evitando los riesgos cardiotoxicos y las interacciones de ésta con otros fármacos, por lo que se considera una alternativa relativamente segura a la terfenadina.

1.2-Receptores H2 (HRH2)

Los receptores H2 fueron identificados al estudiar el efecto de la histamina en la secreción ácida del estómago (Black y cols., 1972); se expresan en una gran variedad de tipos celulares, entre los cuales se encuentran las células parietales de la mucosa gástrica, los vasos sanguíneos y el corazón. A nivel periférico, los sitios de alta expresión son el músculo liso vascular y pulmonar, los hepatocitos, los condrocitos, las células endoteliales y epiteliales, los neutrófilos, los eosinófilos, los monocitos, las células dendríticas y los linfocitos T y B. Con respecto a su localización celular, a semejanza de los HRH1, los HRH2 son predominantemente postsinápticos (Haas y Panula, 2003).

Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas $G\alpha_s$, y su activación estimula la secreción ácida gástrica, vasodilatación directa más intensa que la producida por los HRH1 y aumento de la frecuencia cardiaca (Jutel y cols., 2009). Han sido caracterizados farmacológicamente con varios agonistas y antagonistas selectivos. Existen diversos antagonistas del HRH2, como la ranitidina, la famotidina, la tiotidina y la yodoaminopentidina, uno de los más potentes antagonistas

disponibles. Varios de estos antagonistas se emplean con éxito en las enfermedades ácido-pépticas, lo que confirma el papel relevante de estos receptores en el control de la secreción gástrica ácida. Se han sintetizado también agonistas altamente selectivos para los HRH2, como el dimaprit, la impromidina y la amtamina (Hill y cols., 1997; Leurs y cols., 1995; Alexander y cols., 2008).

1.3-Receptores H3 (HRH3)

Los receptores H3 de la histamina fueron identificados farmacológicamente en 1983 por Arrang y cols. como autorreceptores presinápticos que inhiben la liberación de la histamina en el cerebro de rata (Arrang y cols., 1983). La mayoría de los HRH3 se encuentran en las neuronas del SNC, aunque también pueden encontrarse en las terminaciones nerviosas periféricas del tracto gastrointestinal (Coruzzi y cols., 2001; Prell y cols., 1996) y del corazón (Imamura y cols., 1995). Se sabe que estos receptores inhiben la síntesis y liberación de histamina en las neuronas histaminérgicas del SNC, además de modular la liberación de otros neurotransmisores como la serotonina, noradrenalina, dopamina, acetilcolina y ácido γ -aminobutírico (GABA).

Estos receptores se acoplan a proteínas $G\alpha_{i/o}$ y su activación induce una disminución en la concentración intracelular de cAMP, inhibe la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo N, induce la liberación de ácido araquidónico y activa la vía de las MAPKs (Molina-Hernandez y cols., 2001; Drutel y cols., 2001; Clark y cols., 1993; Oike y cols., 1992).

Se ha observado que los HRH3 se encuentran activos en ausencia de histamina. Esta actividad constitutiva fue demostrada al observar que, en células transfectadas con el HRH3, se inhibe la formación de AMPc inducida por forskolina. Algunos antagonistas, como la tioperamida, el clobenpropit y el ciproxifan, revierten esta actividad constitutiva y se consideran agonistas inversos del receptor (Rouleau y cols., 2002; Morisset y cols., 2000; Wieland y cols., 2001). El primer antagonista selectivo de los receptores H3, la tioperamida, no ha podido ser utilizado en humanos debido a su hepatotoxicidad; se han llevado a cabo sin

embargo ensayos con otro fármaco denominado GT-2332 así como con otras moléculas que se encuentran todavía en fase de desarrollo (Bonaventure y cols., 2007).

1.4-Receptores H4 (HRH4)

Los receptores H4 de histamina fueron identificados por varios grupos mediante el análisis bioinformático del genoma humano y la secuenciación de HRH3. Estos receptores, al igual que los HRH3, se acoplan a proteínas $G\alpha_{i/o}$ y se encuentran principalmente en células de origen hematopoyético, como las células dendríticas, los mastocitos, los eosinófilos, los monocitos, los basófilos y las células T, lo que indica su importante función en el sistema inmune. Parece que estos receptores están implicados en los fenómenos de activación, migración y producción de citocinas (Zhang y cols., 2007).

Los actuales medicamentos específicos de los receptores H1, H2 y H3 de la histamina no bloquean la unión de la histamina al H4. Dado el importante papel que tiene la histamina en las reacciones alérgicas, el receptor H4 podría aportar nueva información a las enfermedades alérgicas, o incluso ser de utilidad en el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes en el futuro.

2-Histamina, antihistamínicos y cáncer

En los últimos años la relación entre la histamina y la progresión tumoral se ha estudiado ampliamente. La histamina se ha considerado un mediador de la proliferación celular desde que los primeros autores Kahlson y Rosengren en 1960 estudiaran su síntesis en modelos de embrión de ratón. A partir de estos trabajos se realizaron numerosos estudios sobre la histamina y su implicación en la progresión tumoral, pero los resultados han sido a menudo contradictorios.

Se han detectado niveles elevados de histamina y de HDC en diferentes tejidos con alta tasa proliferativa como en la cicatrización de heridas, en tejidos embrionarios y en diferentes tumores (Jangi y cols., 2008; Sieja y cols., 2005).

Cabe destacar que la mayoría de líneas celulares tumorales y tumores experimentales expresan HDC y contienen una alta concentración de histamina

endógena que puede ser liberada al medio extracelular. Mediante regulación autocrina o paracrina, la histamina puede regular diversas respuestas biológicas relacionadas con el crecimiento tumoral (Barthoneyns y cols., 1985; Engel y cols., 1996; Falus y cols., 2001; García - Caballero y cols., 1994; Pó s y cols., 2004; Rivera y cols., 2000).

Estas respuestas biológicas incluyen la angiogénesis, la invasión celular, la migración, la diferenciación, la apoptosis y la modulación de la respuesta inmune, lo que indica que la histamina puede ser un mediador fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer.

Existen claras evidencias experimentales que establecen una relación directa entre la actividad de la enzima HDC y el crecimiento tumoral. Esta relación se ha demostrado en leucemias, melanomas, carcinoma de mama y carcinoma colorrectal (Masini y cols., 2005; Cianchi y cols., 2005; Medina y cols., 2006; Blaya y cols., 2010).

Nuestro grupo ha demostrado que las células de melanoma maligno expresan el receptor H1 de la histamina en su membrana, que la histamina es un factor de crecimiento para las células del melanoma (Blaya y cols, 2010), y que los antagonistas del receptor H1 de la histamina (terfenadina, astemizol, triprolidina y difenidramina) inducen muerte celular por apoptosis en el melanoma humano, pero no en melanocitos normales (Jangi y cols, 2004, Jangi y cols, 2006).

Por otro lado, hemos realizado experimentos de crecimiento tumoral *in vivo* utilizando ratones atímicos inoculados con células de melanoma humano y tratados con terfenadina. Los resultados ponen de manifiesto su efecto antitumoral, ya que el tratamiento disminuyó la masa tumoral en un 60% (Blaya y cols, 2010).

En resumen, todos estos datos sugieren que la terfenadina, sola o en combinación con otros antineoplásicos, podría definir una nueva estrategia terapéutica para el cáncer. Para ello, es fundamental el conocimiento y estudio detallado de la capacidad antitumoral de este fármaco a nivel celular para poder trasladarlo a futuros estudios preclínicos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los últimos informes señalan al cáncer como la primera causa de muerte en España. A pesar de los avances en el conocimiento del cáncer y del desarrollo significativo de las terapias antitumorales en los últimos años, los resultados obtenidos en muchas neoplasias continúan siendo preocupantes. Por esta razón, el conocimiento y la búsqueda de nuevas estrategias y agentes antineoplásicos son de vital importancia.

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio hemos demostrado que las células de melanoma maligno expresan el receptor H1 de la histamina en su membrana, que la histamina es un factor de crecimiento para las células del melanoma (Blaya y cols, 2010), y que los antagonistas del receptor H1 de la histamina (terfenadina, astemizol, triprolidina y difenidramina) inducen muerte celular por apoptosis en cuatro líneas celulares de melanoma humano, pero no en melanocitos normales (Jangi y cols, 2004, Jangi y cols, 2006). Además, hemos demostrado que, en las células de melanoma, el mecanismo de apoptosis inducido por los antihistamínicos está mediado por los niveles intracelulares de calcio, inducción de daño en el ADN, activación de las caspasa-2, -4 y -9 y alteraciones en la función mitocondrial (Jangi y cols, 2008, Nicolau-Galmés y cols, 2011).

Estos resultados sugieren que la histamina es un factor de crecimiento importante para las células de melanoma. Sin embargo, observamos que el tratamiento con histamina previamente al de la terfenadina, no afecta a la actividad de la terfenadina sobre el calcio citosólico ni sobre la inducción de apoptosis. Todo ello indica que el efecto antitumoral de los antihistamínicos H1 está mediado por una ruta celular diferente a la relacionada con su receptor, independiente de la ruta de señalización de la histamina. Los experimentos de RNA interferente realizados en células de melanoma donde se bloqueó la expresión del receptor H1 de la histamina, confirmaron este punto (Jangi y cols, 2008). Por último, los experimentos de crecimiento tumoral *in vivo* en ratones atímicos inoculados con

células de melanoma humano demostraron que la terfenadina también presenta actividad antitumoral *in vivo* puesto que el tratamiento disminuyó la masa tumoral un 60% (Blaya y cols, 2010).

A la luz de todos estos resultados, nos planteamos la cuestión de si el potencial antitumoral de la terfenadina es extensible o no a otras estirpes tumorales humanas. Además, siendo la actividad antitumoral de la terfenadina independiente de la ruta del receptor H1 de la histamina, la identificación de su diana molecular podría ser importante para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

OBJETIVOS

Con los antecedentes anteriormente expuestos y continuando con esta línea de investigación, los **objetivos concretos** que nos planteamos en este estudio fueron:

1. Analizar, en diferentes líneas tumorales humanas, el efecto de la terfenadina y de su metabolito activo, la fexofenadina.
2. Estudiar la implicación de los receptores H1 y H4 de la histamina en el efecto antitumoral de la terfenadina, en diferentes líneas tumorales humanas.
3. Estudiar el mecanismo celular de apoptosis y autofagia inducidos por la terfenadina en las diferentes líneas tumorales. Para realizar este trabajo hemos ampliado el estudio a cuatro líneas de melanoma humano, dos líneas de carcinoma de colon y mama, y una línea de neuroblastoma.
4. Identificar la diana molecular y la ruta intracelular a través de la cual actúa la terfenadina.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

1.1-Tratamientos

- La TEF, la FEX, el DMSO, la Genisteína y la Rotenona fueron obtenidas de Sigma-Aldrich Química, S.A. (Madrid, España). El Cloruro de potasio (KCl) se adquirió en Panreac Química S.L.U. (Barcelona, España).

1.2-Anticuerpos primarios

Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial/referencia
-Anticuerpo monoclonal de ratón anti-H2A.X(pSer ¹³⁹)	WB: 1:1000	Abcam ¹ /ab22551
-Anticuerpo monoclonal de ratón anti-Noxa	WB: 1:250	Abcam/ab13654
-Anticuerpo policlonal de conejo anti-LC3B	WB: 1:300	Abcam/ab51520
-Anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3	WB: 1:1000	Cell Signaling Technology ² /9661
-Anticuerpo monoclonal de ratón PhosphoDetect™ anti-ATM (pSer ¹⁹⁸¹)	IC: 1:400	Calbiochem ³ /DR1002
-Anticuerpo monoclonal de ratón anti-P73	IC: 1:50	Calbiochem/OP109
-Anticuerpo policlonal de conejo PhosphoDetect™ anti-P53 (pSer ¹⁵)	WB: 1:5000	Calbiochem/PC461
-Anticuerpo de conejo anti-HRH1	WB: 5:1000	Alpha Diagnostic International ⁴ /H1R12-A

-Anticuerpo de conejo anti-HRH4	WB: 5:1000	Alpha Diagnostic International/H4R41-A
-Anticuerpo de conejo anti-actina	WB: 1:200	Sigma-Aldrich/ A2066
-Anticuerpo policlonal de conejo anti-gamma tubulina	WB: 1:1000	Abcam/ab11320

¹Abcam. Cambridge, Inglaterra, Reino Unido

²Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA

³Calbiochem, La Jolla, CA, USA

⁴Alpha Diagnostic International (ADI), San Antonio, Texas, USA

1.3-Anticuerpos secundarios

Tabla 8. Anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial/referencia
-Anticuerpo secundario de cabra HRP-F(ab') ₂ anti-ratón IgG (H+L)	1:8000	SouthernBiotech ⁵ /1032-05
-Anticuerpo secundario de cabra HRP-F(ab') ₂ anti-conejo IgG (H+L)	1:3000	Abcam/ab6721
-Anticuerpo secundario de cabra Alexa Fluor® 488 anti-ratón IgG (H+L)	1:700	Invitrogen ⁶ /A11001

⁵SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA

⁶Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

1.4-Medios

- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, Spain)
- RPMI-1640 con GlutaMAX™ (Gibco/BRL. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

- McCoy's 5A (Gibco/BRL. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- PBS: *Phosphate buffered saline* (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España)
- SBF: Suero bovino fetal (Biochrom AG. Berlin, Alemania)
- TRYPSIN-EDTA (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España)
- Penicillin-Streptomycin (Gibco/BRL. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Gentamicin (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España)
- L-Glutamina (Sigma-Aldrich Química, S.A.; Madrid, España)
- Medium-254 (Gibco/BRL. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- 1% Human Melanocyte Growth Supplement (Gibco/BRL. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

II. MÉTODOS

1-Cultivos celulares

1.1-Líneas celulares

- **Melanoma A375:** A375 es una línea de melanoma humano metastático que fue establecida por Giard en 1973. Deriva de un melanoma maligno localizado en la piel de una mujer de 54 años. Es una línea hipotriploide con un número modal de 62 cromosomas. Fue obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection*), (**ATCC CRL-1619**).
- **Melanoma HT144:** Es una línea de melanoma humano metastático aislada por Fogh; deriva de una lesión metastática localizada en el tejido subcutáneo de un hombre caucásico de 29 años. Puede ser hipotriploide o hipertriploide, con anormalidades cromosómicas. Fue obtenida de ATCC, (**ATCC HTB-140**).
- **Melanoma Hs294T:** línea celular de melanoma establecida por A. Creasey en 1969, a partir de un melanoma metastático de un nódulo linfático en una mujer caucasoide de 56 años de edad. Esta línea fue adquirida a través de la ATCC, (**ATCC HTB-140**).

- **Melanoma MEL-JUSO:** es una línea de melanoma humano establecida a partir del tumor primario de una mujer con melanoma de 58 años en el año 1977. Fue obtenida de Innoprot S.L. (Bizkaia, España), (**ACC74**).
- **Melanoma MEL-HO:** es una línea de melanoma humano establecida a partir del tumor primario de una mujer con melanoma en 1976. Fue obtenida de Innoprot S.L. (Bizkaia, España), (**ACC62**).
- **Melanoma COLO-800:** es una línea de melanoma humano establecida en 1990 a partir de un nódulo subcutáneo de un chico de 14 años con melanoma. Fue obtenida de Innoprot S.L. (Bizkaia, España), (**ACC193**).
- **Melanoma RPMI-7951:** línea de melanoma establecida en 1971 a partir de un nódulo linfático afectado de una mujer caucásica de 18 años con melanoma maligno. Fue obtenida de Innoprot S.L. (Bizkaia, España), (**ACC76**).
- **Adenocarcinoma de colon HCT8:** es una línea de adenocarcinoma colorrectal humano establecida a partir del tumor de un hombre de 67 años. Fue obtenida de ATCC, (**ATCC CCL-244**).
- **Adenocarcinoma de mama MCF7:** es una línea de cáncer de mama humano establecida a partir de un adenocarcinoma mamario de una mujer caucásica de 69 años. Fue obtenida de ATCC, (**ATCC HTB-22**).
- **Neuroblastoma SMS-KCNR:** es una línea de neuroblastoma humano obtenida del Dr. C. Pat Reynolds (Texas Tech University, Amarilo, TX). Es una línea celular establecida después de un tratamiento con quimioterapia.
- **Leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T humanos CCRF-CEM:** es una línea obtenida a partir de la extracción de sangre periférica de una paciente caucásica de 4 años. Fue obtenida por el Dr. G.E. Foley y su equipo en 1964 y adquirida en el laboratorio por la ATCC, (**ATCC CCL-119**).
- **Células embrionarias de riñón humano HEK-293:** esta línea fue obtenida en los años 70 en el laboratorio del Dr Alex van der Eb a partir de la transformación de cultivos de células renales embrionarias humanas normales con adenovirus. Su nombre es debido a las siglas de *Human Embryonic Kidney Cells*, (**ATCC CRL-1573**).

- **Fibroblastos embrionarios murinos MEF:** los fibroblastos fueron obtenidos a partir de un embrión de ratón de 14 días de gestación y la línea fue adquirida de la ATCC, (ATCC SCRC).
- **Células CHO-M2:** son células derivadas de ovario de hámster chino (*Chinese hamster ovary*) que sobreexpresan el receptor muscarínico M2.
- **Melanocitos HEM (P-10853):** cultivo primario de melanocitos humanos aislados de piel de un individuo neonato con baja pigmentación. Esta línea fue adquirida a través de la empresa Innoprot S.L. (Bizkaia, España).
- **Melanocitos HEM 104-05n:** cultivo primario de melanocitos aislados de piel de un individuo neonato con alta pigmentación. Esta línea fue adquirida a través de la ECACC (*European Collection of Cell Cultures*). Nos referiremos a ellos a lo largo del trabajo como HEM-2710.
- **Melanocitos HEMn-DP (C-202-5C):** cultivo primario de melanocitos aislados de piel de un individuo neonato con alta pigmentación. Esta línea fue adquirida a través de Cascade Biologics/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.
- **Melanocitos HEMn-LP (C-002-5C):** cultivo primario de melanocitos aislados de piel de un individuo neonato con baja pigmentación. Esta línea fue adquirida a través de Cascade Biologics/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.
- **Mela-FD:** Células aisladas a partir de un tumor de un ratón desnudo al que se le inocularon células de melanoma A375 para que desarrollara el tumor.

1.2-Cultivo de células

Cada línea celular utilizada en el presente trabajo tiene unos requerimientos nutricionales y un ritmo proliferativo diferente. Los medios de cultivos requeridos por cada línea se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 9. Medios de cultivo requeridos por las diferentes líneas celulares utilizadas.

Medio de cultivo	Líneas celulares
DMEM + 10% SBF + PEN-STREP + L-Glutamina	A375
	Hs294T
	RPMI-7954
	HCT8
	MCF7
	MEF
RPMI 1640 GlutaMAX™ + 10% SBF + PEN-STREP	MEL-JUSO
	MEL-HO
	COLO-800
	SMS-KCNR
	HEK-293
RPMI 1640 GlutaMAX™ + 10% SBF + Gentamicina	CCRF-CEM
McCoy's 5A + 10% SBF + PEN-STREP + L-Glutamina	HT144
Medio de cultivo para melanocitos Medium-254+ 1% Suplemento para melanocitos	HEM (P-10853)
	HEMn-DP
	HEMn-LP
	HEM-2710

Las células fueron rutinariamente cultivadas en frascos T-75 (75 cm² - Sarstedt, Nuremberg, Alemania) en monocapa (a excepción de las células CEM, que crecen en suspensión) y mantenidas en su correspondiente medio suplementado con 10% de SBF, L-Glutamina 2mM y una solución antibiótica de 100 µg/ml estreptomina y 100 UI/ml de penicilina. Todas las líneas fueron incubadas en el interior de incubadores con una atmósfera húmeda (saturada de vapor de agua al 95%) a

37°C y al 5% de CO₂. Para su subcultivo las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas con una solución de Tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo la tripsina se inactivó con SBF y se centrifugó la solución a 200 g durante 5 minutos. A continuación se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con medio nuevo. Se contó el número de células utilizando una cámara de recuento Burker (Blaubrand) y una relación 1:1 de azul tripán (Sigma-Aldrich). El azul tripán es un colorante vital capaz de atravesar las membranas rotas de las células muertas, de manera que las células muertas aparecen teñidas de azul mientras que las vivas no lo incorporan y son refringentes cuando se observan al microscopio invertido. Una vez calculado el número de células totales y comprobado que la viabilidad celular sea siempre superior al 95%, se siembra la cantidad deseada de células en un frasco de cultivo nuevo para su mantenimiento. Para los experimentos siempre se utilizaron células en fase de crecimiento exponencial.

La línea de leucemia linfoblástica CEM se mantuvo en cultivo en suspensión, en medio RPMI suplementado con 10% de SBF y 100 µg/ml de gentamicina. Para su subcultivo las células se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en el volumen adecuado de medio. La concentración de subcultivo recomendada es de 2x10⁵ células/ml.

1.3-Congelación y descongelación de líneas celulares

Para evitar problemas derivados del cultivo ininterrumpido de las líneas celulares (alteraciones genéticas, contaminaciones, etc.), éstas se mantienen en cultivo durante un número determinado de pases (aproximadamente 20 pases). Tras este periodo se retiran y se sustituyen por células nuevas. Por ello se mantiene un stock de células congeladas de cada tipo celular que nos permite reponer la línea en cualquier momento que se precise.

- **Congelación:** Las células en crecimiento exponencial, una vez tripsinizadas y habiendo realizado el contaje, se centrifugan a 200 g durante 5 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante, el *pellet* se resuspende a una concentración de 2-4x10⁶ células/ml, dependiendo la línea celular, en SBF

con 10% de DMSO. Tras resuspender las células en el medio de congelación, se pipetea 1 ml de la suspensión por criovial y se introducen los crioviales en un “Mr. Frosty” (Nalgene® Labware/Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para mantenerlos a -80°C durante 24h en un ultracongelador. El Mr Frosty es un recipiente que contiene isopropanol y permite un descenso gradual de la temperatura hasta la congelación, minimizando la formación de cristales y por tanto, el daño y muerte celular durante este proceso. Finalmente, tras 24h a -80°C , los crioviales se almacenan en nitrógeno líquido donde se mantienen a -196°C hasta su utilización.

- **Descongelación:** A diferencia de la congelación, la descongelación debe ser lo más rápida posible, para ello los crioviales se ponen en un baño a 37°C hasta la descongelación del contenido. A continuación, se siembra el contenido del vial en un frasco de cultivo T-25 con medio nuevo y suplementado con SBF. Como las células utilizadas son adherentes, se espera 5-8 horas y se verifica si las células se han adherido al fondo del frasco. En caso positivo, se cambia el medio para eliminar el contenido en DMSO y restos de células muertas. En el caso de las células de leucemia linfoblástica aguda CEM, una vez descongelado el vial, se añaden las células a un tubo falcon con unos mililitros de medio y se centrifuga a 200 g para eliminar el DMSO. Se retira el sobrenadante y el *pellet* de células se resuspende con medio suplementado con SBF y se siembra en el frasco de cultivo.

2-Ensayo de viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se empleó un kit estandarizado XTT (Roche Molecular Biochemicals, IN, USA). Este ensayo está basado en la capacidad de las células viables de transformar la sal de tetrazolio XTT, de color amarillo, en formazán, de color naranja, en presencia de un reactivo reductor. El proceso ocurre únicamente en células viables, metabólicamente activas, mediado por el sistema “succinato-tetrazolio reductasa”, que transforma la sal de tetrazolio en formazán. La cantidad de formazán y, por tanto, de colorante naranja formado, es

fácilmente cuantificable mediante un espectrofotómetro de placas midiendo la absorbancia a 490 nm.

Para este ensayo, las células se siembran en placas de 96 pocillos de fondo plano con la densidad apropiada según la línea celular en 100 µl de medio de cultivo y se dejan toda la noche en la estufa para que se adhieran al pocillo. Al día siguiente se retira en medio de cada pocillo y se incuban las células con las concentraciones deseadas de los productos químicos testados y durante los tiempos de tratamiento establecidos.

La viabilidad celular se determina a través del ensayo colorimétrico XTT, de acuerdo a las indicaciones del suministrador: después de añadir la mezcla del reactivo reductor y XTT a los pocillos en una proporción 1:50, se incuba la placa durante 4 horas en el incubador y se procede a la lectura de las absorbancias a 490 nm mediante un espectrofotómetro de placas (Synergy™ HT, BioTek). La viabilidad celular se calcula como el porcentaje de la viabilidad celular respecto a las células control de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Absorbancia experimental}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

La concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular (IC₅₀) para la TEF y la FEX en las diferentes líneas celulares fue calculada con el programa GraphPad Prism.

3-Extracción y cuantificación de proteínas

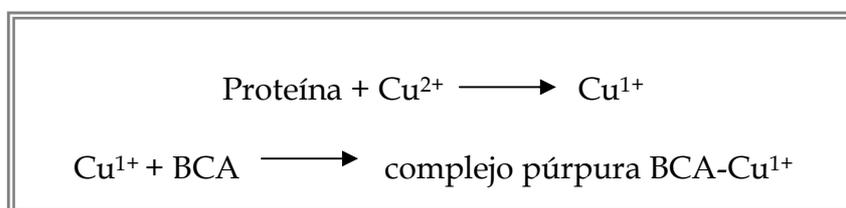
3.1-Extracción de lisados celulares

Como procedimiento general, las células se recogen mediante tripsinización, se lavan dos veces con PBS (Sigma-Aldrich) frío y se centrifugan a 200 g a 4°C durante 5 minutos. Para la obtención de los extractos de proteína se resuspende el pellet de células a una concentración de 5x10⁶ células por cada 250 µl de tampón de lisis RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato 0.5%, SDS 0.1% y Tris-HCL 80 mM pH 8) junto con el cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Tras resuspender energéticamente las muestras (debido a su gran viscosidad), los

lisados celulares se pasan a través de una aguja de insulina varias veces con el fin de romper el ADN responsable de la viscosidad de las muestras. Finalmente, se centrifugan los extractos a 15.000 g a 4°C durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante, se alicuota y se almacena a -20°C hasta su utilización.

3.2-Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración total de proteínas se utilizó el ensayo del ácido bicinonínico (BCA), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón de proteínas (Smith y cols., 1985) (tabla 10). Este ensayo se emplea para la cuantificación de proteínas mediante colorimetría. El método combina la reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) a ión cuproso (Cu^{1+}) en un medio alcalino (reacción de Biuret) y la detección de este catión (Cu^{1+}) usando un reactivo que contiene ácido bicinonínico. El producto final de la reacción es de un color púrpura formado por la unión de dos moléculas de BCA con una del ión cuproso (Smith y cols., 1985). Este complejo hidrosoluble puede ser detectado mediante absorbancia a una longitud de onda de 562 nm.



Para llevar a cabo este ensayo se preparan 50 μl de las muestras a cuantificar, diluidas en H_2O miliQ. Se realiza una recta patrón con 6 concentraciones conocidas y crecientes de BSA (tabla 10). Una vez preparadas las muestras y la recta patrón, se prepara la mezcla de la reacción, compuesta por una solución de CuSO_4 al 4% y ácido bicinonínico en una relación 1:50. Se añade 1ml de esta mezcla a cada muestra problema y a cada muestra de la recta patrón, y se incuban durante 30 minutos a 37°C en oscuridad.

Tabla 10. Concentraciones de BSA utilizadas en la recta patrón para la cuantificación de proteína.

BSA (1 mg/ml)	0 μl	10 μl	20 μl	30 μl	40 μl	50 μl
H₂O miliQ	50 μ l	40 μ l	30 μ l	20 μ l	10 μ l	0 μ l
[BSA] (mg/ml)	0	2	4	6	8	10

Tras la incubación se procede a la lectura de las absorbancias a 562 nm en un espectrofotómetro (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, Bio-Rad). Se utiliza como blanco la muestra de la recta patrón número uno, la cual no contiene BSA, y se miden las muestras.

A partir de las absorbancias obtenidas para las muestras con concentraciones conocidas de BSA, se elabora la recta patrón, y mediante la comparación de las absorbancias, se determina la concentración correspondiente a las muestras de concentración desconocida, teniendo siempre en cuenta el factor de dilución.

4-Western Blot

El western blot es una técnica analítica ampliamente utilizada para el estudio de proteínas. Este método, descrito por primera vez por Towbin y cols. en 1979, permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de la técnica se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Con esta técnica se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, y puede ser utilizada para comparar semi-cuantitativamente los niveles de proteína entre diferentes muestras.

4.1-Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) permite separar proteínas desnaturalizadas en geles con una matriz de poliacrilamida. Las proteínas son sometidas a un campo eléctrico de forma que se separan de manera proporcional a su masa.

Las muestras son desnaturizadas mediante calor en presencia de agentes desnaturizantes. Para la separación de las proteínas se utilizaron geles con un porcentaje de poliacrilamida en función del peso molecular de la proteína buscada (tabla 11). La mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5-15%.

Tabla 11. Porcentaje de poliacrilamida utilizado en función de la proteína de interés.

% Acrilamida	15%	10%	7.5%	5%
Rango KDa	12-43	16-68	36-94	57-212

Para el montaje, elaboración de los geles y la posterior electroforesis utilizamos la unidad de electroforesis "MiniProtean II" (BioRad). El gel de acrilamida está compuesto por dos partes: el *running gel* (separador), que es la parte del gel en la que realmente se separan las proteínas (tabla 12), y el *stacking gel* (concentrador), que es la parte inicial del gel donde las proteínas se concentran para iniciar la electroforesis (tabla 13).

Tabla 12. Composición del *running gel* según su porcentaje de acrilamida

Running gel	7.5%	10%	12%	15%
30% Acry-bis	3.8 ml	5 ml	6 ml	7.5 ml
2M Tris-HCL (pH 8.8)	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
H ₂ O miliQ	9 ml	7 ml	6 ml	4.5 ml
20% SDS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Tabla 13. Composición del *stacking gel* al 4% acrilamida

Stacking gel	4%
30% Acry-bis	1 ml
0.5M Tris-HCL (pH 6.8)	0.75 ml
H ₂ O miliQ	5.75 ml
20% SDS	37.5 µl
10% APS	62.5 µl
TEMED	6.25 µl

Tabla 14. Componentes del gel de poliacrilamida con SDS y su función.

Reactivo	Función
Acilamida	Moléculas que polimerizan para formar cadenas
Bisacrilamida	Formar uniones con las cadenas de acrilamida para formar el entramado
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Mantener la linearidad y la uniformidad de carga de las proteínas
Tampón Tris	Mantener el pH adecuado
Persulfato de Amonio (APS)	Generar radicales libre que catalizan la reacción de polimerización
TEMED	Aumentar la generación de radicales libres por el persulfato de amonio

Para la elaboración de los geles se mezclan los componentes (tabla 14) según las cantidades y en primer lugar se añade la mezcla del *running gel* entre los cristales del soporte evitando la formación de burbujas. Se rellena el espacio sobrante con agua o isopropanol y se deja polimerizar. Al polimerizar el *running gel* aparece una línea entre el gel y el agua; esto indica que el gel ha polimerizado y se retira el agua o isopropanol volcando el soporte. A continuación se añade la mezcla del *stacking gel* y se colocan los peines, evitando las burbujas y se dejan polimerizar nuevamente. Una vez polimerizado se colocan los cristales con los geles en la cubeta de electroforesis, se retiran los peines y se lavan los pocillos con tampón de electroforesis.

Por lo general se cargan 50 µg de proteína por muestra y pocillo. Cada muestra se mezcla con DTT y tampón de carga Laemmly y se completa con tampón de lisis RIPA hasta un volumen final de 20 µl. Se hierven las muestras durante 5 minutos a 95°C y se cargan los pocillos con las muestras. El primer pocillo del gel se reserva para cargar 4 µl del marcador de pesos moleculares "Precision Plus Protein™ Standards" (BioRad, Hercules, CA, USA). Una vez cargadas las muestras se añade más tampón de electroforesis y se conecta la fuente de alimentación "Power Pac

Basis Power Supply” (BioRad, Hercules, CA, USA) (figura 18) bajo las siguientes condiciones:

- 100V y 15 mA/gel durante 10 minutos. Premigración en el *stacking gel*.
- 180V y 20 mA/gel durante 1 hora aproximadamente. Migración del *running gel*.

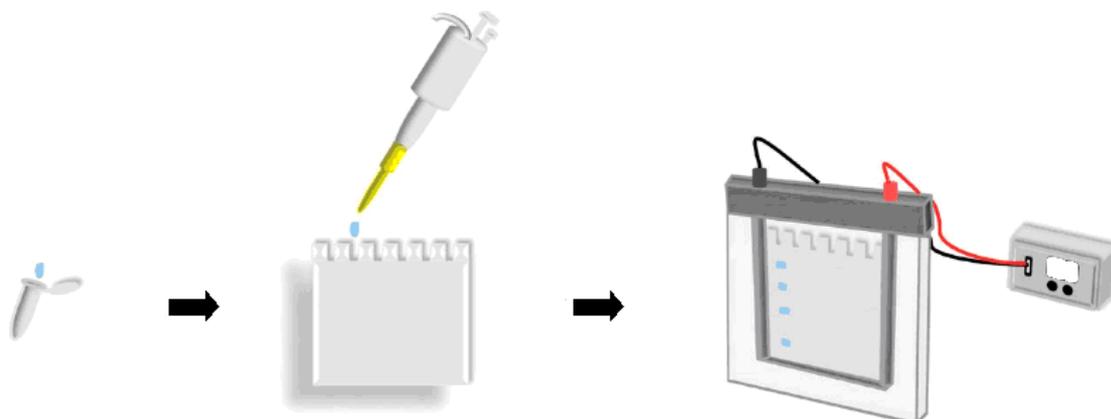


Figura 18. Representación esquemática de la electroforesis en acrilamida con SDS.

4.2-Transferencia

La transferencia consiste en transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Whatman GmbH-GE Healthcare, Dassel, Alemania) aplicando voltaje. La transferencia se realiza en un medio húmedo y para ello se emplea la unidad de transferencia “Mini TransBlot” (BioRad). Este sistema consiste en la elaboración de un “sándwich” simétrico que se compone de dos capas de papel de filtro y una esponja. Previamente a comenzar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa, los papeles de filtro y las esponjas se sumergen en una cubeta con tampón de transferencia (tabla 15) durante al menos 20 minutos.

Tabla 15. Composición del tampón de transferencia.

Tampón de Transferencia	
Tris	5.8 g
Glicina	29 g
SDS	1 g
Metanol	200 ml
Completar hasta 1 litro con H ₂ O miliQ	

Una vez preparado el “sándwich” se introduce en el *cassette* de transferencia y se coloca en la cubeta con el tampón de transferencia, teniendo en cuenta que las proteínas migran hacia el ánodo (figura 19). La transferencia se realiza bajo corriente eléctrica de 300 mA durante 3 horas a temperatura ambiente. Alternativamente también puede realizarse durante toda la noche a 4°C a menor voltaje, 40 voltios.

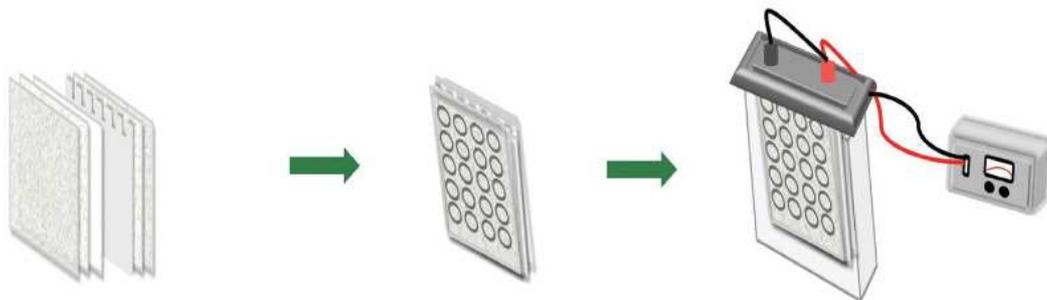


Figura 19. Representación esquemática de la transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa en medio húmedo.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se tiñe con una solución de rojo Ponceau durante 2 minutos en agitación (Rojo Ponceau al 0.1% (p/v) y ácido acético glacial 1% (v/v)) y se lava con TBS hasta visualizar las bandas. Así se comprueba que la transferencia se ha realizado adecuadamente. Una vez visualizadas las bandas continuamos con los lavados de la membrana con TBS hasta la eliminación del colorante.

4.3-Inmunomarcaje

El bloqueo se llevó a cabo incubando la membrana con una solución diseñada para reducir los lugares de unión no específicos al anticuerpo. Las soluciones de bloqueo habituales son la leche desnatada en polvo o albúmina de suero bovino (BSA). La primera elección fue la utilización de leche desnatada en polvo, pero debido a la presencia de biotina en las fosfoproteínas es preferible la BSA cuando los anticuerpos que se van a utilizar son fosfoespecíficos. En la tabla 16 se muestran los porcentajes utilizados en las soluciones de bloqueo.

Tabla 16. Composición de la soluciones de bloqueo.

Leche desnatada en polvo	Albúmina de suero bovino (BSA)
5% de leche en TBS	1% de BSA + 0.1% de azida sódica en TBS

Tras incubar la membrana durante una hora a temperatura ambiente con el agente bloqueante, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C a la dilución apropiada (tabla 7). Tras la incubación se lavaron las membranas 10 minutos con TBS, 15 minutos con TBS-Tween 0.1% y 10 minutos con TBS. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-*rabbit* o anti-*mouse* conjugado con peroxidada, en función del origen del anticuerpo primario) a la dilución apropiada (tabla 8) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación (figura 20). Finalmente se realizaron 3 lavados con TBS y TBS-Tween 0.1% como se ha indicado anteriormente y se procedió al revelado de la membrana.

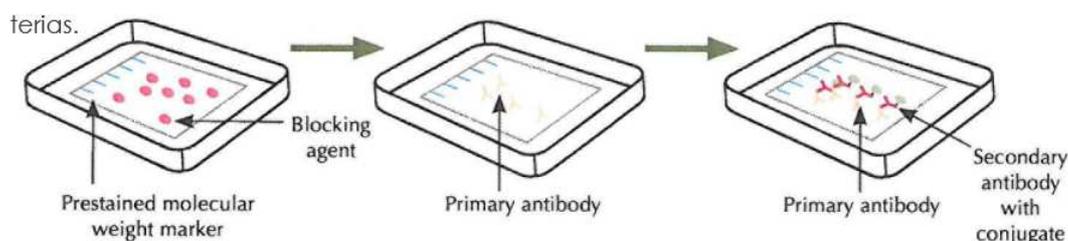


Figura 20. Representación esquemática de la hibridación de la membrana de nitrocelulosa con los anticuerpos primario y secundario.

4.4-Revelado

La detección de las proteínas fijadas en la membrana de nitrocelulosa y marcadas con anticuerpos específicos, se realizó utilizando el método de quimioluminiscencia ECL (Enhanced ChemiLuminiscence assay), SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific). Este kit emplea el luminol como sustrato del enzima peroxidada conjugado al anticuerpo secundario (figura 21). Para ello se mezclaron volúmenes iguales de solución 1 y solución 2 del kit ECL, en cantidad suficiente para cubrir la membrana. La membrana fue incubada durante 1 minuto a temperatura ambiente; las imágenes se revelaron en un documentador de geles (G:BOX, SYNGENE, Cambridge, Reino Unido) con el programa *GeneSnap* de Izasa (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona), de forma que las imágenes quedaron digitalizadas.

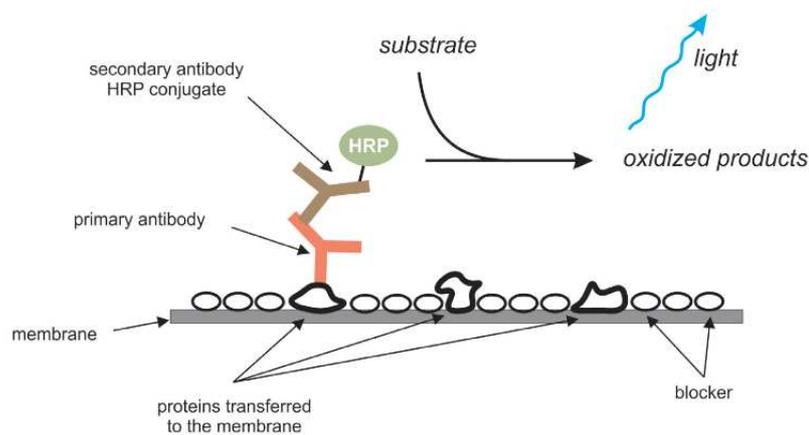


Figura 21. Representación esquemática de la detección quimioluminiscente de las bandas de proteínas.

5-Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es una técnica basada en la fluorescencia que nos permite visualizar parámetros relacionados con características antigénicas de las células. Para ello se marcan las células con moléculas fluorescentes, fluorocromos (como el 4'-6' diamine-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI) o con anticuerpos primarios específicos de antígeno y secundarios conjugados con fluorocromos, que reconocen a los primarios (inmunofluorescencia indirecta). Las moléculas fluorescentes absorben la luz de una determinada longitud de onda y emiten luz

de otra longitud de onda más larga. Si un fluorocromo es iluminado a su longitud de onda absorbente y visualizado a través de un filtro que sólo permita pasar la luz de longitud de onda igual a la de la luz emitida, el componente aparece brillante sobre un fondo oscuro. La intensidad y el color de la luz es una propiedad característica de la molécula fluorescente utilizada. Para analizar el marcaje se emplean microscopios de fluorescencia, que tienen lámparas capaces de excitar las muestras y filtros que seleccionan la longitud de onda de emisión del fluorocromo.

5.1-Preparación del soporte para la inmunofluorescencia

Se utilizaron cubreobjetos redondos de 12 mm Ø como soporte para realizar las inmunofluorescencias, esterilizados previamente con etanol al 70%. Tras depositarlos en los pocillos de las placas de 24 pocillos, se sometieron a luz ultravioleta durante 20 minutos para completar su esterilización. A continuación se lavaron con abundante PBS estéril y se sembraron las células sobre ellos.

5.2- Reacción de inmunofluorescencia

Las células depositadas en los pocillos se incubaron en la estufa durante 24 h para permitir su adhesión a los cubreobjetos. Tras realizar los tratamientos experimentales correspondientes, las placas se centrifugaron a 300g durante 2 minutos para evitar la pérdida de células que pudieran haber perdido su adhesividad tras los tratamientos. A continuación se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente incubándolas con una solución fijadora compuesta por paraformaldehído al 4% en PBS. Tras varios lavados con PBS, se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 1-4 minutos y se procedió a su marcaje con anticuerpos. La unión de los anticuerpos a lugares inespecíficos se bloqueó mediante la incubación con BSA al 1% diluído en PBS y ajustado su pH a 7.5 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se diluyeron los anticuerpos primarios en las mismas condiciones que la solución de bloqueo, a las concentraciones mostradas en la tabla 7, y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron los cubreobjetos con PBS y

procedimos a incubar el anticuerpo secundario durante 1 hora en PBS en oscuridad. Tras realizar tres lavados con PBS, se contrastaron los núcleos con DAPI en PBS durante 10 minutos en oscuridad a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y de nuevo volvimos a lavar con PBS. Por último montamos los cubreobjetos con las células en portaobjetos sobre una gota de Fluoromount-G (Southern-Biotech) y examinamos las muestras mediante un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop).

6-Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que nos permite el recuento y clasificación de las células según sus características morfológicas (tamaño, complejidad de su núcleo y citoplasma) así como la cuantificación, mediante fluorocromos, de parámetros relacionados con las características antigénicas de cada célula. Es una técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células, que por tanto serán una muestra representativa del conjunto poblacional. El fundamento de la citometría de flujo se basa en hacer pasar una suspensión de células alineadas, de una en una, por delante de un haz de láser. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y dichas señales son las que, tras ser digitalizadas, ofrecen información en forma de histogramas.

6.1-Detección de apoptosis

Para discriminar entre el tipo de muerte celular (apoptosis *vs.* necrosis) se utilizó el método de la Anexina V-FITC Apoptosis Detection kit (Calbiochem) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la traslocación de la fosfatidil serina de la membrana celular desde la cara interna (donde se localiza en las células sanas) a la parte externa de la misma (proceso característico de las fases iniciales de la apoptosis). Esta externalización se produce antes de que la membrana sea permeable al yoduro de propidio (YP). Debido a que el YP es un marcador vital, solamente penetra en aquellas células que han perdido la

integridad de su membrana plasmática; en consecuencia, la tinción simultánea con anexina V-FITC y YP, permite, mediante un análisis biparamétrico, discriminar entre las células sanas (anexina -, YP -), apoptóticas tempranas (anexina +, YP -) y apoptóticas tardías o necróticas (anexina +, YP +).

Las muestras teñidas se analizaron con un citómetro de flujo (Gallios™ Flow Cytometer-Beckman Coulter); la distribución de las células en base a su marcaje se analizó con el programa Summit v4.3

7-Análisis de la expresión de los receptores de la histamina mediante PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN concreto. Esta técnica se basa en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente. La PCR fue perfeccionada por Kary Mullis en la década de 1980. Esta técnica se ha ido perfeccionando y modificando hasta desarrollar distintas variantes de la misma. En el caso de que el ácido nucleico a analizar sea el ARN, es necesario añadir un paso previo conocido como retrotranscripción, que consiste en sintetizar ADN complementario (ADNc) de doble cadena a partir de ARN monocatenario por la acción de la enzima transcriptasa reversa.

7.1-Extracción y purificación de ARN

Para la extracción de ARN de las líneas celulares se utilizó el kit RNeasy Mini kit (Quiagen) y se procedió según las instrucciones del fabricante. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente y con material estéril. Las células en cultivo fueron tripsinizadas con una solución de Tripsina-EDTA durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido este tiempo la tripsina se inactivó con SBF y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. A continuación se retiró el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* con PBS. Se contó el número de células y se separaron 1×10^7 células para

llevar a cabo la extracción de ARN. Se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos y se retiró el PBS. El *pellet* se resuspendió con 600 μ l de una solución que se compone de 1 ml de tampón *RLT* y 10 μ l de β -mercaptoetanol. Para que la lisis celular fuera completa y homogénea, se pasó la muestra 10 veces a través de una jeringuilla con una aguja de 20 g. Se añadieron 600 μ l de etanol al 70% y se pipeteó vigorosamente (en ningún caso se centrifuga en este paso). A veces puede formarse un precipitado que no afecta al proceso. Se transfirieron 700 μ l de la muestra a una "columna de separación RNeasy" y se centrifugó a 8.000 g durante 15 segundos. Se desechó el eluido y se colocó la columna en el mismo tubo colector. Este paso se repitió tantas veces como fue necesario para recoger la muestra en su totalidad. A continuación se añadieron 700 μ l de tampón RW1 en la columna para limpiarla y se centrifugó a 8.000 g durante 15 segundos. Se volvió a desechar el eluido y se procedió al tratamiento con DNAsa, para lo cual se añadieron 80 μ l de una solución que contenía 10 μ l de DNAsa y 70 μ l de tampón *RDD*. Es importante mezclar bien esta solución antes de añadirla hasta que esté homogénea. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente (20-30°C) y a continuación se añadieron 700 μ l de tampón RW1 y se centrifugó durante 15 segundos a 8.000 g. Se desechó el eluido y se transfirió la columna a un nuevo tubo colector. A continuación se realizaron dos lavados con 500 μ l de tampón RPE cada uno, centrifugando a 8.000 g durante 15 segundos en el primer lavado y durante 2 minutos en el segundo. Finalmente se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se eluyó el ARN añadiendo 50 μ l de agua DEPC (Ambion® Inc., Foster City, CA, USA), mediante centrifugación a 8.000 g durante 1 minuto. Las muestras se etiquetaron y se almacenaron a -80°C hasta su uso para asegurar la integridad del ARN.

7.2-Cuantificación y verificación del estado del ARN

Para la cuantificación de la concentración de ARN utilizamos un espectrofotómetro de placas (Synergy™ HT, BioTek Inc. Winooski, VT, USA) provisto del accesorio Take3 Micro-Volumen Plate (BioTek). Este sistema nos permite medir la concentración de la muestra sin diluirla utilizando únicamente 2

μl de la muestra. En primer lugar se utiliza agua DEPC como referencia y se procede a la medida de las muestras por duplicado. La concentración de ARN se obtuvo a partir de 1×10^7 células en cultivo y para comprobar el estado del ARN y verificar su integridad, se realizó una electroforesis en un gel al 2% de agarosa con GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, CA, USA) en el que se cargó 1 μg de ARN. Tras 20 minutos de electroforesis se comprueba bajo la luz ultravioleta la presencia de las dos bandas 28S y 18S del ARN ribosomal, las cuales garantizan que el ARN extraído no está degradado.

7.3-Retrotranscripción

La retrotranscripción o transcripción inversa es un proceso que implica la síntesis de una cadena de ADN de doble hebra a partir de una cadena simple de ARN. Este proceso está mediado por varias enzimas, pero es la enzima transcriptasa inversa la encargada de la síntesis del ADN. Para realizar la retrotranscripción se utiliza el iScript™ cDNA Synthesis kit (BioRad) siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante y la reacción tiene lugar mediante incubación en un termociclador (iCycler MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System; BioRad). A continuación se detallan los componentes y volúmenes utilizados en el kit (tabla 17), así como el programa utilizado en el termociclador (figura 22).

Tabla 17. Volúmenes necesarios para la reacción de retrotranscripción con iScript™

ARN	1 μg
<i>5x iScript Reaction Mix</i>	4 μl
<i>iScript Reverse Transcriptase</i>	1 μl
Agua DEPC	Añadir hasta completar un volumen final de 20 μl

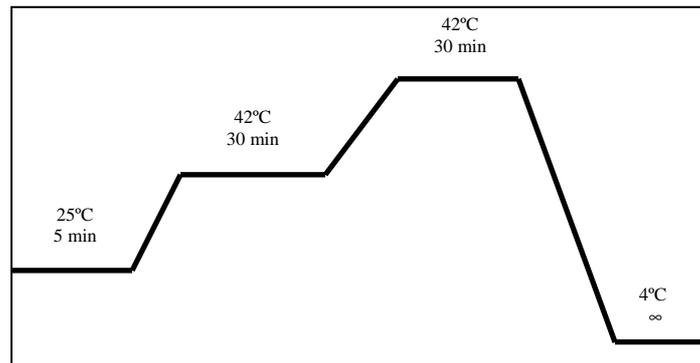


Figura 22. Ciclo de temperaturas para la reacción de retrotranscripción con iScript™

7.4-Diseño de cebadores

Un cebador o *primer* es un oligonucleótido de secuencia corta de alrededor de 20 bases de longitud necesario para que la ADN polimerasa comience a añadir nucleótidos por el extremo 3'. Los cebadores poseen una secuencia de bases complementarias a la del fragmento de ADN que se desea amplificar.

Para que los cebadores tengan una buena eficiencia en la amplificación de la secuencia deseada es importante su correcto diseño. Para ello lo primero es buscar la secuencia del gen a estudiar en las bases de datos UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) o NCBI National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se descarga la secuencia en formato FASTA y utilizando el programa Primer3 v. 4.0 (<http://primer3.ut.ee/>) se procede a diseñar los cebadores intentando ajustarse al máximo a las siguientes condiciones: longitud entre 19 y 24 nucleótidos, temperatura de anillamiento óptimo entre 58 y 60°C, que en las últimas cinco bases del extremo 3' no haya más de dos G ó C, que el contenido CG esté entre 40 y 60% y que no presente repeticiones del mismo nucleótido cuatro veces (tabla 18).

Una vez diseñados los cebadores se comprueban en la base de datos UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>), que permite realizar una PCR *in silico* y de esta manera verificar que los cebadores diseñados son específicos para la secuencia del gen a estudiar y no muestran homologías con otras regiones.

Tabla 18. Cebadores utilizados para PCR convencional.

Gen	Secuencia de los cebadores	Tamaño del amplicón (pb)	T _m (°C)
HRH1	Fw 5'-TAAGCTGAGGCCAGAGAACC-3' Rv 5'-TACTGTCTTGAATGCGAGCG-3'	492	59°C
HRH4	Fw 5'-GGTACATCCTTGCCATCACATCAT-3' Rv 5'-ACTTGGCTAATCTCCTGGCTCTAA-3'	396	59°C
β-actina	Fw 5'-AGATGACCCAGATCATGTTTGAG-3' Rv 5'-GTCACCGGAGTCCATCACG-3'	119	59°C

7.5- PCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (iCycler MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System; BioRad). La mezcla de reacción se constituyó con 12,5 µl de ImmoMix Red (Bioline), 9,5 µl de agua DEPC, 1 µl de cada cebador (dilución 1:5 de un stock de concentración de 10 µM) y 1 µl de ADNc. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (figura 23):

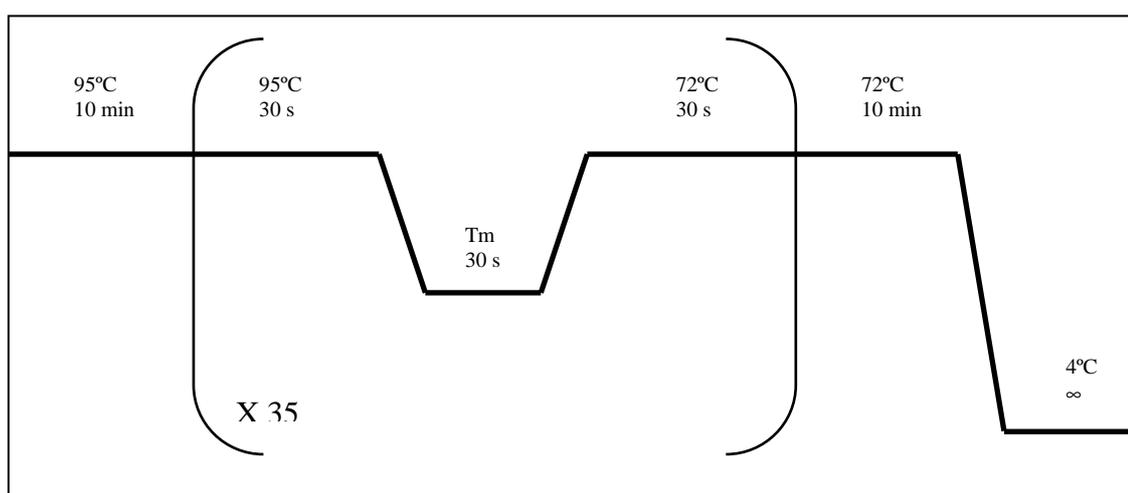


Figura 23. Condiciones de amplificación para la PCR

A continuación se realizó una electroforesis con los productos obtenidos de la amplificación por PCR en un gel al 2% de agarosa con GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, CA, USA). Se añadió un marcador de pesos moleculares

(HyperLadder II. Bioline) para comprobar que los productos amplificados son del tamaño correspondiente a los pares de bases. Tras 20-25 minutos de electroforesis se comprobó bajo la luz ultravioleta la presencia de las bandas correspondientes a los amplificados.

8-Expresión de receptores muscarínicos en líneas celulares y estudio de la afinidad de la terfenadina por dichos receptores

El estudio autorradiográfico se realizó siguiendo, en líneas generales, la metodología descrita por Cortés (Cortés y cols., 1984), con pequeñas modificaciones (Rodríguez-Puertas y cols., 1997). Los microarrays de membranas celulares se dejaron secar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se comenzó el ensayo con la incubación de los microarrays durante 60 minutos a 30°C en tampón fosfato 50 mM (HNa₂PO₄, H₂NaPO₄; pH 7.3) con [³H]N-metilescopolamina ([³H]-NMS) (3 nM) en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de terfenadina. La fijación no específica se determinó con atropina (10 µM). Después, se realizaron dos aclarados rápidos con el tampón fosfato a 4°C, tras lo cual las secciones se lavaron dos veces en tampón frío durante 5 minutos cada vez. Transcurrido este tiempo, se realizó una doble inmersión rápida en agua destilada fría y se dejaron secando bajo una corriente de aire frío (4°C). Posteriormente, las secciones de tejido se expusieron a una película radiosensible (Kodak Biomax MR) durante 4 meses, que se reveló de forma similar a una película fotográfica. El marcaje se cuantificó transformando las diferentes densidades de grises a fmol/mg proteína. Para ello, cada película se expuso junto con estándares comerciales, [³H]-microescalas, previamente calibrados (Amersham).

9- Desplazamiento de la fijación de [³H]-Dihidrorotenona por terfenadina en microarrays de membranas aisladas de líneas celulares.

El estudio autorradiográfico se realizó siguiendo en líneas generales la metodología descrita por Greenamyre (Greenamyre y cols., 1992, Higgins y cols., 1996), con pequeñas modificaciones.

Los microarrays de membranas celulares se dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente (t.a.) tras lo cual se realizó una preincubación de 30 minutos en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,6). Una vez transcurrido este tiempo se comenzó el ensayo con la incubación de los microarrays durante 120 minutos a t.a. en Tris-HCl 50 mM (BSA 1%; NADH 200µM; pH 7,6) con [³H]-DHR 5 nM en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de terfenadina. La fijación no específica se determinó con rotenona (100 µM). Después, se realizaron dos aclarados rápidos con el tampón Tris-HCl 50 mM (BSA 1%; pH = 7,6) a 4°C y se dejaron lavando durante 60 minutos en dicho tampón a 4°C. Posteriormente los microarrays se lavaron dos veces en tampón Tris-HCl 25 mM frío durante 5 minutos cada vez y a continuación se realizó una doble inmersión rápida en agua destilada fría. Los microarrays se dejaron secando bajo una corriente de aire frío (4°C) y una vez secos se expusieron a una película radiosensible (Kodak Biomax MR) durante 3 meses, que se reveló de forma similar a una película fotográfica. El marcaje se cuantificó transformando las diferentes densidades de grises a pmol/ng proteína. Para ello, cada película se expuso junto con estándares comerciales, [³H]-microescalas, previamente calibrados (Amersham).

10-Determinación de la actividad NADH deshidrogenasa (Complejo I)

La detección de la actividad del Complejo I se llevó a cabo realizando algunas modificaciones en el protocolo descrito por Janssen y cols. (Janssen y cols., 2007). La actividad se determinó a temperatura ambiente midiendo la absorbancia a 595 nm cada 10 segundos durante 40 minutos en un Multiskan microtiter plate reader (Thermo Scientific). La mezcla de reacción incluía 25 mM tampón fosfato (pH 7.4), 3 mg/ml seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma), 60 µM decilubiquinona (Sigma), 160 µM 2,6-dichloroindophenol (DCIP) (Sigma), 0.7 mM NADH (Sigma) y 5 µM antimicina-A (Sigma). Asimismo, la inhibición de la actividad del complejo I se determinó añadiendo 100 µM de terfenadina y 10 µM de rotenona (Sigma). Para dar comienzo a la reacción se añadieron las membranas de corazón de rata *Sprague*

Dawley a una concentración final de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se realizaron diferentes controles de la reacción para descartar posibles interacciones.

11-Determinación de la actividad CcO (Complejo IV)

El ensayo de la Citocromo c Oxidasa (CcO) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Wong-Riley (Wong-Riley, 1979) con algunas modificaciones. La determinación se realizó a temperatura ambiente mediante medición de la absorbancia en el espectrofotómetro Multiskan microtiter plate reader (Thermo Scientific) a dos longitudes de onda (595 y 620 nm) cada 10 minutos durante 16 horas (10-960 min). La solución de reacción se realizó en tampón fosfato (PB) 0,1 M a pH 7,4 y se utilizó 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma) 1.3 mM como cromógeno. Asimismo, dependiendo de la condición a estudio, se añadió NADH (Sigma) a una concentración final de 0.7 mM, el inhibidor rotenona (Sigma) a una concentración final de 10 μM y el antihistamínico terfenadina a una concentración final de 100 μM . De este mismo modo, se realizaron diferentes controles de la reacción para descartar posibles interacciones. La solución de reacción se preparó en el momento de uso y se evitó la exposición a la luz. La concentración de las membranas de los tejidos empleada fue de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se obtuvieron a partir de corazón de ratas *Sprague Dawley*.

12-Análisis del calcio intracelular

Para analizar los cambios en los niveles de calcio intracelular, utilizamos la sonda fluorescente Fluo-4 AM (Invitrogen). Esta sonda en el interior de la célula pierde el grupo acetoximetilo (AM) y se une al calcio, actuando como indicador de las variaciones intracelulares del mismo en las células. La excitación de Fluo-4 se produce a 488 nm.

Para este ensayo utilizamos placas de 35 mm de diámetro con el fondo de vidrio. Sembramos las células en un volumen final de 2 ml y una densidad de 600.000 células/placa. Al día siguiente añadimos la sonda Fluo-4 al 1 X diluida en medio (el stock se encuentra preparado al 1.000 X) y la incubamos en la estufa durante 30 minutos. A continuación retiramos el medio y lavamos durante 20 minutos con

medio de cultivo. A continuación realizamos un *time-lapse* mediante microscopía confocal, añadiendo el tratamiento momentos antes de empezar la captura de imágenes. Las imágenes se analizaron y trataron con el software ImageJ.

13-Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante la prueba t de Student. $P < 0.05$ fue considerado como estadísticamente significativo, $P < 0.01$ fue considerado como estadísticamente muy significativo y $P > 0.05$ fue considerado estadísticamente no significativo.

RESULTADOS

1.-EFECTO DE LA TERFENADINA Y FEXOFENADINA SOBRE DIFERENTES LÍNEAS TUMORALES HUMANAS

1.1.-La terfenadina induce citotoxicidad en las células de melanoma, adenocarcinoma de colon, mama y neuroblastoma.

En primer lugar, determinamos el efecto citotóxico de la terfenadina en 4 líneas de melanoma humano (MEL-JUSO, MEL-HO, COLO-800 y RPMI-7951) mediante el ensayo de viabilidad XTT. Las células se trataron durante 24 horas con concentraciones crecientes de terfenadina desde 5 μM hasta 20 μM .

Como se puede observar en la figura 24, la terfenadina indujo una disminución de la viabilidad celular en todas las líneas analizadas donde, a la concentración más elevada se obtienen valores de viabilidad cercanos a cero. La concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad (IC_{50}) a las 24 horas de tratamiento fue similar en las líneas MEL-JUSO, MEL-HO y COLO-800, siendo cercana a 10 μM (tabla 19), mientras que para la línea RPMI-7951 fue ligeramente más alta.

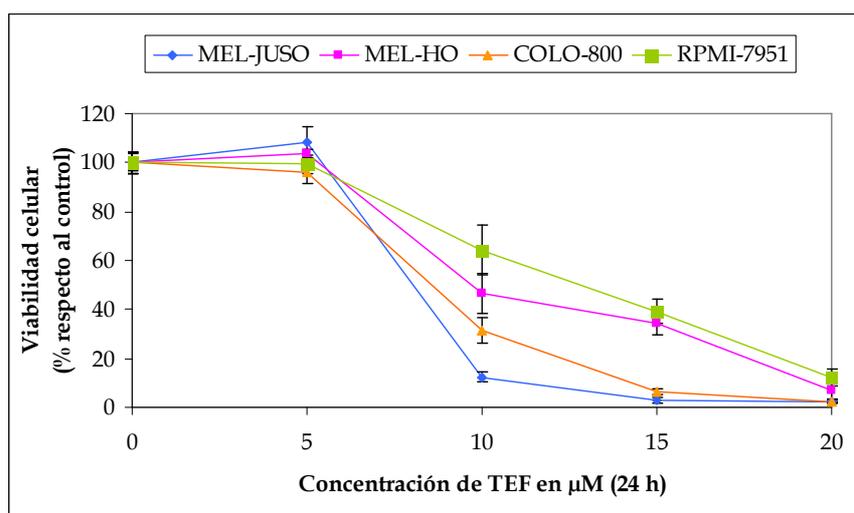


Figura 24. Efecto de la terfenadina sobre la viabilidad de células de melanoma humano. Las líneas celulares MEL-JUSO, MEL-HO, COLO-800 y RPMI-7951 fueron tratadas con diferentes concentraciones de terfenadina durante 24 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

A partir de estos resultados, analizamos si el efecto de la terfenadina era exclusivo de líneas de melanoma o podría ser similar en otros tipos tumorales. Determinamos la viabilidad en células de adenocarcinoma de colon (HCT8), adenocarcinoma de mama (MCF7) y neuroblastoma (SMS-KCNR) tratadas durante 24 horas con terfenadina a diferentes concentraciones (5 - 25 μ M). Los resultados (figura 25) mostraron que la terfenadina también produce un efecto citotóxico en las tres líneas celulares. En el caso de las células HCT8 y MCF7 (adenocarcinoma de colon y mama, respectivamente), la viabilidad celular fue inferior al 20% con la dosis de 20 μ M de terfenadina, mientras que la línea de neuroblastoma SMS-KCNR se mostró un poco más resistente a la droga, manteniéndose la viabilidad a niveles un poco mayores. Para todas estas líneas celulares, los valores IC₅₀ fueron más elevados que los obtenidos para el melanoma humano (tabla 19) si bien en ningún caso fueron superiores a 20 μ M.

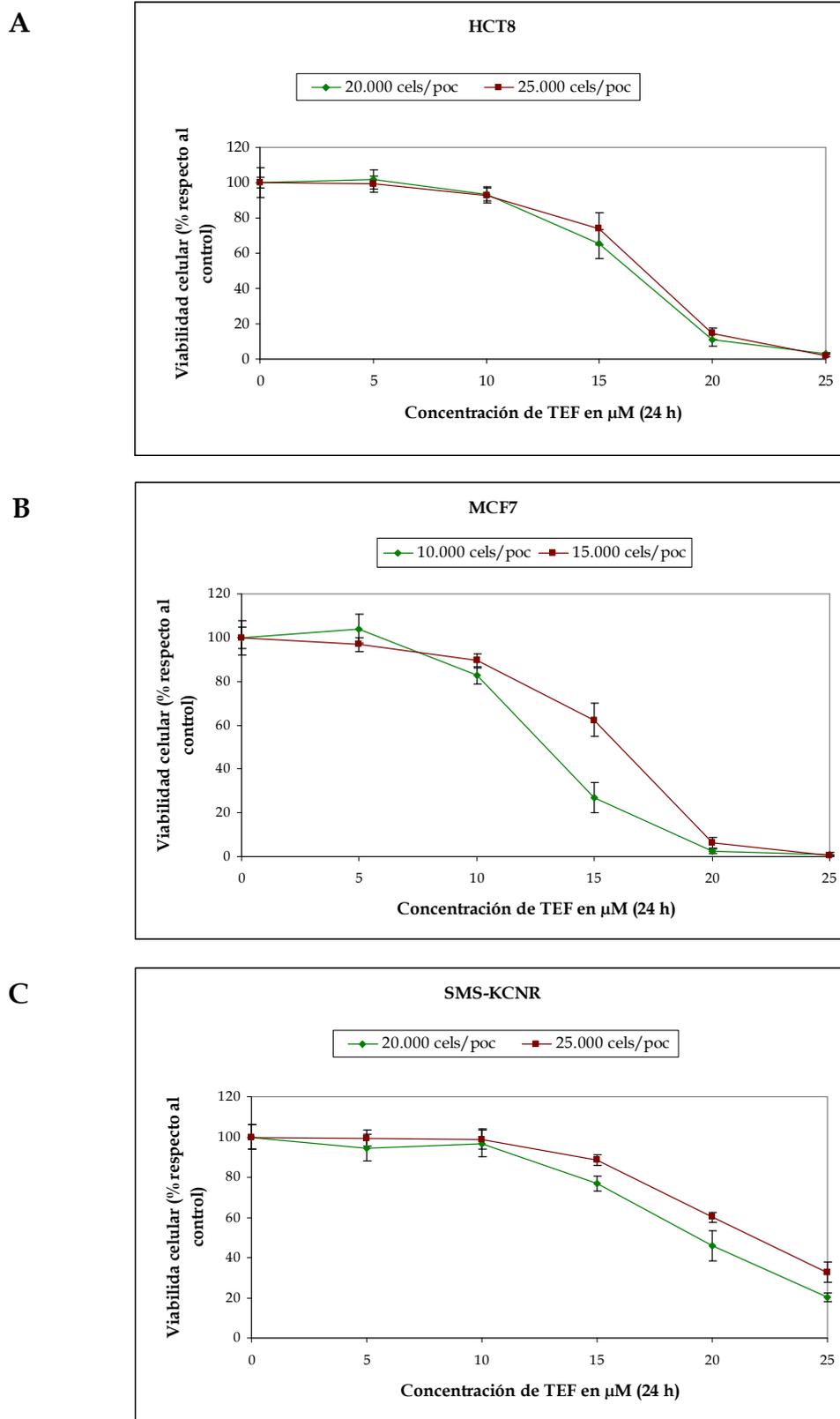


Figura 25. Efecto de la terfenadina sobre la viabilidad de células HCT8 (A), MCF7 (B) y SMS-KCNR (C). Las células HCT8, MCF7 y SMS-KCNR fueron tratadas con diferentes concentraciones de terfenadina durante 24 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

Tabla 19. Efecto de la terfenadina y la fexofenadina en la viabilidad celular en 7 líneas tumorales. Cálculo del IC₅₀. Los valores de la IC₅₀ fueron calculados con el programa GraphPad Prism.

Valores de IC ₅₀ (μM)		
	TEF	FEX
MEL-JUSO	9,1	>100
MEL-HO	9,9	>100
COLO-800	9,6	>100
RPMI-7951	12,25	>100
HCT8	15,45	>100
MCF7	15,22	>100
SMS-KCNR	21,75	>100

1.2- La fexofenadina, metabolito activo de la terfenadina, no tiene actividad antitumoral.

Para evaluar si la fexofenadina, el principal metabolito activo de la terfenadina, ejerce un efecto citotóxico sobre las diferentes estirpes tumorales, las células en cultivo se trataron con concentraciones de 5 a 100 μM de fexofenadina durante 24 horas. Los resultados no evidenciaron diferencias de viabilidad celular respecto al control en ninguna de las líneas celulares analizadas (figura 26), lo cual indica que la citotoxicidad es inducida por la terfenadina y no a través de los productos derivados de su metabolismo.

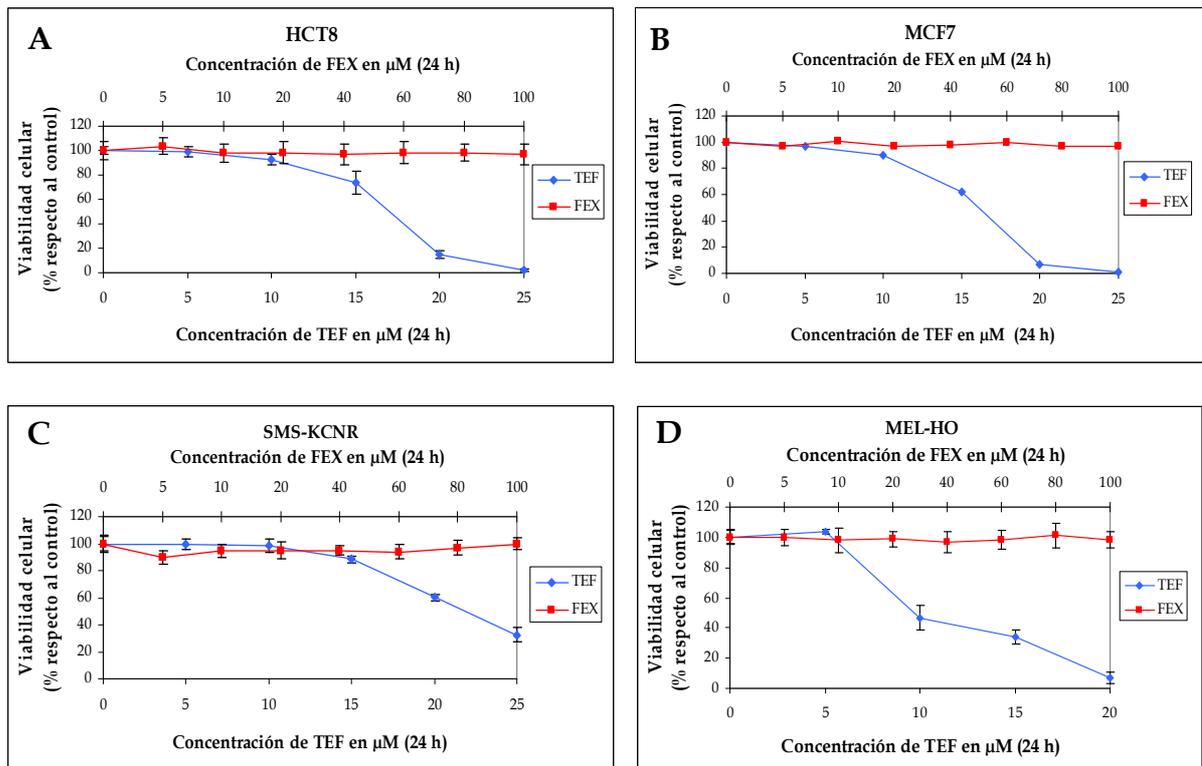


Figura 26. Efecto de la fexofenadina y de la terfenadina sobre la viabilidad de células HCT8 (A), MCF7 (B), SMS-KCNR (C) y MEL-HO (D). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de fexofenadina y terfenadina durante 24 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

1.3.- La terfenadina induce apoptosis y autofagia en células de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama, neuroblastoma y melanoma

Para comprobar si el efecto citotóxico de la terfenadina está relacionado con su capacidad para inducir apoptosis y/o autofagia, analizamos mediante western blot, la activación de las proteínas caspasa-3 y LC3B, implicados en la apoptosis y el proceso autofágico respectivamente.

Como se observa en la figura 27, la activación de la caspasa-3 es evidente a partir de las 24 horas de tratamiento. Sin embargo, la activación de la proteína LC3B y su fragmentación en LC3B-I y LC3B-II se aprecia desde las primeras 4 horas de tratamiento con la terfenadina en las cuatro líneas tumorales. Los resultados sugieren por tanto, que la autofagia se produce simultáneamente a la inducción del proceso apoptótico.

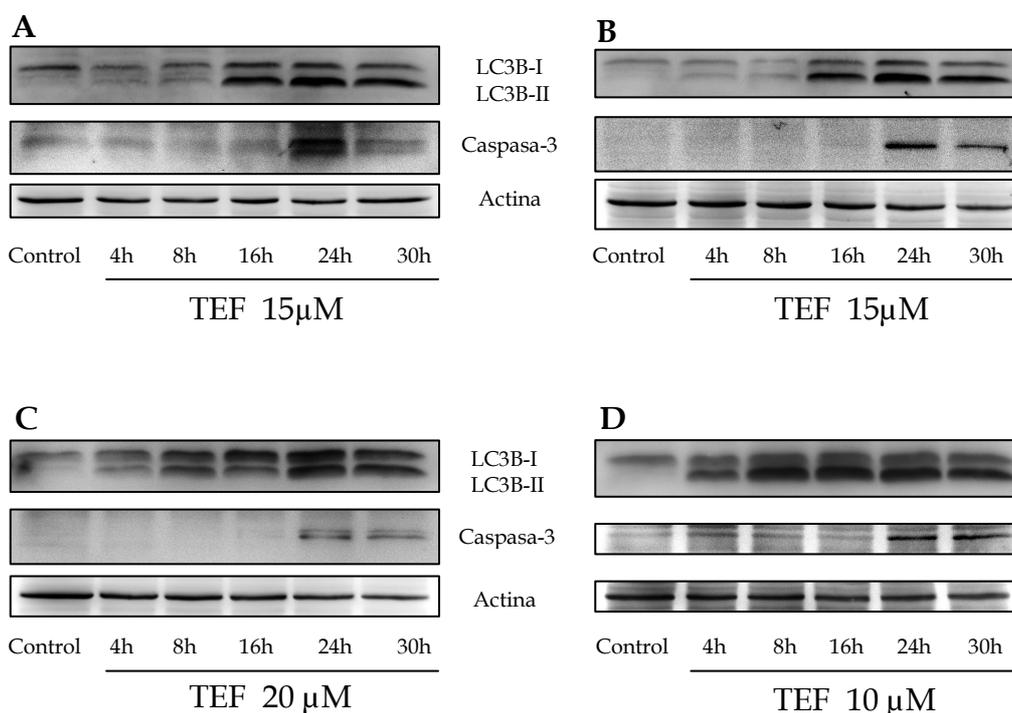


Figura 27. Participación de la apoptosis y autofagia en la muerte inducida por terfenadina. Las células de adenocarcinoma de colon (A), carcinoma de mama (B), neuroblastoma (C) y melanoma (D) fueron tratadas con terfenadina durante diferentes tiempos a la concentración correspondiente a su IC₅₀. Las proteínas de los lisados celulares (50 μg) fueron separadas por electroforesis y la expresión de caspasa-3 y LC3B fueron analizadas mediante western blot. La detección de actina se empleó como control de carga. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente.

Adicionalmente demostramos, mediante tinción nuclear fluorescente con DAPI la condensación y marginación de la cromatina y la fragmentación nuclear características del proceso apoptótico (figura 28).

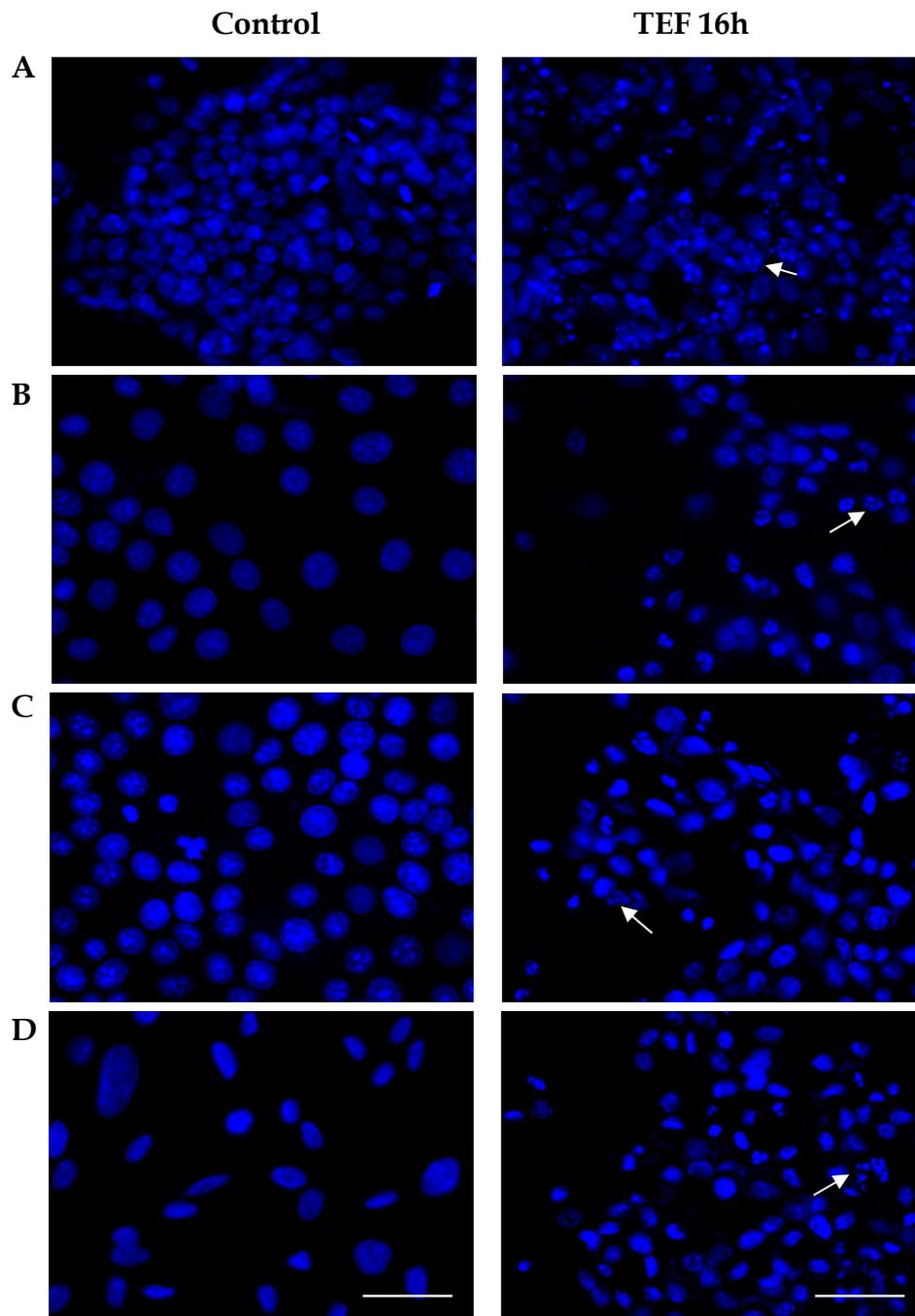


Figura 28. Imágenes de microscopía de fluorescencia de las líneas celulares tratadas con terfenadina. Las células de adenocarcinoma de colon (A), carcinoma de mama (B), neuroblastoma (C) y melanoma (D) fueron tratadas con terfenadina a la concentración correspondiente a su IC_{50} . Tras 16 horas de tratamiento fueron teñidas con DAPI y observadas mediante microscopía de fluorescencia. Las flechas blancas señalan núcleos de células apoptóticas. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente. Barra= 50 μ m.

1.4.-La terfenadina produce daño en el ADN de las células de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama, neuroblastoma y melanoma

Estudiamos, mediante western blot, el efecto de la terfenadina sobre el ADN. Concretamente analizamos la expresión de la forma fosforilada de la histona H2A.X (en la Ser139), denominada γ H2A.X. Esta fosforilación tiene lugar cuando se producen en el ADN roturas de doble cadena (DSBs) (Rogakou y cols., 2000) y representa, por lo tanto, daño genómico. Tal y como se muestra en la figura 29, la terfenadina aumenta la expresión de γ H2A.X fosforilada. Observamos que, en todas las líneas analizadas, la fosforilación de la histona aumenta de forma significativa a partir de las 16-24 horas de tratamiento con terfenadina.

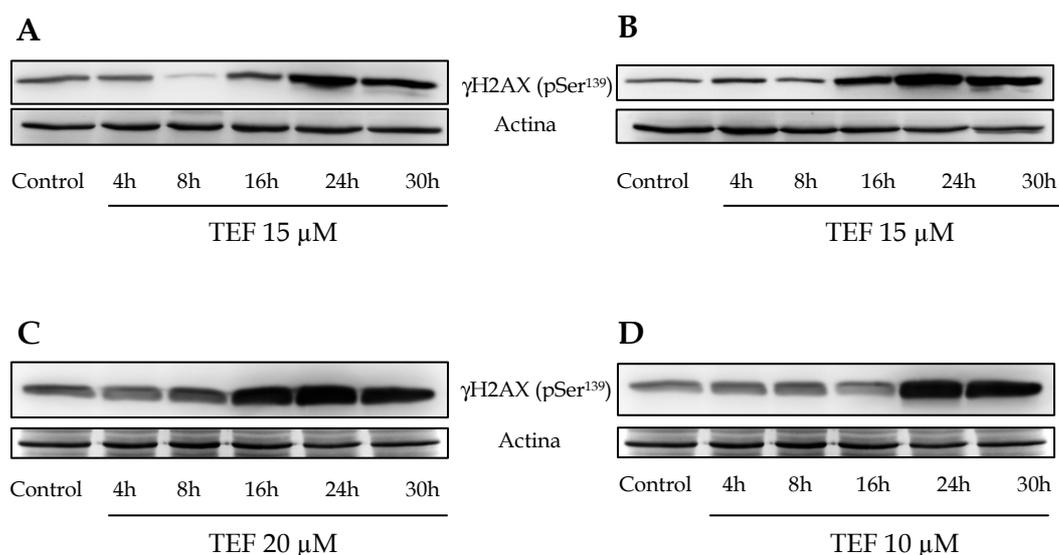
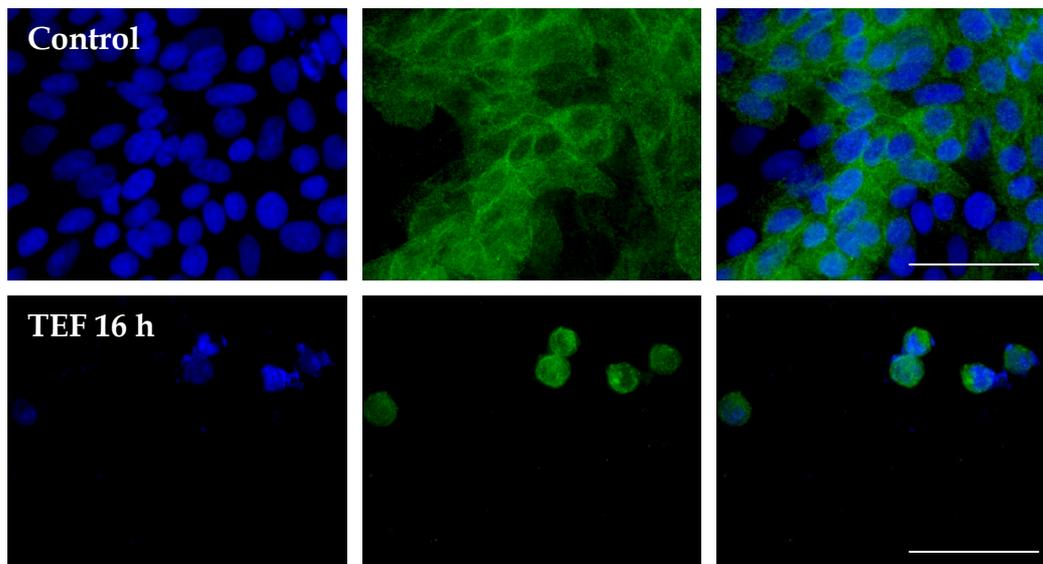


Figura 29. Daño en el ADN inducido por la terfenadina en diferentes líneas tumorales. Las células de adenocarcinoma de colon (a), carcinoma de mama (b), neuroblastoma (c) y melanoma (d) fueron tratadas con terfenadina durante diferentes tiempos a la concentración correspondiente a su IC_{50} . Las proteínas de los lisados celulares (50 μ g) fueron separadas por electroforesis y la expresión de H2AX fue analizada mediante western blot. La detección de actina se empleó como control de carga. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente.

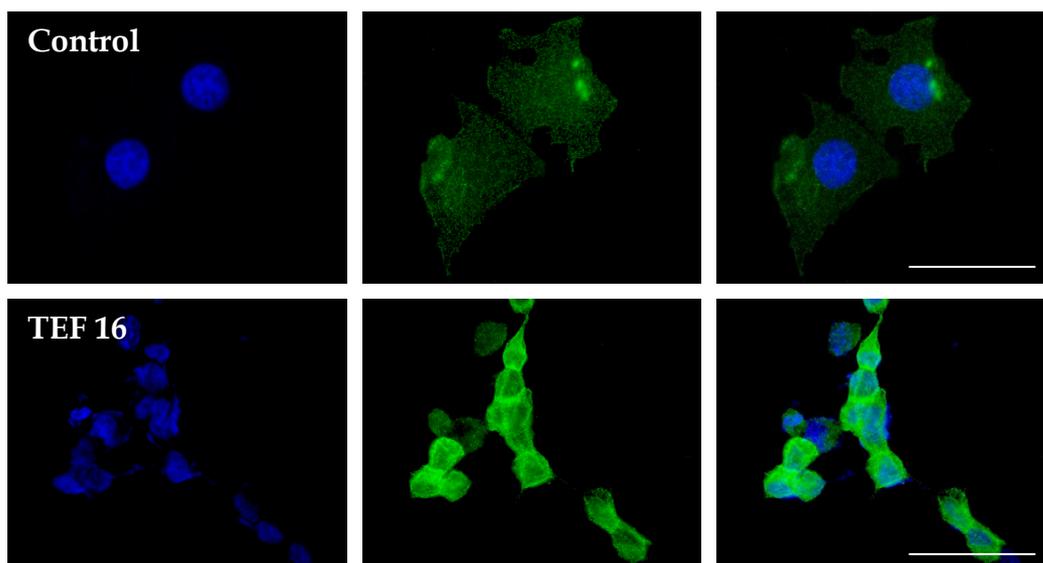
A continuación analizamos la quinasa ATM, una proteína que se activa por fosforilación en la Ser¹⁹⁸¹ en respuesta a la inducción de DSBs en el ADN y que constituye el componente clave de las vías de transducción de señales iniciadas a partir de DSBs (Kastan y cols., 2000). Mediante inmunofluorescencia, estudiamos la activación y localización de la forma activa de ATM. Como puede observarse en

la figura 30, la ATM fosforilada se localiza predominantemente en el citoplasma de las células sin tratar. Sin embargo, el tratamiento con terfenadina induce un cambio de patrón caracterizado por la localización de la fluorescencia en el interior del núcleo con una distribución difusa o punteada. Esta distribución nuclear de la ATM activa representa su translocación al interior del núcleo y la formación de focos en los sitios dañados del DNA (Yang y cols. 2003)

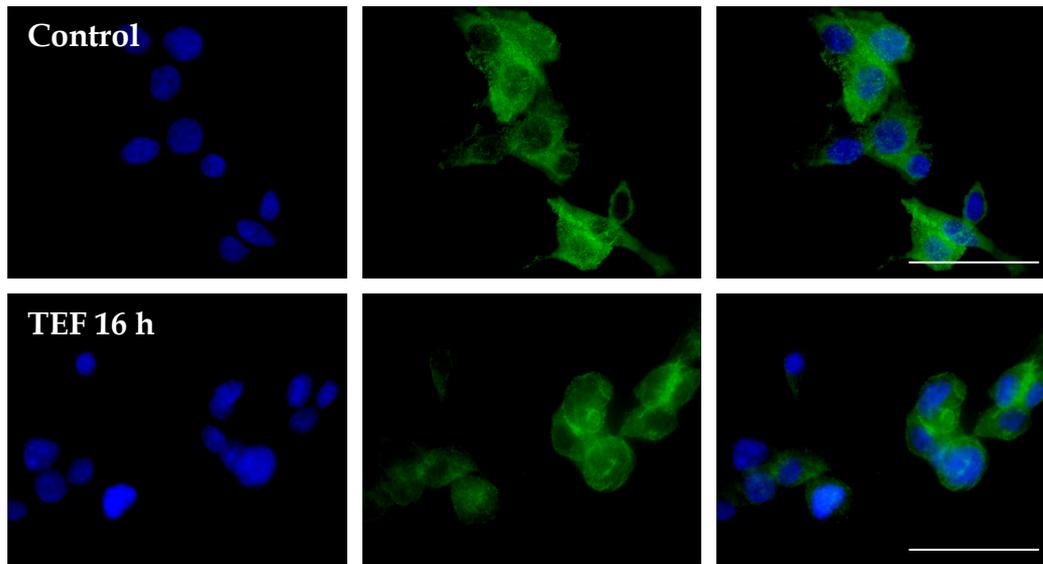
A



B



C



D

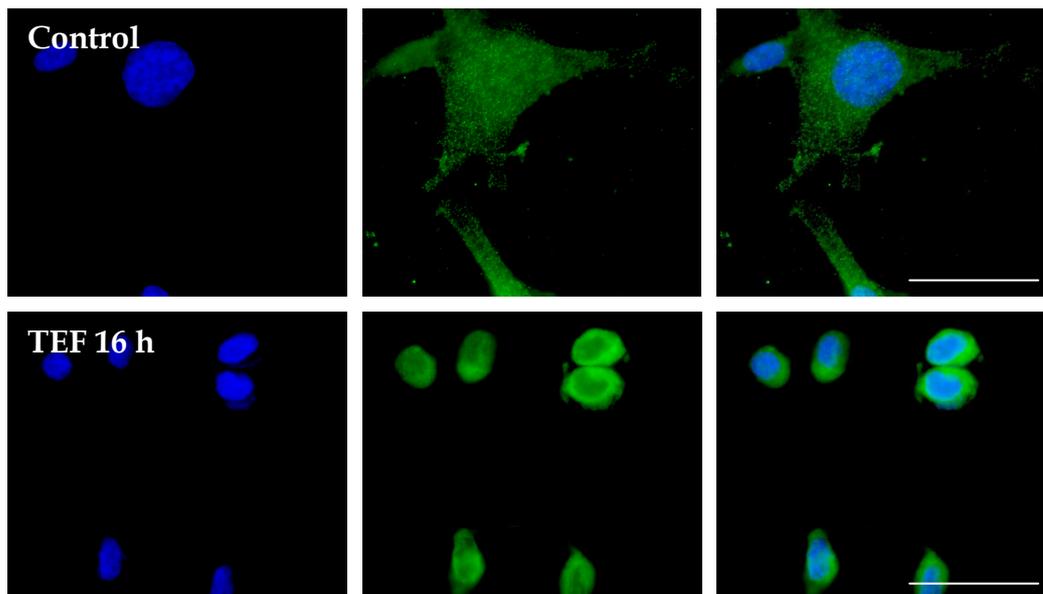


Figura 30. Activación de ATM inducida por terfenadina. Las células de adenocarcinoma de colon (A), carcinoma de mama (B), neuroblastoma (C) y melanoma (D) fueron tratadas con terfenadina a su concentración de IC_{50} correspondiente durante 16 horas, fueron incubadas con un anticuerpo primario anti-ATM y luego con un anticuerpo secundario (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las células fueron visualizadas y analizadas mediante microscopía de fluorescencia. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente. Barras=50 μ m.

1.5.-Activación de la vía de señalización p53/p73

La vía de señalización p53/p73 es una de las rutas intracelulares implicadas en la inducción del proceso apoptótico iniciado por lesiones en el ADN. Debido a que la terfenadina induce daño en el ADN, estudiamos esta ruta analizando la expresión de tres de sus componentes más representativos: p53, NOXA y p73. Los ensayos de western blot demostraron, en las cuatro líneas tumorales, que la terfenadina incrementa de forma significativa la expresión de p53 y NOXA (figura 31).

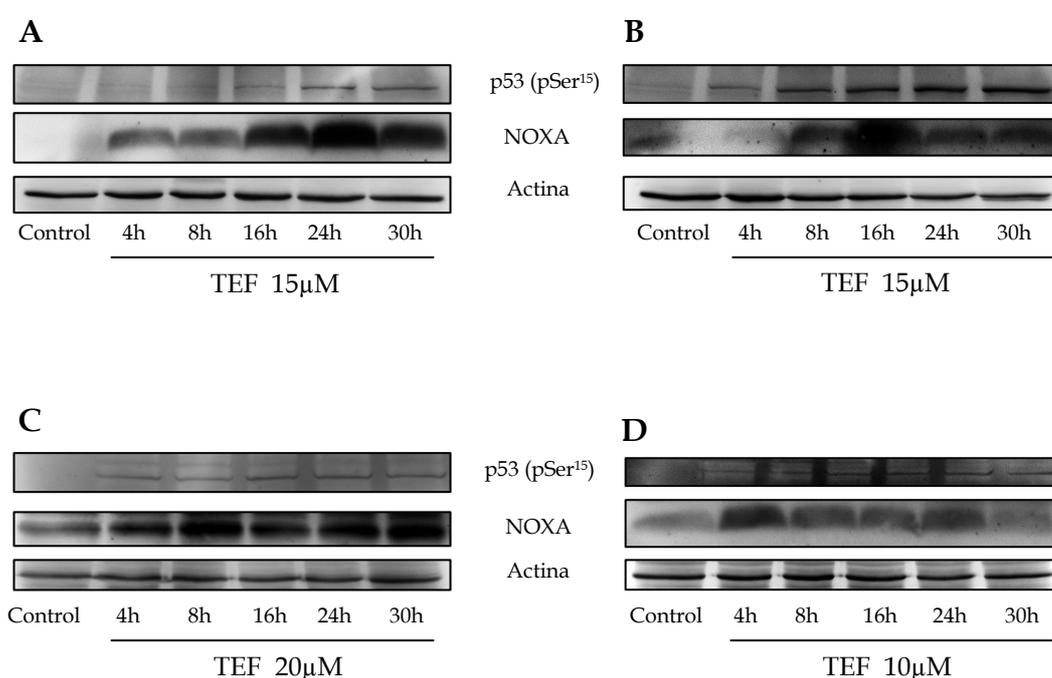
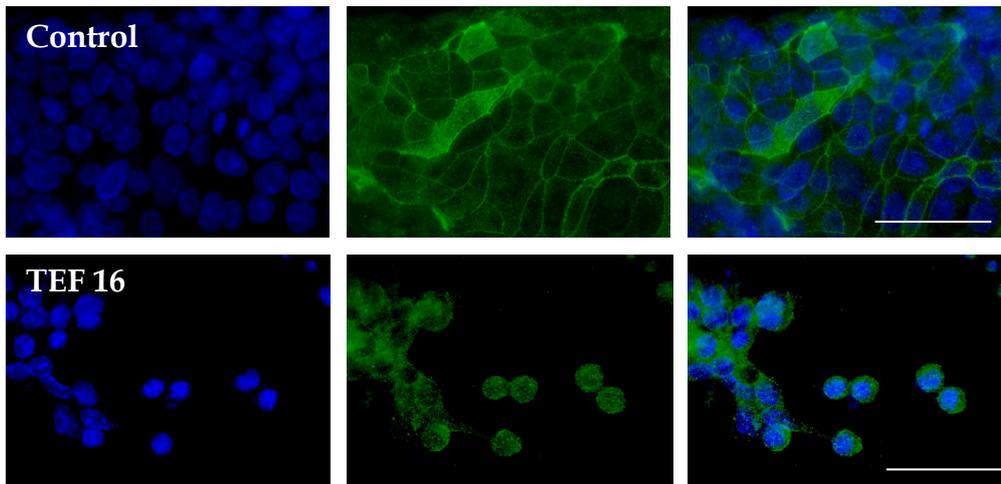


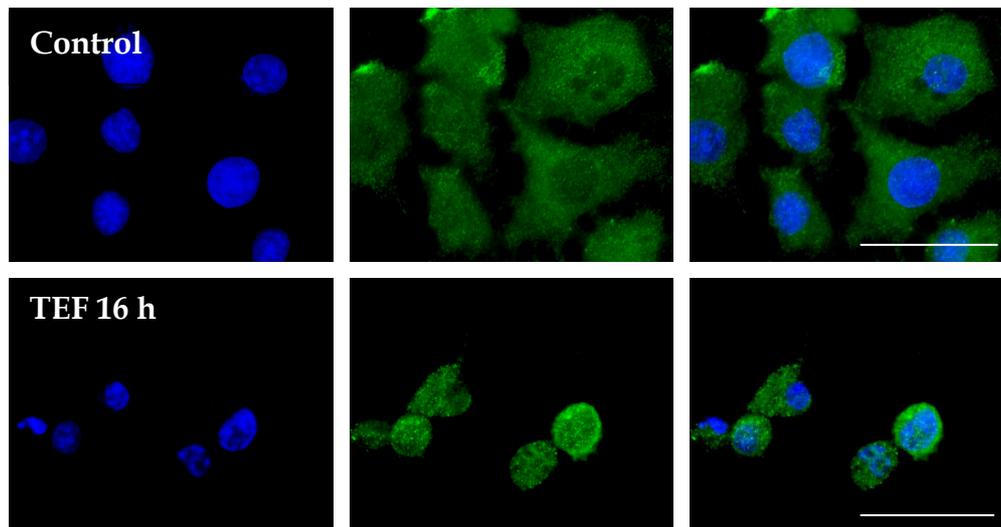
Figura 31. Activación de la expresión de p53 y NOXA inducida por terfenadina. Las células de adenocarcinoma de colon (A), carcinoma de mama (B), neuroblastoma (C) y melanoma (D) fueron tratadas con terfenadina durante diferentes tiempos a la concentración correspondiente a su IC₅₀. Las proteínas de los lisados celulares (50 μg) fueron separadas por electroforesis y la expresión de p53 y NOXA fueron analizadas mediante western blot. La detección de actina se empleó como control de carga. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente.

La activación del factor de transcripción p73 se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia. En la figura 32 se observa que p73 presenta una localización predominantemente citoplasmática en las células control. Por el contrario, en las células tumorales tratadas con terfenadina durante 16 horas, p73 se localiza también en el núcleo. El aumento de intensidad de la señal fluorescente y la translocación nuclear reflejan el aumento de expresión y la activación de p73.

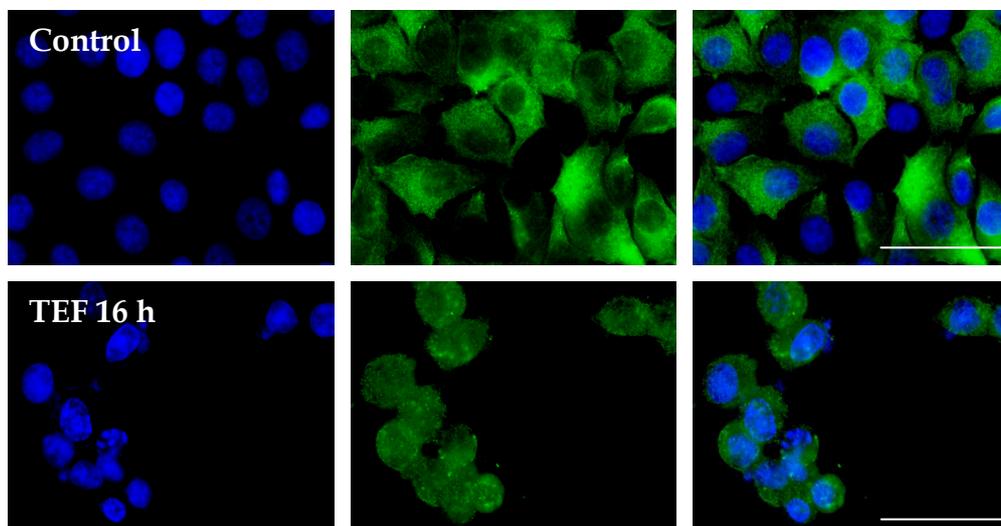
A



B



C



D

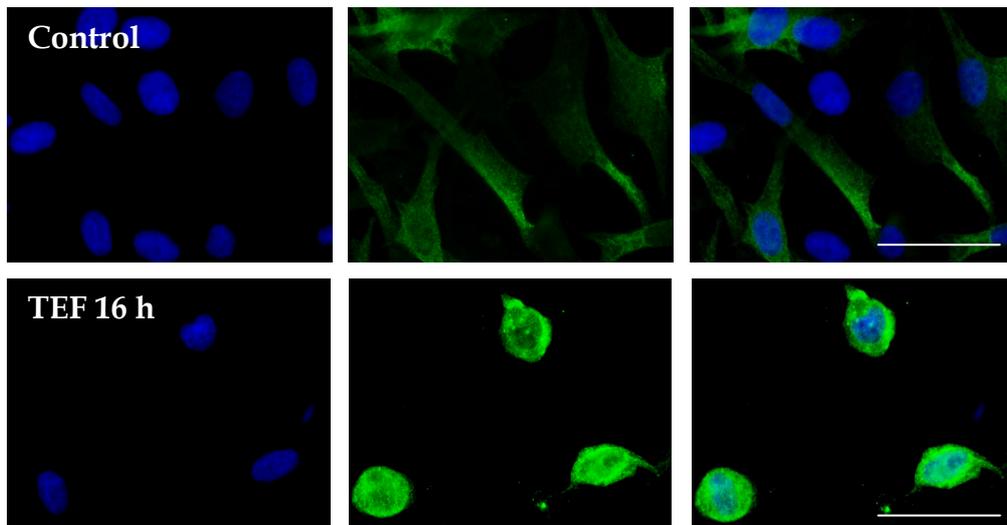


Figura 32. Localización de la proteína p73 tras el tratamiento con terfenadina. Las células de adenocarcinoma de colon (A), carcinoma de mama (B), neuroblastoma (C) y melanoma (D) fueron tratadas con terfenadina a su concentración de IC_{50} correspondiente durante 16 horas. Las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-p73 y luego con un anticuerpo secundario (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las células fueron visualizadas y analizadas mediante microscopía de fluorescencia. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente. Barras=50 μ m.

2.-ESTUDIO DE LAS DIANAS MOLECULARES DE LA TERFENADINA.

2.1.-Expresión de los receptores H1 y H4 de la histamina en las diferentes líneas tumorales

En estudios previos realizados en el grupo demostramos que la terfenadina induce muerte celular por apoptosis en líneas celulares de melanoma y de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y que este efecto es independiente de la expresión de los receptores H1 de la histamina (Jangi y cols., 2004; Jangi y cols., 2008). Para analizar si este hecho se repite en otros tipos de células tumorales, decidimos analizar la expresión del receptor H1 de la histamina en otras líneas de melanoma, en los adenocarcinomas de colon y mama y en el neuroblastoma. Además, también valoramos la posible implicación del receptor H4 en la muerte inducida por terfenadina.

En primer lugar analizamos la expresión de los receptores H1 y H4 de la histamina mediante western blot y PCR. En este estudio se incluyeron dos líneas más de melanoma humano (A375 y HT144) y la línea de leucemia linfoblástica aguda CEM, además de las líneas tumorales de colon, mama y neuroblastoma. Los resultados evidenciaron que, sorprendentemente, sólo las líneas de melanoma A375 y HT144 expresan el receptor H1 de la histamina, mientras que en el resto de líneas celulares la expresión es inexistente o muy leve (figura 33). En cuanto al receptor H4 de la histamina, también fueron las líneas A375 y HT144 las que mayoritariamente expresaron este receptor; sin embargo, fue más evidente la ausencia de expresión del receptor H4 en las líneas MEL-HO y CEM, y la muy débil expresión del mismo en las líneas MCF7, HCT8 y SMS-KCNR.

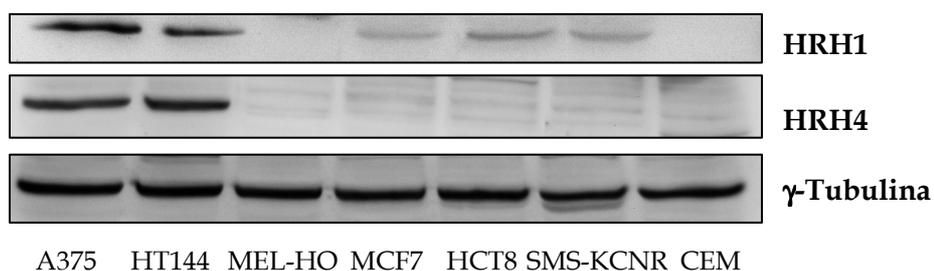


Figura 33. Expresión de los receptores H1 y H4 de la histamina en diferentes líneas tumorales. Las proteínas de los lisados celulares (50 μ g) de 7 líneas tumorales diferentes (A375, HT144, MEL-HO, MCF7, HCT8, SMS-KCNR y CEM) fueron separadas por electroforesis y la expresión de los receptores H1 y H4 fue analizada mediante western blot. La detección de γ -tubulina se empleó como control de carga. Imagen representativa de 3 experimentos realizados de manera independiente.

Mediante PCR pudimos observar que, a diferencia de la expresión a nivel de proteína, todas las líneas expresan ARNm del receptor H1 con diferente intensidad, excepto la línea de melanoma MEL-HO, donde fue prácticamente inexistente (figura 34). La expresión de ARNm del receptor H4 de la histamina fue más homogénea en todas las líneas celulares estudiadas, aunque en la línea de neuroblastoma la expresión fue mayor.

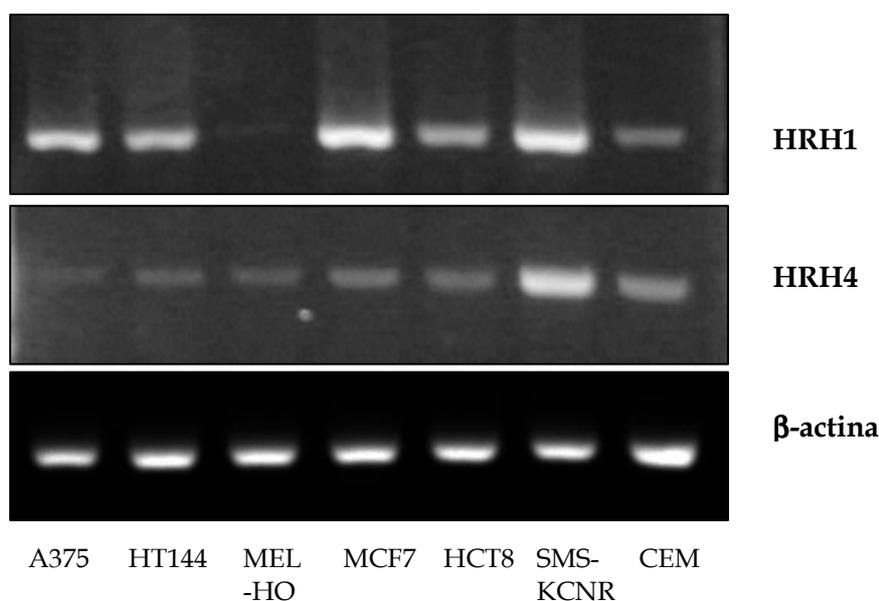


Figura 34. Expresión del ARNm de los receptores H1 y H4 de la histamina en las líneas celulares. Imagen representativa de 3 reacciones de PCR realizadas de manera independiente a partir de ARNm extraído de las líneas celulares en pases diferentes. Como control endógeno de carga se utilizó la β -actina.

A pesar de que la PCR no es una técnica cuantitativa, decidimos realizar una cuantificación relativa mediante densitometría con el software de imagen ImageJ tras una reacción de PCR que se detuvo en el ciclo 28 cuando se encontraba en fase exponencial de amplificación. Para ambos receptores elegimos como referencia la línea celular MEL-HO, ya que en ambos casos fue la línea que en menor medida expresó el receptor H1 y H4 y por ello se le asignó el valor 1. Los valores relativos de las restantes líneas fueron asignados en base a MEL-HO. Como podemos observar en la tabla 20, en la que se muestran los valores obtenidos por densitometría y los valores relativizados, en el caso del receptor H1 las líneas MCF7 y SMS-KCNR fueron las que más expresión mostraron (163,22 y 148,86; respectivamente). Sin embargo, esta expresión elevada no se reflejó a nivel de proteína (figura 33). Por otro lado, las líneas A375 y HT144, que fueron las únicas que a nivel de proteína expresaron el receptor H1, a nivel de ARN mostraron valores medios (82,54 y 61,6 veces más que MEL-HO respectivamente).

Tabla 20. Cuantificación relativa de la expresión de HRH1 y de HRH4.

	Cuantificación relativa del receptor H1 de la histamina		Cuantificación relativa del receptor H4 de la histamina	
	Valores por densitometría	Valores relativos	Valores por densitometría	Valores relativos
A375	223,85	82,54	45,67	1,56
HT144	167,78	61,64	37,80	1,29
MEL-HO	2,71	1	29,19	1
MCF7	442,65	163,22	52,10	1,78
HCT8	127,11	46,87	52,40	1,79
SMS-KCNR	403,71	148,86	329,62	11,29
CEM	50,42	18,59	94,52	3,24

En relación al receptor H4, observamos valores muy bajos de expresión a nivel de ARN, siendo la línea SMS-KCNR la más destacada expresando 11,29 veces más receptor que MEL-HO (tabla 20). En este caso los datos de expresión a nivel de ARN tampoco se correspondieron con los datos obtenidos a nivel de proteína.

En su conjunto, los resultados sugieren que ninguno de los receptores de la histamina estudiados, H1 y H4, participan en la muerte inducida por terfenadina puesto que la expresión de las mismas es inexistente en algunas líneas sensibles. Además, existen diferencias de expresión entre las distintas líneas tumorales que no se relacionan con la respuesta de las mismas a la terfenadina.

2.2.-La apoptosis inducida por terfenadina depende de la actividad tirosina quinasa, pero no de los receptores tirosina quinasa

A continuación estudiamos si la muerte inducida por terfenadina implica la activación de tirosinas quinasas. Con este objetivo utilizamos la genisteína, una isoflavona que, además de funcionar como antioxidante y antihelmíntico, actúa como inhibidor de la actividad tirosina quinasa.

En primer lugar analizamos la toxicidad de la genisteína en ausencia de suero en el medio para averiguar las dosis no tóxicas a las que se puede utilizar en ensayos de inhibición. Para ello tratamos las células MEL-HO y SMS-KCNR con diferentes dosis de genisteína (3, 6, 12, 25 y 50 μM) durante varios tiempos de tratamiento (2, 4, 6 y 8 horas). Como se aprecia en la figura 35, ninguna de las dosis utilizadas, ni siquiera la dosis mayor de 50 μM , resultó tóxica para las células.

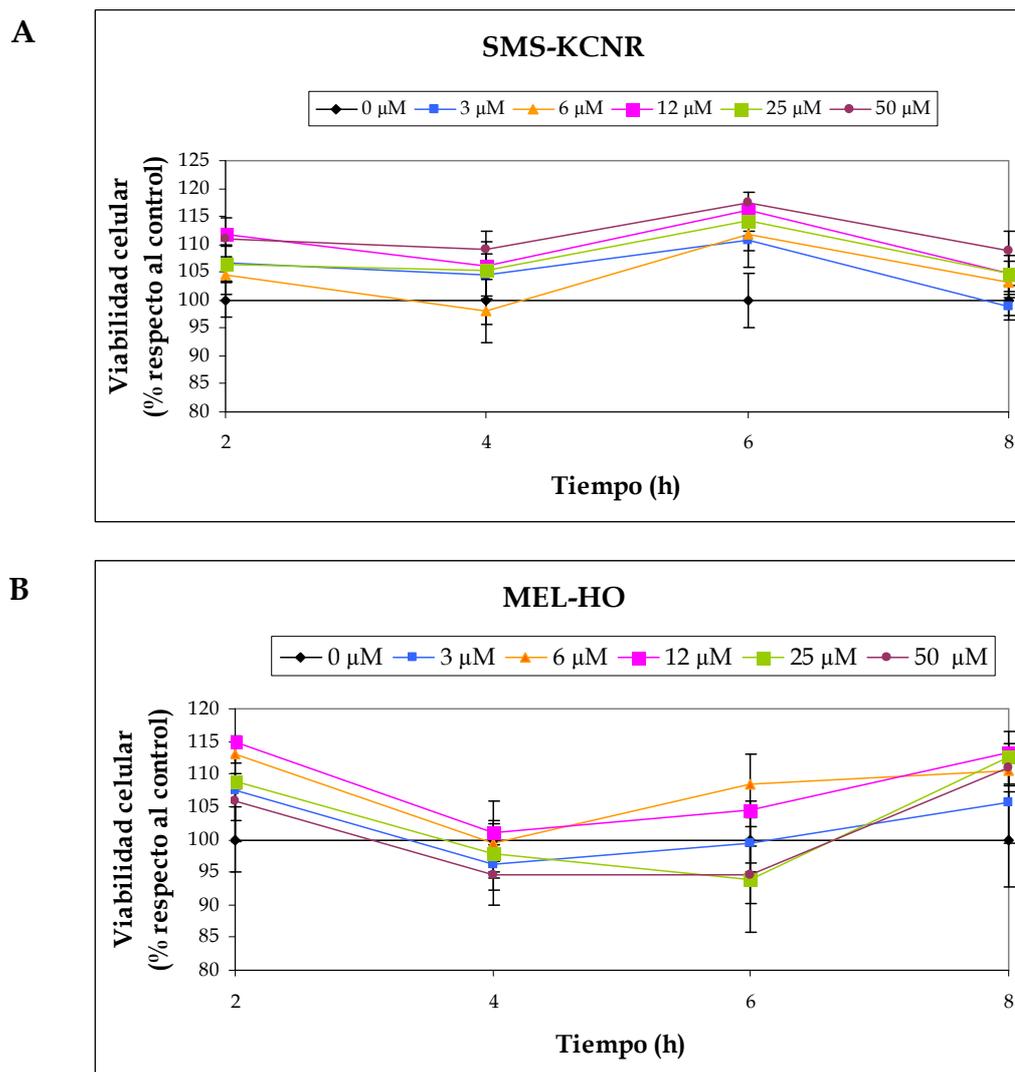


Figura 35. Ensayo de citotoxicidad de la genisteína en SMS-KCNR (A) y MEL-HO (B). Las células fueron tratadas durante 2, 4, 6 y 8 horas con diferentes dosis de genisteína en medio libre de SBF. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

A continuación evaluamos el efecto de la terfenadina en medio sin suero durante 4 horas de tratamiento y obtuvimos el valor de la IC_{50} para cada línea celular. Para ello, tratamos las células HCT8, MCF7, SMS-KCNR y MEL-HO durante 4 horas con diferentes concentraciones de terfenadina (2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20 y 25 μ M). Como observamos en la figura 36 y en la tabla 21, los resultados obtenidos fueron los esperados, ya que el efecto de la terfenadina y los valores de la IC_{50} fueron muy semejantes a los obtenidos en medio completo con suero.

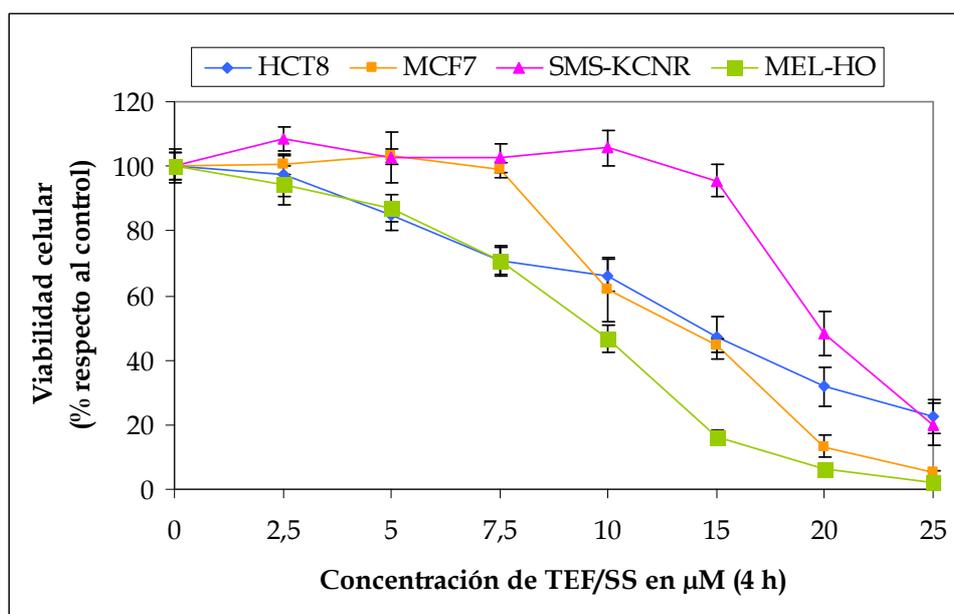


Figura 36. Efecto de la terfenadina sobre la viabilidad de células HCT8, MCF7, SMS-KCNR y MEL-HO. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de terfenadina durante 4 horas en ausencia de suero en el medio. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

Línea celular	Valor IC ₅₀ (μM)
HCT8	14,9
MCF7	16,5
SMS-KCNR	19,5
MEL-HO	9,5

Tabla 21. Efecto del tratamiento con terfenadina y fexofenadina en la viabilidad celular en 4 líneas tumorales en medio sin SBF. Cálculo del IC₅₀. Los valores de la IC₅₀ fueron calculados con el programa GraphPad Prism.

Una vez ajustada la concentración de uso tanto de la genisteína como de la terfenadina, las células fueron preincubadas con dosis crecientes de genisteína durante 2 horas y a continuación añadimos terfenadina a una concentración de 10 μM en el caso de MEL-HO y de 15 μM para HCT8. Como podemos observar en la figura 37, la genisteína bloqueó parcialmente el efecto citotóxico de la terfenadina de forma dosis-dependiente en ambas líneas celulares. Concretamente, la inhibición de la pérdida de viabilidad causada por la terfenadina fue significativa a concentraciones de genisteína de 25 y 50 μM lo que indica que la actividad

tirosina quinasa puede participar en la apoptosis inducida por terfenadina, pero no es la única causa.

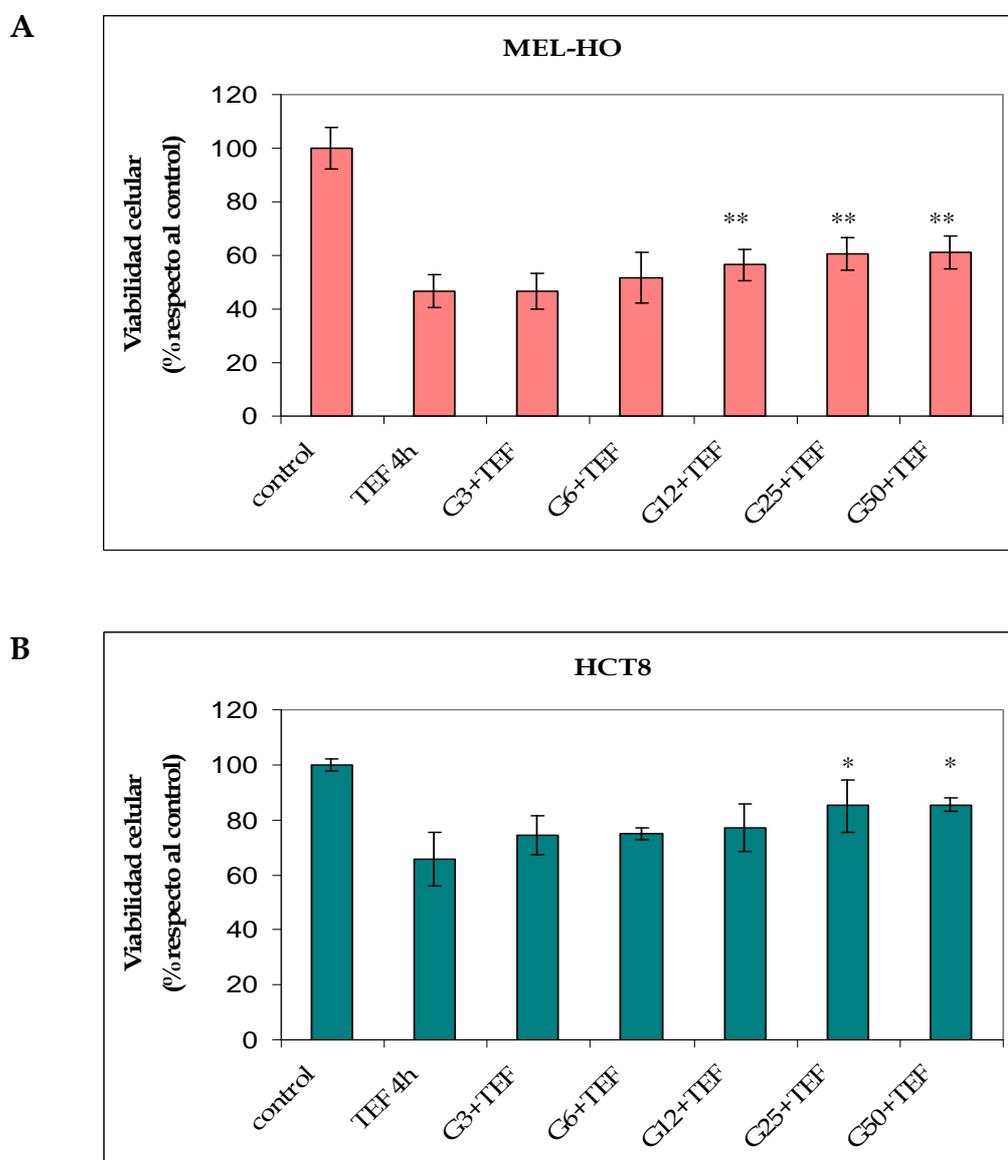


Figura 37. Efecto de la genisteína sobre la citotoxicidad inducida por terfenadina. Las células MEL-HO (A) y HCT8 (B) fueron incubadas con diferentes dosis de genisteína (3, 6, 12, 25 y 50 μ M) durante 2 horas antes de la adición de la terfenadina, a 10 μ M en el caso de MEL-HO y a 15 μ M en el caso de HCT8 μ M, durante 4 horas en el medio libre de SBF. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ respecto a TEF 4h.

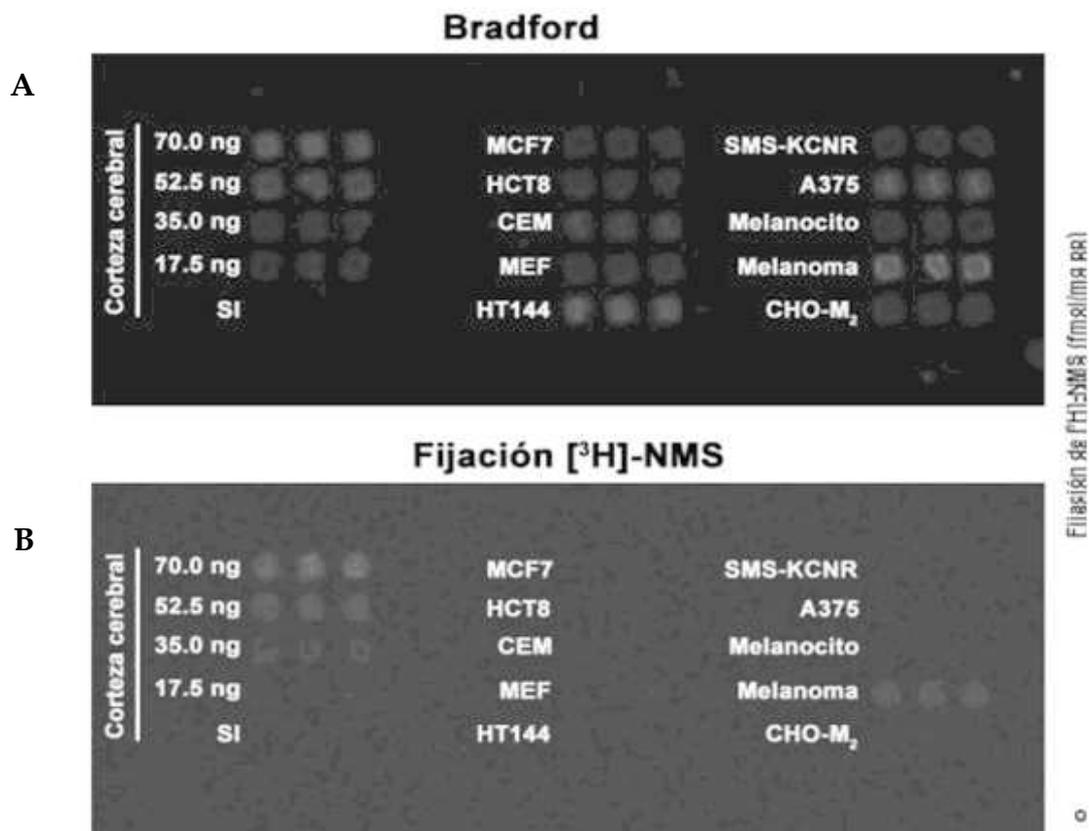
Paralelamente, analizamos la implicación de los receptores con actividad tirosina quinasa (RTKs) en la muerte inducida por terfenadina. Nos centramos en 3 de los receptores tirosina quinasa más abundantes en las células tumorales: el receptor 1

del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1), el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Utilizamos inhibidores específicos (SU5402 para FGFR1, AG 538 para IGF-1 y Compound 56 para EGFR) para bloquear la actividad de los mismos y comprobar su participación en el efecto apoptótico de la terfenadina. Los resultados indicaron que ninguno de los inhibidores era capaz de modular el efecto de la terfenadina (datos no mostrados), lo que sugiere que ninguno de los tres receptores estudiados actúan como diana molecular de la terfenadina en las líneas tumorales analizadas, si bien es evidente por los resultados obtenidos con la genisteína que la actividad tirosina quinasa contribuye en alguna medida a su actividad antitumoral.

2.3.-Análisis de la implicación de los receptores muscarínicos en la muerte inducida por terfenadina

El receptor H1 de la histamina es un receptor acoplado a proteína G; por este motivo decidimos valorar otros receptores acoplados a proteínas G, como son los receptores muscarínicos, potenciales receptores diana de la terfenadina. Estudiamos la expresión de los receptores muscarínicos mediante un microarray de membranas celulares obtenidas de las diferentes líneas tumorales; sobre las mismas realizamos ensayos de desplazamiento con el antagonista de los receptores muscarínicos NMS (N-metilescopolamina) tritiada ($[^3\text{H}]$ -NMS), en presencia de terfenadina. Las líneas tumorales incluidas en este estudio fueron MCF7 (adenocarcinoma de mama), HCT8 (adenocarcinoma de colon), CEM (leucemia linfoblástica aguda), SMS-KCNR (neuroblastoma), A375 (melanoma), HT144 (melanoma), melanoma o Mela-FD (melanoma A375 inoculado en ratón desnudo) y líneas celulares control como MEF (fibroblastos embrionarios de ratón), así como melanocitos normales de piel humana (HEM (P-10853)). Se incluyó la línea celular CHO-M2 (carcinoma de ovario) como control positivo de expresión del receptor muscarínico M_2 .

Las membranas procedentes de las líneas celulares ensayadas mostraron una fijación buena a los microarrays, aunque algunas de ellas presentaron una mayor concentración de proteínas a pesar de que en su elaboración se utilizó la misma concentración inicial. Esta diferencia en la eficiencia de fijación puede ser debida al ratio proteína/lípido de cada tipo de muestra/línea celular (figura 38). En cualquier caso, en el microarray se incluyeron microdepósitos de membranas procedentes de corteza cerebral de rata a diferentes concentraciones conocidas, lo que permitió calcular la concentración real de proteínas presente en cada microdepósito del microarray.



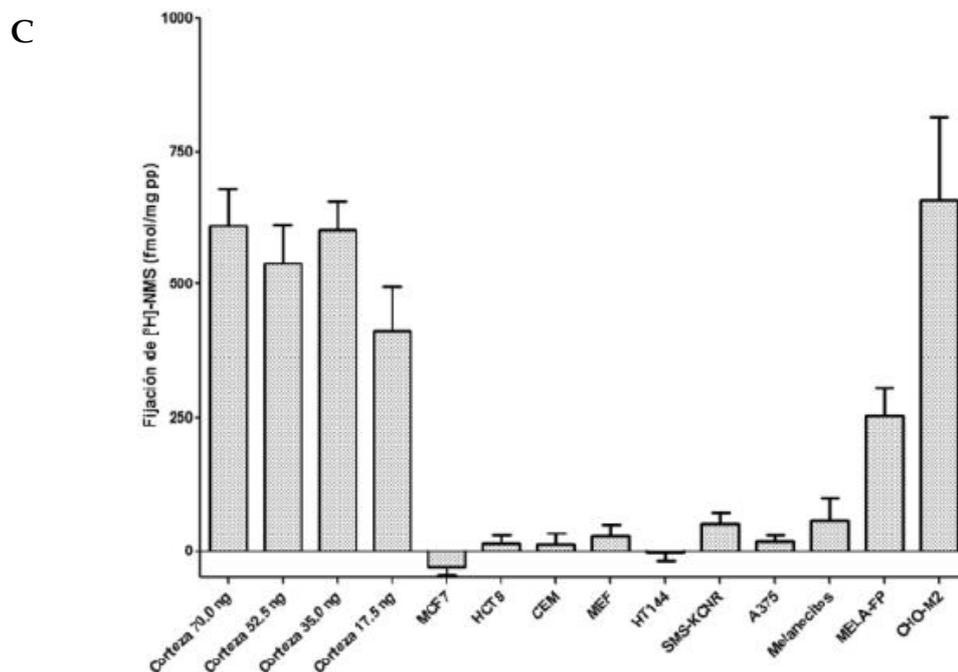


Figura 38. Imagen representativa de un microarray de membranas teñido con Bradford (A), del autorradiograma obtenido tras la incubación con el radioligando $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ (B) e histograma con la densidad de lugares de unión para la $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ (C). Cada una de las líneas celulares y tejidos incluidos en el microarray fueron normalizados en base a la concentración de proteínas determinada mediante el método Bradford. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

El ensayo de fijación del antagonista de los receptores muscarínicos $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ al microarray indicó que únicamente las membranas procedentes de la corteza cerebral, de células de melanoma y de células CHO-M2 (que sobreexpresan el receptor muscarínico M_2) presentan lugares de unión para la $[^3\text{H}]\text{-NMS}$. Es más, esta fijación de la escopolamina a los receptores muscarínicos fue bloqueada por la terfenadina en los tres casos, de manera concentración-dependiente (figura 39). Los IC_{50} , sin embargo fueron diferentes, siendo las células de la corteza cerebral y las CHO-M2 las que presentaban un IC_{50} más pequeño (entre $30\text{-}50\mu\text{M}$) a diferencia de las células de melanoma cuyo IC_{50} es de $136\mu\text{M}$. En cualquier caso, la ausencia de fijación del antagonista a membranas derivadas de células sensibles a la terfenadina indica que la terfenadina no induce muerte celular a través de su unión a los receptores muscarínicos.

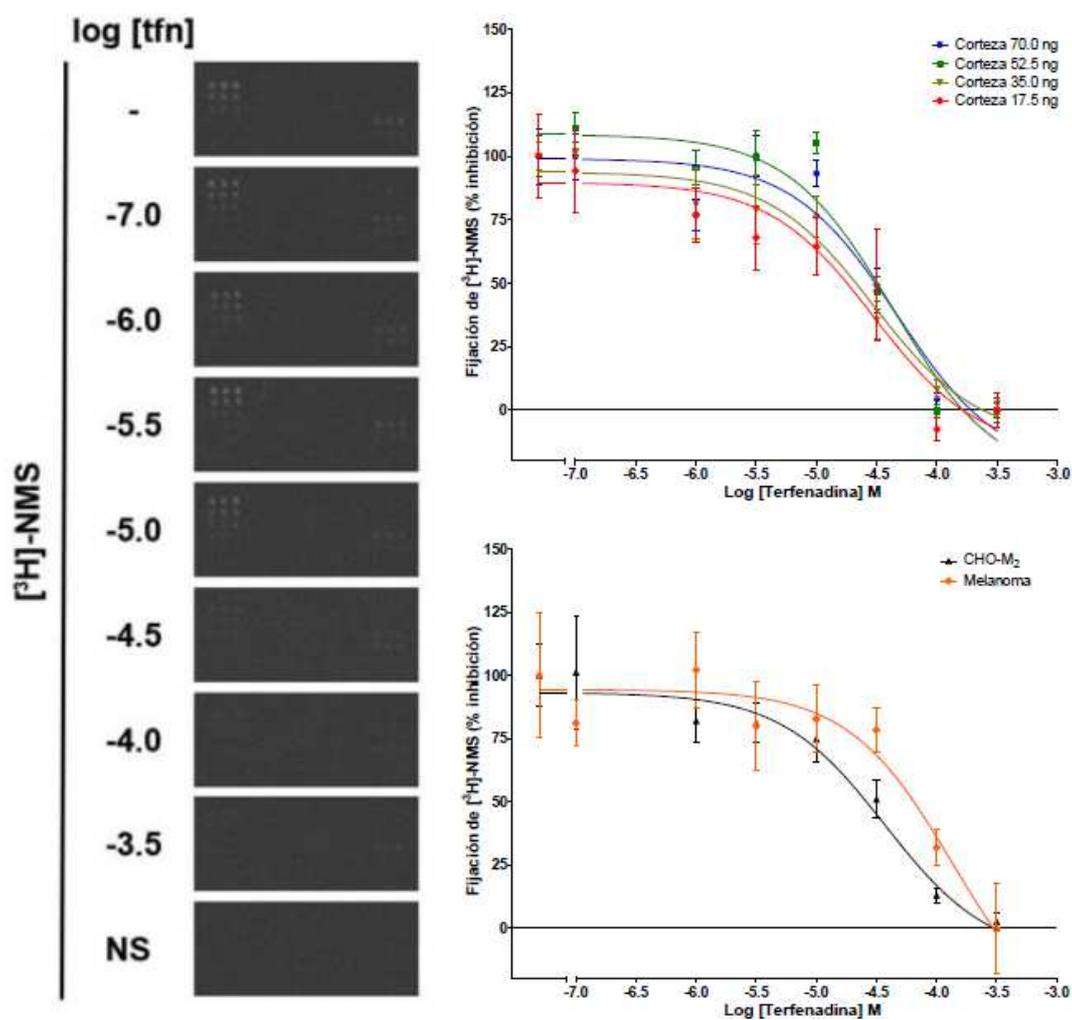


Figura 39. Autorradiograma y curvas representativas del desplazamiento de la fijación del antagonista de los receptores muscarínicos [³H]-NMS en presencia de concentraciones crecientes de terfenadina. En la gráfica superior se representan los datos obtenidos en los microdepósitos realizados a diferentes concentraciones de corteza cerebral de rata, una vez normalizados. Como era de esperar, las IC₅₀ obtenidas en corteza son similares entre sí (IC₅₀= 30-50 μM). En la gráfica inferior se muestra el desplazamiento de la fijación de [³H]-NMS inducido por la terfenadina en membranas de células que sobreexpresan el receptor muscarínico M₂ (CHO-M₂) y de melanoma, con unos IC₅₀ de 37 ± 5 μM y 136 ± 53 μM respectivamente. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente. Los datos corresponden a la media ± SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado (n≥12).

2.4.-Canales hERG y su posible papel en la muerte celular inducida por terfenadina

En los años 90 la terfenadina se administraba como antihistamínico H1 para el tratamiento de procesos alérgicos y posteriormente fue retirado del mercado debido a que producía alteraciones en el funcionamiento de los canales de potasio en el corazón. Los canales hERG son canales de potasio encargados de repolarizar la membrana de la célula después de un potencial de acción, y en general participan en la regulación del ciclo celular, proliferación y apoptosis, tanto en el desarrollo embrionario como en el cáncer. En tejidos normales, la expresión de los canales hERG es baja o inexistente pero las células tumorales a menudo muestran una sobreexpresión de las mismas (Dolderer y cols., 2010). En consecuencia, pensamos que los canales de potasio presentes en la membrana de las células tumorales podrían ser una posible diana para la terfenadina y que de su activación podría derivarse su efecto antitumoral. Por ello, nos propusimos estudiar la posible implicación de los canales hERG en la muerte celular inducida por terfenadina.

En primer lugar utilizamos células embrionarias de riñón humano HEK-293 que carecen de canales hERG y analizamos el efecto de la terfenadina sobre éstas. Tratamos las células HEK-293 con diferentes dosis de terfenadina durante 24 horas y, en contra de lo esperado, observamos que la terfenadina sí ejerce un efecto citotóxico sobre las mismas. De hecho, son células muy sensibles puesto que a 10 μ M la terfenadina induce la muerte celular en el 100% de la población.

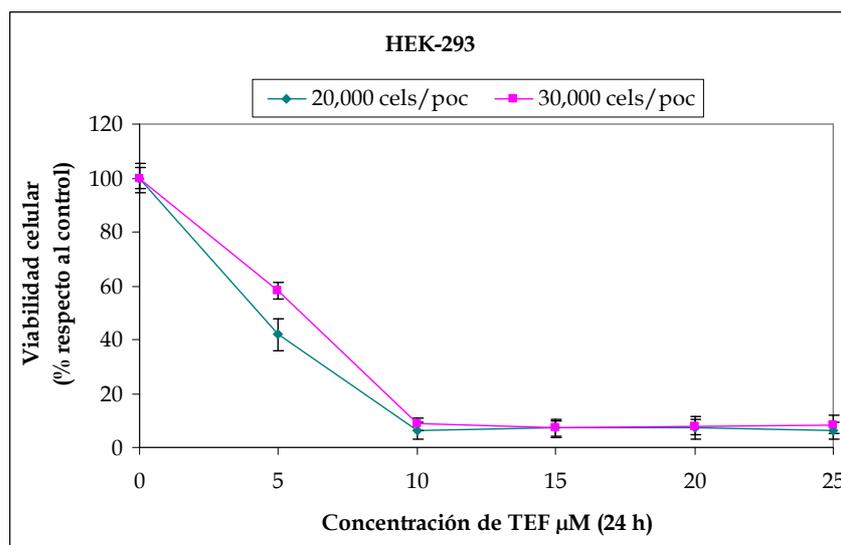


Figura 40. Efecto de la terfenadina sobre la viabilidad de células HEK-293. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de terfenadina durante 24 horas en medio completo con suero. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

Comprobamos que la citotoxicidad de la terfenadina implica muerte celular por apoptosis al analizar las células en el microscopio invertido con contraste de fases. La figura 41 muestra la población de células tratadas durante 24 horas con 10 μ M de terfenadina donde se aprecian los cambios morfológicos típicos del proceso apoptótico.

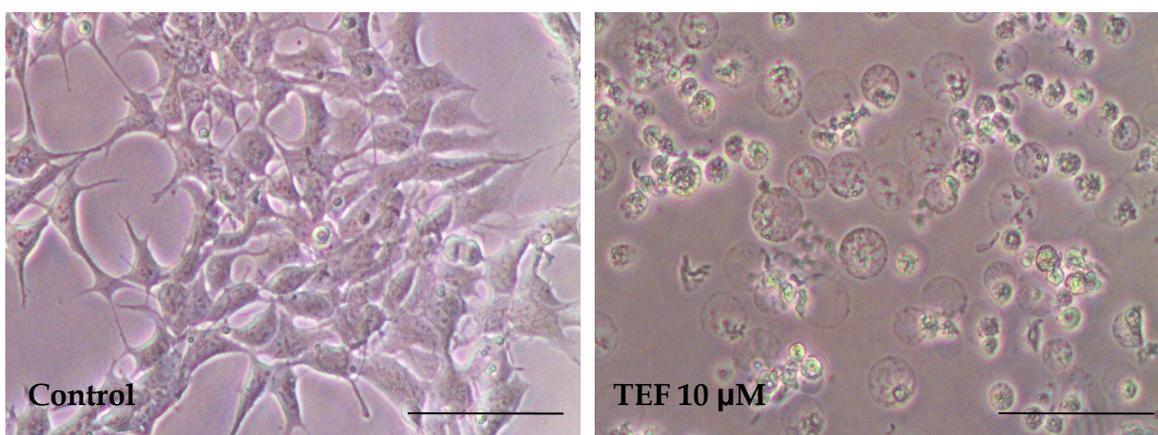


Figura 41. Imágenes de los cultivos celulares de HEK-293 tratadas con terfenadina y sin tratar. Las células se trataron durante 24 horas con terfenadina y las imágenes fueron obtenidas mediante microscopio invertido con contraste de fases. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente. Barra= 100 μ m.

Con objeto de descartar definitivamente o no los canales hERG como diana de la terfenadina, procedimos al tratamiento de células MEL-HO y SMS-KCNR con diferentes concentraciones de KCl. El tratamiento con KCl simula las consecuencias de la apertura de canales KCl, la despolarización de la membrana celular. Si los canales hERG fueran la diana efectiva de la terfenadina, el tratamiento con KCl tendría consecuencias similares a la terfenadina en las mismas células. Como referencia, una concentración de 25 mM de KCl despolariza la membrana de los cardiomiocitos auriculares (Perez-Vizcaino y cols., 1993), por lo que las concentraciones de uso fueron superiores.

Como podemos ver en la figura 42, fue necesaria una concentración elevada (75-80 mM) de KCl para poder apreciar cambios sobre la viabilidad celular. A la máxima concentración utilizada (100 mM), observamos que la viabilidad de MEL-HO disminuyó hasta el 20% mientras que la de SMS-KCNR solo disminuyó hasta el 66%.

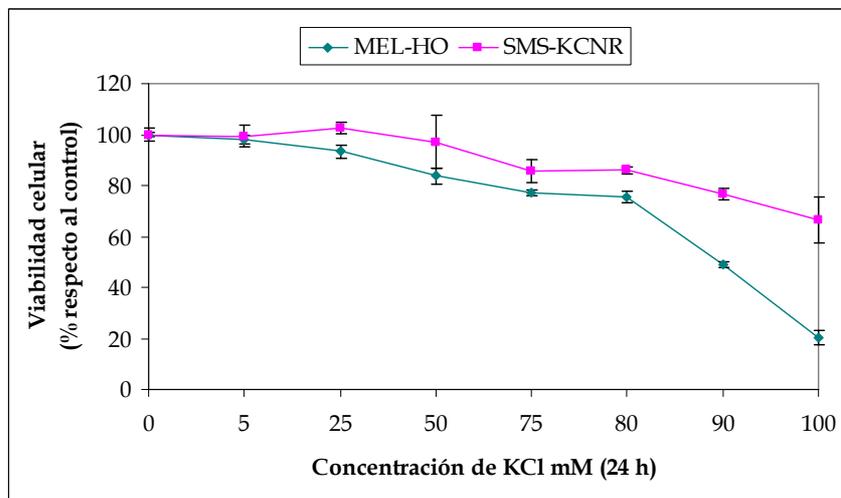


Figura 42. Efecto del tratamiento con KCl sobre las células MEL-HO y SMS-KCNR. Las células fueron tratadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de KCl. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo XTT. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

Es más, como pudimos observar al microscopio invertido, esta pérdida de viabilidad inducida por KCl no se relaciona con la activación del proceso apoptótico (figura 43). De hecho, en los cultivos tratados no se apreciaron

imágenes apoptóticas, sino más bien imágenes compatibles con necrosis: células fragmentadas, pérdida de integridad de membranas, fragmentos celulares, etc.

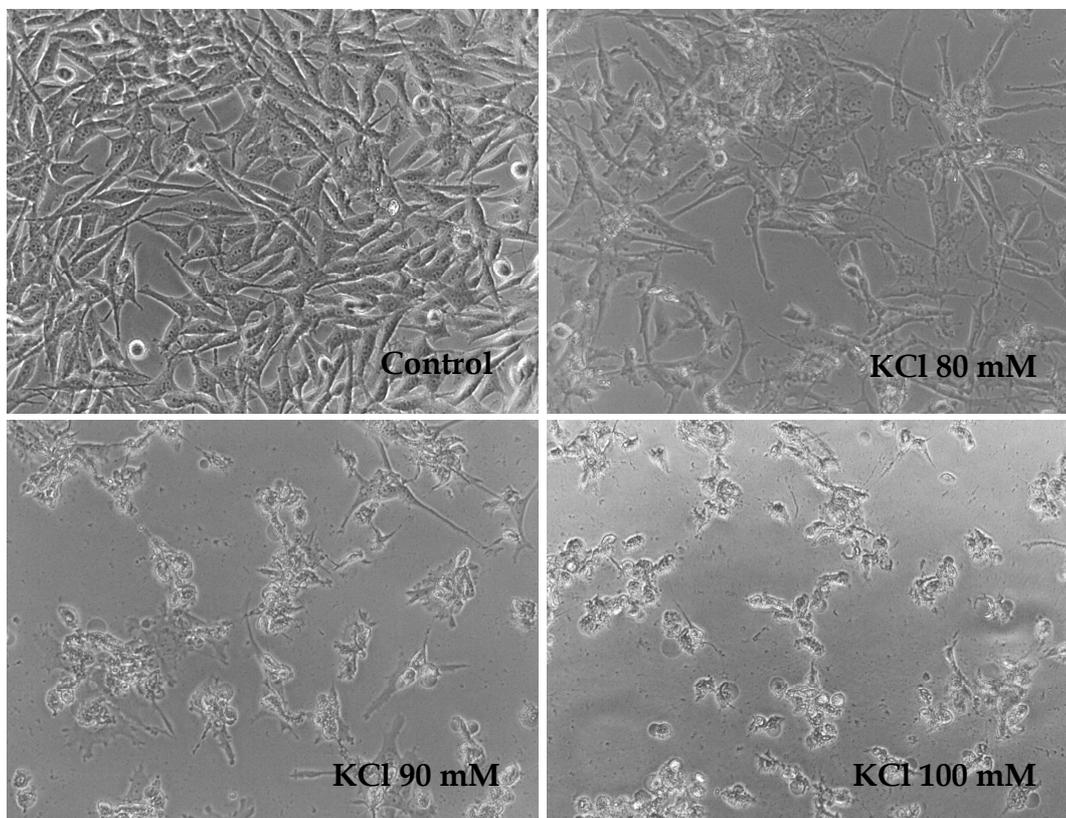


Figura 43. Imágenes de cultivos celulares de MEL-HO control y tratadas con diferentes concentraciones de KCl. Las células se trataron durante 24 horas KCL 80, 90 y 100 mM y las imágenes fueron obtenidas mediante microscopio invertido con contraste de fases al finalizar los tratamientos (10X). Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente.

Para corroborar que la necrosis es la responsable de la citotoxicidad ejercida por el tratamiento con dosis altas de KCl, realizamos un ensayo clásico de apoptosis analizando la expresión de Anexina V-FITC y yoduro de propidio mediante citometría de flujo. Para ello tratamos las células con diferentes concentraciones de KCl durante 24 horas (75, 80, 90 y 100 mM). Como observamos en la figura 44, a medida que la concentración de KCl aumenta, la cantidad de células necróticas (cuadrante R1) aumenta significativamente, encontrándose pocas células en los cuadrantes R2 y R4. Es decir, el tratamiento de las células tumorales con KCl

induce fundamentalmente muerte necrótica y no apoptótica, como lo hace el tratamiento con terfenadina.

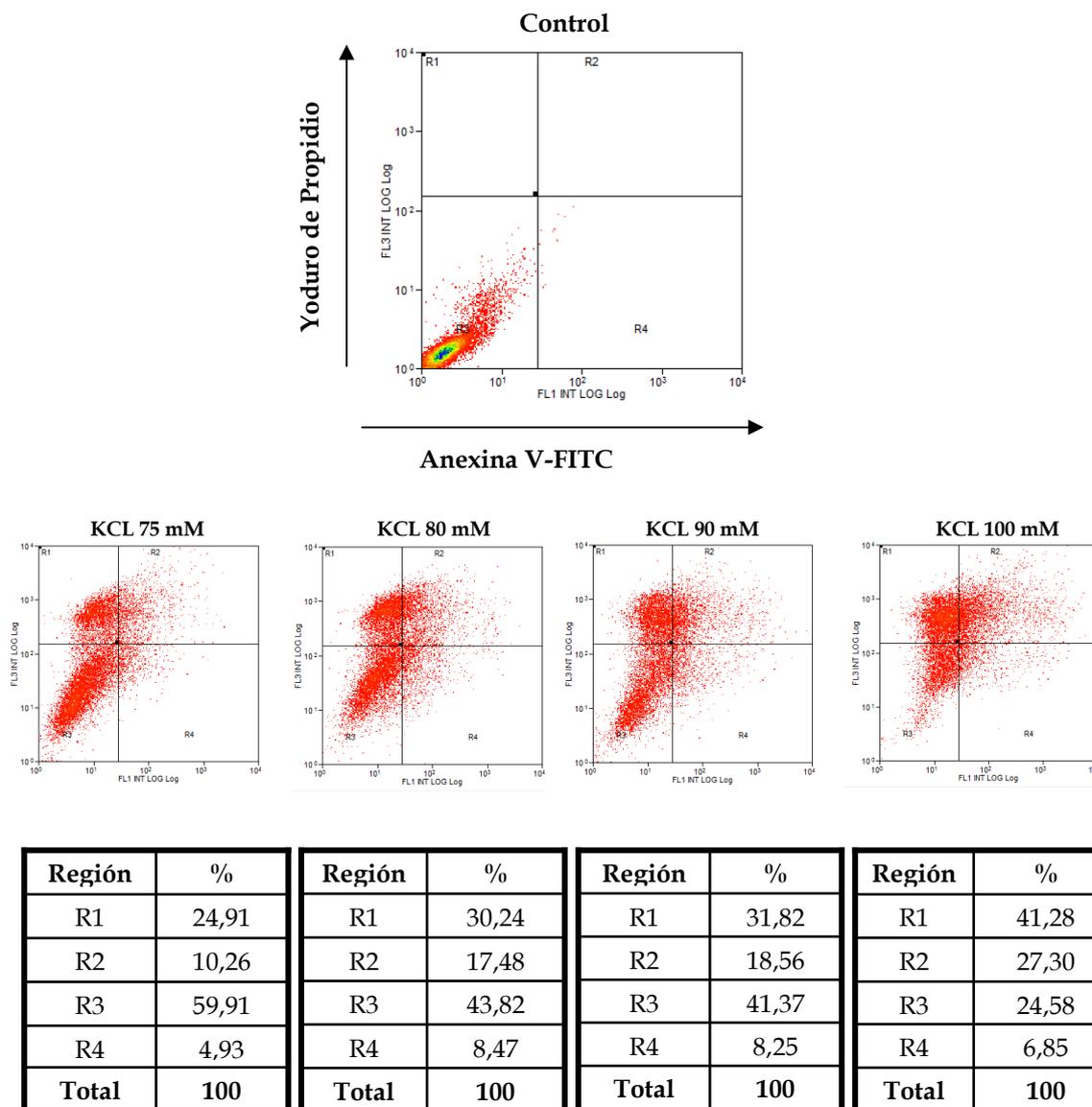


Figura 44. Caracterización y cuantificación de la muerte inducida por KCl. Las células (control y tratadas con KCl a 80, 90 y 100 mM durante 24 horas) fueron marcadas con anexinaV-FITC y YP y analizadas mediante citometría de flujo. En el cuadrante inferior derecho de los histogramas biparamétricos (R4) se representan las células anexinaV+/YP-, que corresponden a las células apoptóticas tempranas, y en el cuadrante superior derecho (R2) las dobles positivas, que corresponden a las apoptóticas tardías y/o necróticas y en el cuadrante superior izquierdo (R1) quedan representadas las células necróticas. Se representan los promedios de tres ensayos independientes.

En conjunto, estos resultados indican que los canales hERG no parecen ser los responsables de la muerte celular inducida por terfenadina.

2.5.-Implicación del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en la apoptosis inducida por terfenadina

Al igual que para los receptores muscarínicos, este estudio se realizó sobre microarrays de membranas aisladas de líneas celulares. En este caso se utilizó un conocido inhibidor del complejo I mitocondrial, la rotenona, marcada radiactivamente ($[^3\text{H}]$ -DHR) y se estudió el desplazamiento de la fijación de éste por la terfenadina. Se incluyeron en este estudio las líneas de adenocarcinoma de mama MCF7 y de colon HCT8, leucemia linfoblástica aguda CEM, fibroblastos embrionarios de ratón MEF, cuatro líneas de melanoma humano A375, HT144, Hs294T, COLO-800 y MEL-HO y cuatro líneas de melanocitos normales de piel P-10853, HNEM-DP, HNEM-LP y HEM-2710. Además se incluyeron también las membranas obtenidas tras inocular células A375 en ratón desnudo (Mela-FD).

En primer lugar analizamos la fijación de la $[^3\text{H}]$ -DHR en las membranas celulares aisladas de las líneas mencionadas. Las membranas celulares aisladas de melanomas A375 y MEL-HO, melanocitos (HNEM-DP, HNEM-LP, HEM-2710) y melanoma de ratón presentaron fijación específica del radioligando $[^3\text{H}]$ -DHR, demostrando la utilidad del protocolo empleado para estudiar el complejo I mitocondrial (figura 45).

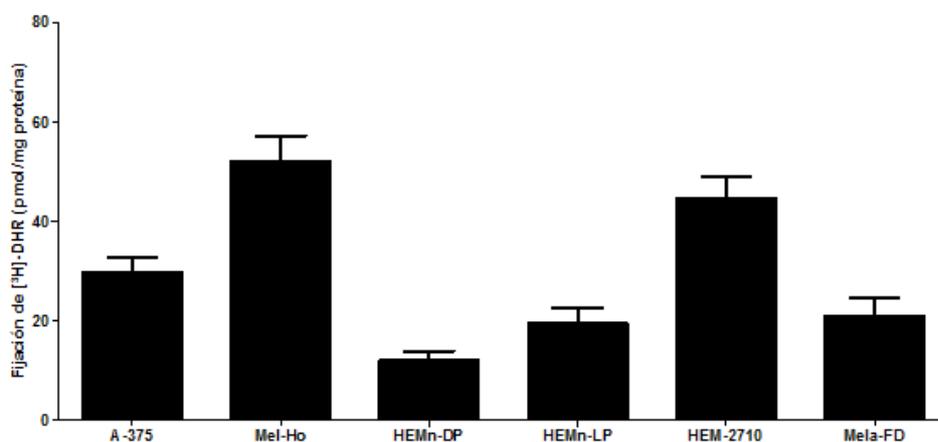


Figura 45. Fijación de $[^3\text{H}]$ -DHR a membranas celulares. Los datos fueron normalizados a pmol/mg utilizando estándares de carbono y la recta de BSA impresa en los microarrays. Se representan los promedios de tres ensayos independientes.

El resto de líneas celulares no mostró una fijación suficiente como para diferenciarla del fondo a pesar de que la cantidad impresa fue similar. Esta ausencia de señal puede ser debida a que la densidad de la proteína del complejo I mitocondrial es muy baja en dichas membranas y por tanto, para visualizarla sería necesario incrementar los tiempos de exposición al film (figura 46).

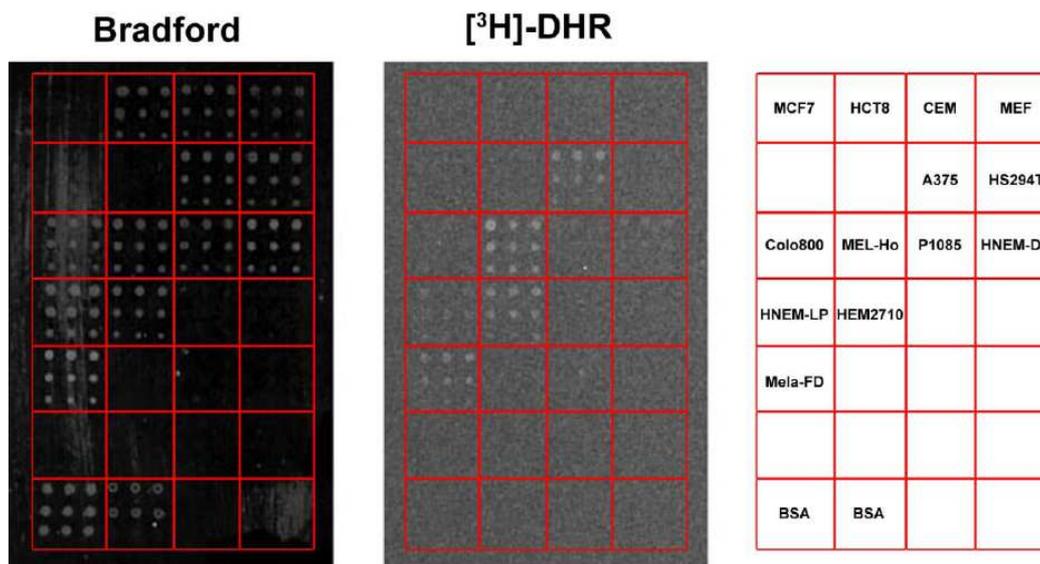


Figura 46. Imagen representativa de un autorradiograma obtenido tras la incubación con el radioligando $[^3\text{H}]\text{-DHR}$ y tras la tinción de dicho microarray con Bradford. A la derecha se muestra el esquema con la distribución de las diferentes líneas celulares impresas a diferentes cantidades (6, 4 y 2 gotas). El BSA se imprimió a diferentes concentraciones para poder normalizar los datos (25, 19, 15, 11, 5 y 1 ng). Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente.

En cualquier caso, en todas aquellas líneas en las que se obtuvo una fijación de $[^3\text{H}]\text{-DHR}$ aceptable, se pudo comprobar que la terfenadina desplaza el radioligando de manera dosis dependiente (figura 47). En este sentido, los IC_{50} determinadas en las diferentes líneas celulares fueron muy similares (entre 1 y $5 \mu\text{M}$), como era de esperar al tratarse de un complejo de la cadena respiratoria mitocondrial, es decir, de proteínas que están muy conservadas. Estos datos demuestran, por primera vez, que la terfenadina reconoce los mismos lugares de unión que la $[^3\text{H}]\text{-DHR}$ y por tanto, parte de los efectos de esta molécula podrían deberse a su interacción con el complejo I mitocondrial.

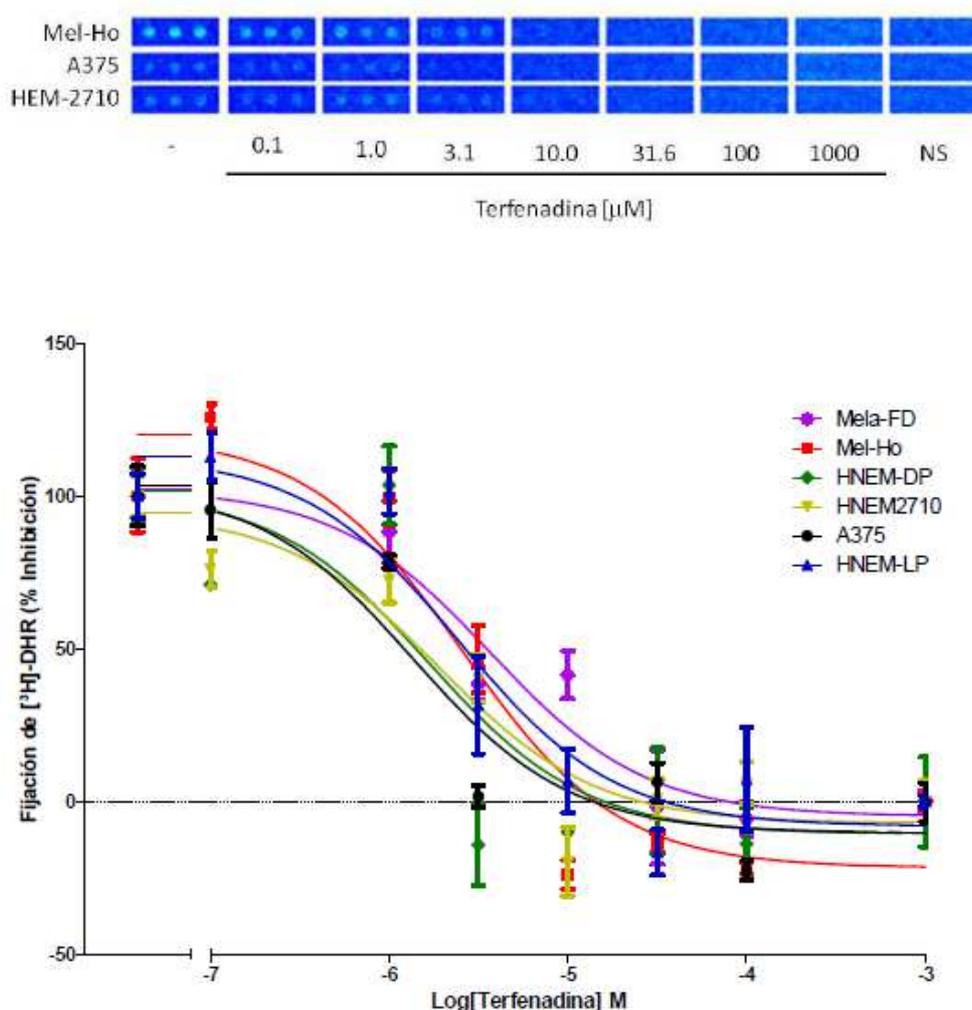


Figura 47. Autorradiograma representativo del desplazamiento de la $[^3\text{H}]\text{-DHR}$ por la terfenadina en MEL-HO, A375 y HEM-2710, y curva de competición de la fijación de $[^3\text{H}]\text{-DHR}$ en presencia de concentraciones crecientes de terfenadina. Los IC_{50} obtenidas fueron $3.7 \mu\text{M}$ en Mela-FD; $2.6 \mu\text{M}$ en Mel- HO; $1.7 \mu\text{M}$ en HNEM-DP; $1.9 \mu\text{M}$ en HNEM-2710; $1.4 \mu\text{M}$ en A375; $2.5 \mu\text{M}$ en HNEM-LP. Imágenes representativas de 3 experimentos realizados de manera independiente. Los datos corresponden a la media \pm SD de al menos 3 experimentos independientes donde cada condición se ensayó por cuadruplicado ($n \geq 12$).

2.6.- Detección de la actividad NADH deshidrogenasa

Para estudiar de una forma más directa el efecto de la rotenona y la terfenadina sobre la actividad del complejo I y el posible lugar de unión que comparten estos inhibidores en el complejo I mitocondrial y conociendo que este lugar también corresponde con el punto de unión de la ubiquinona, se realizó el protocolo descrito por Janssen (Janssen y cols., 2007). La reacción que se genera siguiendo este protocolo comienza con la transferencia de electrones originados por la

oxidación de la NADH a un análogo de la ubiquinona (decilubiquinona). Una vez reducida la decilubiquinona, ésta cede sus electrones al aceptor final de electrones DCIP que posee color azul en su forma oxidada y pH neutro, mientras que en su forma reducida pasa a ser incoloro. Por lo tanto, midiendo la absorbancia a 600 nm, en presencia de NADH se vería una bajada sustancial debida a la reducción del DCIP mientras que, al añadir rotenona, la transferencia de electrones quedaría bloqueada y la absorbancia se mantendría constante.

Para comenzar, se realizó un primer ensayo intentando realizar las menores modificaciones posibles al protocolo mencionado. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la figura 48.

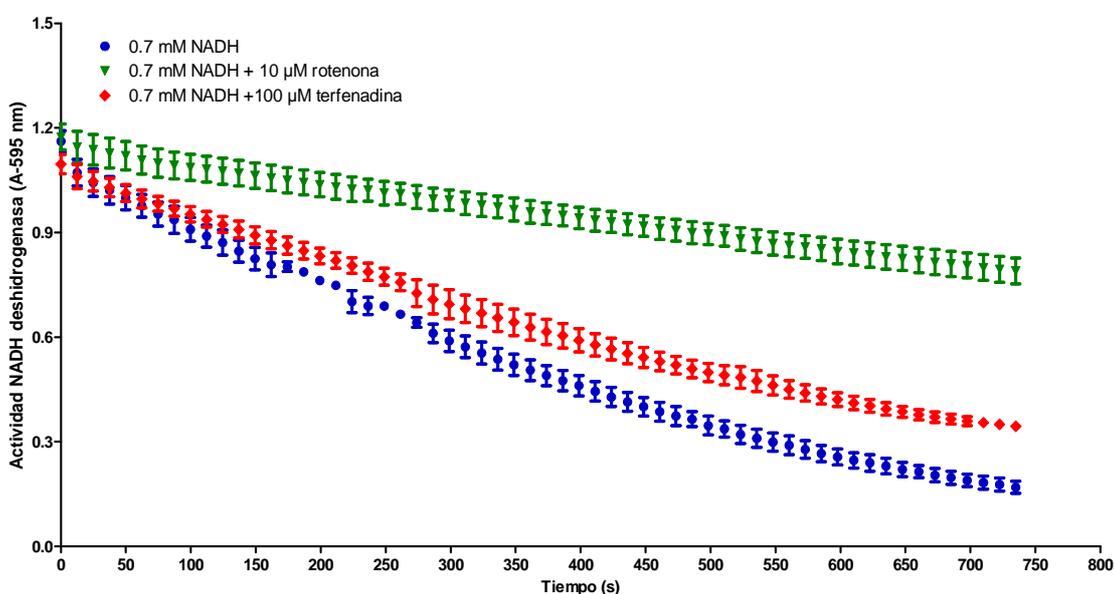


Figura 48. Efecto generado por la rotenona y la terfenadina sobre el complejo I mitocondrial en presencia de decilubiquinona en homogenizados de membranas celulares de rata Sprague Dawley (corazón) durante 730 segundos. Los datos representan la absorbancia del color generado por la reducción del DCIP a 595 nm y están expresados como la media \pm SEM (n=2).

Los resultados obtenidos para este ensayo muestran el efecto esperado. La curva en presencia de NADH decae a lo largo del tiempo debido a la reducción del DCIP. Asimismo, cuando se añade rotenona no se alcanza la reducción y la curva se mantiene. En cambio, la terfenadina no produce un bloqueo tan acentuado. Este fenómeno puede ser debido a que los 3 compuestos empleados: decilubiquinona, rotenona y terfenadina, comparten el mismo lugar de unión y por tanto su efecto

dependerá no sólo de la concentración, sino también de la afinidad de cada compuesto por dicho lugar de unión. Por lo tanto, y teniendo en cuenta (tal y como se demostrará en el siguiente apartado) que en los homogeneizados de membranas se preserva la ubiquinona endógena, se repitió el experimento sin añadir decilubiquinona. Los resultados más representativos se muestran a continuación:

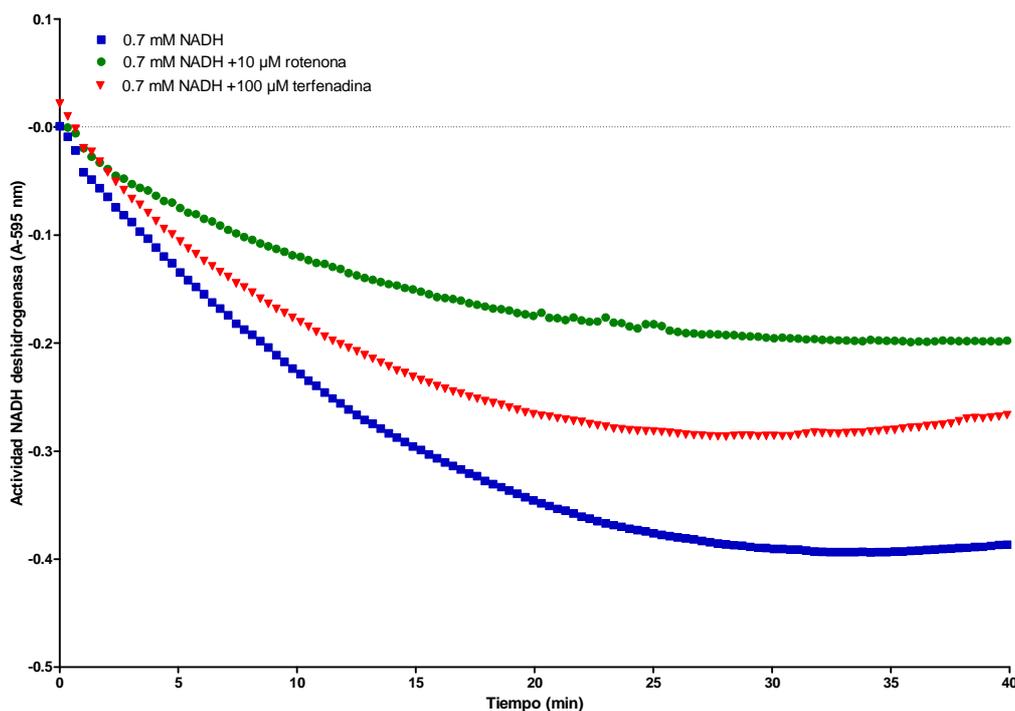


Figura 49. Efecto generado por la rotenona y la terfenadina sobre el complejo I mitocondrial en ausencia de decilubiquinona en homogenizados de membranas celulares de rata Sprague Dawley (corazón) durante 40 minutos. Los datos representan la absorbancia del color generado por la reducción del DCIP a 595 nm y están expresados restando los correspondientes controles negativos. Se representan los promedios de tres ensayos independientes.

Como puede apreciarse en la figura 49 y al igual que en la figura 48, existe una bajada pronunciada de la absorbancia en presencia de NADH. Este efecto es bloqueado por la rotenona y en menor medida por la terfenadina. No obstante, al eliminar la decilubiquinona del experimento se consigue observar mucho mejor el efecto inhibitorio de la terfenadina sobre el complejo I.

2.7.- Detección de la actividad Citocromo c Oxidasa (CcO)

Para comprobar el correcto funcionamiento de la cadena de transporte de electrones (CTE) se llevó a cabo la determinación de la actividad CcO utilizando el sustrato del complejo I, NADH. De esta manera, se comprueba por un lado, la funcionalidad de la cadena desde el complejo I hasta el complejo IV, y por otro, posibilita el estudio de la interacción de diferentes compuestos con los complejos que conforman la CTE. La reacción comienza con la transferencia de electrones desencadenada por la oxidación de la NADH en el complejo I, y finaliza con una competición por la reducción del citocromo c por parte del cromógeno DAB y los electrones procedentes del complejo III. En este caso, se decidió realizar la determinación en presencia de rotenona y terfenadina y así estudiar su efecto sobre la CTE.

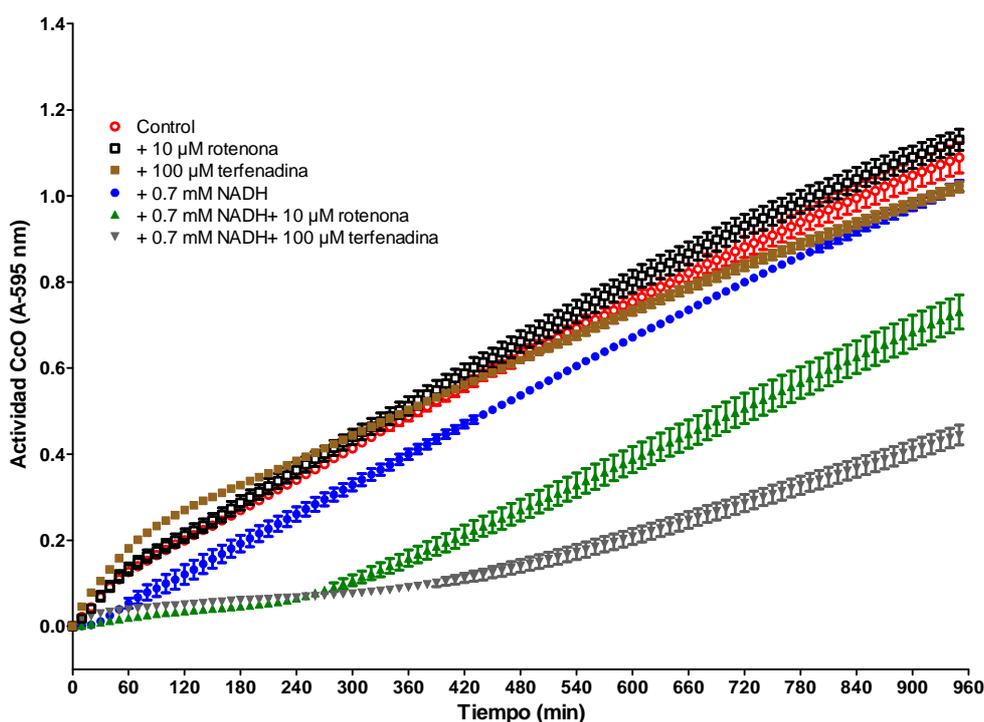


Figura 50. Efecto generado por la rotenona y terfenadina sobre la actividad CcO en homogenizados de membranas celulares de rata Sprague Dawley (corazón) durante 960 minutos. Los datos representan la absorbancia del color generado por la oxidación de la DAB a 595 nm y están expresados como la media \pm SEM (n=6).

Los resultados obtenidos muestran que el flujo de electrones originado por la oxidación del NADH en el complejo I, al llegar al complejo III, compiten con la DAB por la reducción del citocromo c (figura 50). De este modo, la oxidación de la DAB queda obstaculizada y no se genera color. Este efecto dura hasta que se agota la NADH (min 40), momento en el que se vuelve a permitir la oxidación de la DAB generando color y alcanzando valores de absorbancia próximos a la curva control. Por otro lado, a la hora de añadir el inhibidor del complejo I, la rotenona, el efecto detectado en presencia de NADH se ve prolongado en el tiempo hasta el min 240. Algo similar ocurre en presencia de terfenadina donde el efecto se alarga hasta el minuto 380. Estas similitudes en los resultados podrían ser debidas a que tanto la rotenona como la terfenadina actúan sobre el mismo punto de unión en el complejo I.

En los ensayos realizados no se añadió el sustrato citocromo c ya que al estar asociado a la membrana interna mitocondrial está presente en los homogenizados de membranas celulares. Esto fue corroborado en anteriores experimentos realizando la determinación de la actividad tanto en presencia como en ausencia de sustrato (datos no mostrados).

2.8.- La terfenadina y la rotenona aumentan el calcio citosólico

En trabajos anteriores demostramos que el incremento de calcio citosólico es un evento clave e inicial en el proceso apoptótico inducido por terfenadina en las células tumorales (Jangi y cols., 2008). Curiosamente, también se ha descrito este efecto para la rotenona (Yuan y cols., 2014). Para ratificar si ambas drogas inducen la salida de calcio reticular aumentando la concentración de calcio citosólico como un evento inicial en el proceso de muerte celular por apoptosis en las células tumorales, utilizamos la sonda fluorescente Fluo-4 AM y analizamos la salida de calcio reticular mediante microscopía confocal en las células de adenocarcinoma de colon HCT8 tratadas con terfenadina, tratadas con rotenona y sin ningún tratamiento (control).

Como podemos observar en la figura 51 las células tratadas con terfenadina 40 μM tuvieron un gran incremento inmediato en los niveles citosólicos de calcio. Posteriormente los niveles disminuyeron hasta alcanzar los niveles basales normales. Sin embargo, cuando tratamos las células con terfenadina a 15 μM observamos que la respuesta fue algo diferente. El aumento de calcio citosólico inicial no fue tan inmediato, sino que tuvo lugar de una manera más escalonada, es decir, apreciamos varios “picos” a lo largo de los 15 minutos de seguimiento.

En el caso de las células tratadas con rotenona (figura 52), una dosis elevada de rotenona (30 μM) indujo un incremento inmediato en los niveles de calcio citosólicos y tras un descenso pronunciado hasta el nivel basal, se mantuvo más o menos constante a lo largo del tiempo. Sin embargo, cuando tratamos las células con una dosis más baja de rotenona (10 μM) los niveles de calcio no variaron hasta transcurridos aproximadamente 12 minutos de iniciarse el tratamiento. Posteriormente, los niveles de calcio aumentaron y disminuyeron a lo largo del tiempo en forma de “pequeños picos” de manera similar a lo que ocurre con el tratamiento de terfenadina.

Las células control, a las que no se les añadió ningún tratamiento, no sufrieron variaciones en los niveles de calcio intracelulares.

En definitiva, estos resultados demuestran que tanto la rotenona como la terfenadina, que comparten como diana el complejo I mitocondrial, inducen en las células un incremento de calcio citosólico, clave en la respuesta apoptótica inducida por la terfenadina.

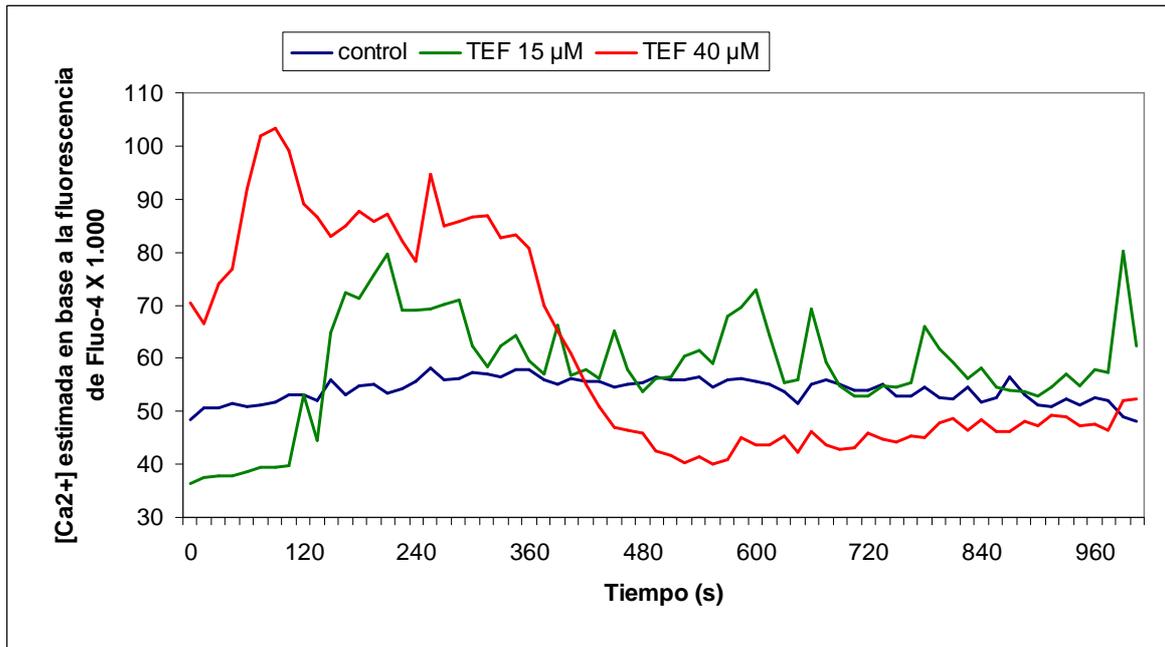


Figura 51. Efecto de la terfenadina sobre los niveles de calcio intracelulares de las células HCT8. Las células fueron marcadas con la sonda fluorescente Fluo-4 AM e inmediatamente después de añadir la terfenadina (a concentraciones 15 y 40 µM) se tomaron imágenes mediante microscopía confocal cada 15 segundos durante 15 minutos. A las células control se les añadió medio libre de SBF con el fin de representar las mismas condiciones que en el caso de las células tratadas. Las imágenes fueron tratadas y analizadas mediante el software ImageJ para la obtención de la gráfica. Se representan los promedios de tres ensayos independientes.

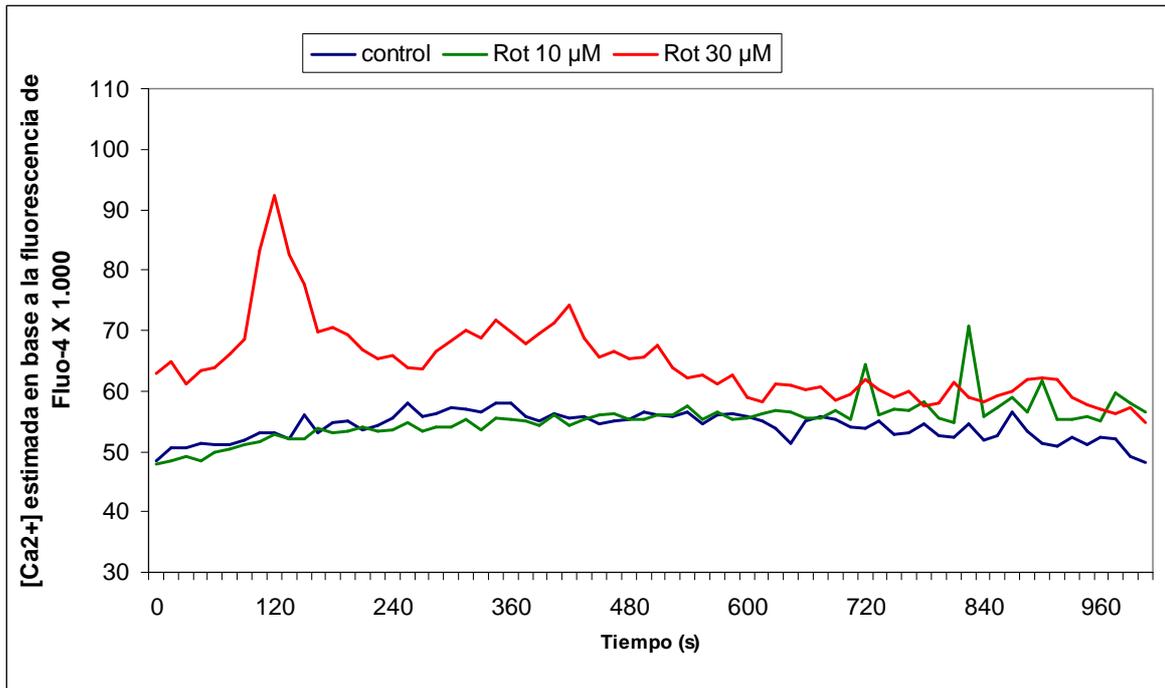


Figura 52. Efecto de la rotenona en los niveles de calcio intracelulares de las células HCT8. Las células fueron marcadas con la sonda fluorescente Fluo-4 AM e inmediatamente después de añadir la rotenona (a concentraciones 10 y 30 μM) se tomaron imágenes mediante microscopía confocal cada 15 segundos durante 15 minutos. A las células control se les añadió medio libre de SBF con el fin de representar las mismas condiciones que en el caso de las células tratadas. Las imágenes fueron tratadas y analizadas mediante el software ImageJ para la obtención de la gráfica. Se representan los promedios de tres ensayos independientes.

DISCUSIÓN

I. La terfenadina induce en células tumorales apoptosis y autofagia de manera independiente a la expresión de los receptores H1 y H4 de la histamina

Muchos tipos celulares diferentes expresan los receptores H1 de la histamina, incluyendo también las células tumorales (Davio y cols., 1995; Lemos y cols., 1995; Davio y cols., 1996). En este sentido, diferentes autores han relacionado la expresión de estos receptores de membrana y/o la secreción celular de histamina con la malignidad tumoral, sugiriendo que la histamina actúa como factor de crecimiento autocrino y paracrino en algunos tipos tumorales (Falus y cols., 2001; Medina y cols., 2006; Francis y cols., 2012). Asimismo, se está utilizando la histamina como tratamiento adyuvante a la inmunoterapia en algunos tratamientos antitumorales, ya que favorece la eliminación de los radicales libres que se producen en la reacción inmune antitumoral (Brunner y cols., 2006).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que diferentes líneas de células tumorales procedentes de leucemias y melanomas humanos expresan el receptor H1 de la histamina (Jangi y cols., 2004, Jangi y cols., 2006). Además, hemos observado que la histamina favorece la proliferación de las células tumorales, lo que pondría en duda su posible efecto beneficioso como tratamiento antitumoral (Blaya y cols., 2010). Por otra parte, en nuestros estudios demostramos que los antihistamínicos H1 como son la difenhidramina, la triplolidina, el astemizol y la terfenadina, inducen muerte celular por apoptosis (Jangi y cols., 2006). Especialmente la terfenadina, a una dosis de 5-10 μ M y en 24 horas, induce apoptosis en más del 80% de la población celular en cultivo. En las células de melanoma, la apoptosis inducida por terfenadina está mediada por la liberación de calcio intracelular (Jangi y cols., 2008). La salida masiva de calcio al citosol produce estrés reticular, daño en el ADN, activación de las caspasa-2, -4 y -9 y, en consecuencia, muerte celular apoptótica (Nicolau-Galmés y cols., 2011). Sin embargo, utilizando la metodología del ARN de interferencia pudimos demostrar que el efecto apoptótico y antitumoral de la terfenadina no está mediado por la expresión del receptor H1 de la histamina (Jangi y cols., 2008).

Partiendo de los resultados mencionados, el propósito de este trabajo fue analizar, en primer lugar, si la actividad antitumoral (proapoptótica) de la terfenadina es

extensiva a otras estirpes tumorales además del melanoma tales como el adenocarcinoma de colon, mama y el neuroblastoma; y en segundo lugar, identificar la diana molecular a través de la cual induce la terfenadina su efecto proapoptótico en las mismas.

El efecto de la terfenadina sobre las líneas tumorales a estudio se evaluó mediante ensayos de viabilidad celular, comprobando que en todas las líneas tumorales analizadas la terfenadina induce pérdida de la viabilidad celular y apoptosis de manera dosis-dependiente. Así, al igual que habíamos demostrado en trabajos previos, las 3 líneas más sensibles resultaron ser las líneas de melanoma humano MEL-JUSO, MEL-HO y COLO-800, con IC₅₀ cercanos a 10 µM, mientras que la línea que resultó ser más resistente fue la de neuroblastoma, con un IC₅₀ superior a 20 µM. Esta diferencia podría ser debida, entre otras causas, a la tasa de replicación característica de cada línea tumoral. Así, la tasa de replicación de las células de neuroblastoma es de 60 horas, mientras que la tasa de replicación de las líneas de melanoma es de 24-28 horas, lo que se correlaciona con la sensibilidad de éstas a la droga.

Nuestros resultados concuerdan con lo que otros autores han descrito en células tumorales de colon (Liu y cols., 2003), en líneas tumorales de mastocitos (Hadzijusufovic y cols., 2010) o más recientemente, en líneas tumorales de cáncer de próstata (Wang y cols., 2014).

Tras la administración oral de la terfenadina, ésta se metaboliza rápidamente en el hígado a través del citocromo P450, transformándose en su metabolito activo fexofenadina, responsable de los efectos antihistamínicos conocidos de la terfenadina (González y cols., 1998). Sin embargo, en las diferentes líneas tumorales que hemos analizado en este trabajo hemos demostrado que el efecto citotóxico de la terfenadina es directo, no se produce a través de su metabolito fexofenadina, ya que a ninguna de las dosis estudiadas pudimos observar que la fexofenadina tuviera efecto alguno sobre la viabilidad celular. Es decir, la

fexofenadina es inocua para todas las líneas tumorales analizadas. Los trabajos de Hadzijusufovic y cols. (2010) y Wang y cols. (2014) sobre el efecto de la fexofenadina y de otros antagonistas H1 en líneas tumorales de mastocitos y líneas tumorales de cáncer de próstata apoyan nuestros resultados, sugiriendo que el efecto proapoptótico antitumoral de la terfenadina podría estar mediado por una ruta celular diferente, independientemente a la ruta de señalización intracelular de la histamina.

Al igual que en los trabajos de Hadzijusufovic y cols. (2010) y Wang y cols. (2014) citados arriba, nuestros resultados muestran la inducción de muerte por apoptosis mediante el estudio de la activación de la caspasa-3. La caspasa-3 es una de las caspasas efectoras y el punto de no retorno donde convergen las dos principales rutas intracelulares apoptóticas, la ruta intrínseca o mitocondrial y la ruta extrínseca o mediada por receptores de muerte (Porter y cols., 1999; Elmore, 2007). Previamente comprobamos en líneas de melanoma humano que la producción de ROS mitocondriales y el aumento de calcio citosólico están implicados en la apoptosis inducida por la terfenadina (Nicolau-Galmés y cols., 2011). Además de su implicación en la señalización apoptótica, se ha descrito que los ROS y el calcio citosólico también pueden inducir autofagia (Maiuri y cols., 2007).

Existen suficientes evidencias que sostienen la idea de que la autofagia es un proceso fisiológico que puede regular la iniciación y la progresión tumoral, así como la respuesta terapéutica a fármacos anticancerígenos usados en tratamientos clínicos (Eisenberg-Lerner y cols., 2009). A diferencia de la apoptosis, donde la muerte de la célula tumoral es el objetivo primordial en la mayoría de los fármacos usados en terapia, la autofagia está involucrada tanto en la muerte de las células tumorales como en su supervivencia. A pesar de esto, numerosas publicaciones describen mecanismos de inducción de muerte celular mediados por autofagia (Fazi y cols., 2008; Grandier y cols., 2009). Diferentes tipos de estrés como la falta de nutrientes, la hipoxia, el ratio de ATP/AMP y los niveles intracelulares de ROS (Poillet-Perez y cols., 2014) pueden regular la autofagia. No obstante, la interrelación entre la apoptosis y la autofagia continúa siendo compleja.

Estudios recientes afirman que el papel de la autofagia en el cáncer depende del tejido, de la etapa tumoral y del tipo de tumor (Poillet-Perez y cols., 2014). Durante las primeras etapas de la carcinogénesis la autofagia juega un papel protector mediante la prevención del daño en el ADN y en las proteínas que participan en la inhibición de la tumorigénesis producidos por el aumento de ROS. En las etapas finales de la progresión tumoral (desarrollo de metástasis), la autofagia desempeña un papel protumoral a través de la eliminación del estrés metabólico provocado por los ROS y por la demanda de nutrientes por parte de las células tumorales (Morselli y cols., 2009; Debnath y cols., 2011; Poillet-Perez y cols., 2014). En concordancia con estos datos, en estudios previos realizados por nuestro grupo en células de melanoma humano metastático A375 y HT144, demostramos que la autofagia promueve o facilita la apoptosis inducida por terfenadina (Nicolau-Galmés y cols., 2011).

En el presente trabajo hemos demostrado que el tratamiento con terfenadina, además de en el melanoma, también induce autofagia en las líneas de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama y neuroblastoma. La proteína LC3, usada habitualmente para el estudio de la autofagia (Klionsky y cols., 2012), participa en el proceso autofágico y se localiza en los autofagosomas. Durante la autofagia esta proteína sufre una modificación lipídica y pasa de la forma soluble LC3-I a su forma conjugada LC3-PE, que se encuentra asociada a la membrana del autofagosoma y se denomina LC3-II. Una mayor relación de LC3-II/LC3-I indica la presencia de una mayor cantidad de autofagosomas y por tanto una mayor actividad autofágica (Nencioni y cols., 2013). Nuestros resultados muestran que desde las primeras horas de tratamiento, se activa la autofagia, por lo que la autofagia es un proceso concomitante con la apoptosis.

La fosforilación en la serina 139 (Ser¹³⁹) de un subtipo de histona H2A denominada H2A.X, se produce en respuesta a la formación de roturas de doble cadena (DSB) en el ADN de la célula. Esta fosforilación de la histona H2A.X se denomina γ -H2A.X y es un indicador del daño genómico (Rogakou y cols., 2000;

Helt y cols., 2005). El daño por DSB del ADN es potencialmente letal para las células, por lo que debe ser rápidamente reconocido y reparado para evitar daños genéticos. Para ello existen mecanismos intracelulares capaces de reconocer y señalar la presencia de DSB a las proteínas de los puntos de control del ciclo celular. Ante una señal de presencia de DSB, los complejos cdk-ciclina de los puntos de control pueden detener el ciclo y facilitar de ese modo que los mecanismos de reparación del ADN participen y se activen (Zhou y cols., 2000). Una vez producido el daño en el ADN, la quinasa ATM es rápidamente reclutada a los lugares donde hay DSB. ATM se considera como un importante mediador fisiológico en la fosforilación de H2A.X en respuesta a la formación de DSB (Kastan y cols., 2000; Bakkenist y cols., 2003) y es activada por autofosforilación en la serina 1981 (Ser¹⁹⁸¹), lo que conduce a su separación en monómeros y aumenta su actividad quinasa (Kozlov et al., 2006). En nuestro trabajo hemos analizado la fosforilación de ambas proteínas, γ -H2A.X (pSer¹³⁹) y ATM (pSer¹⁹⁸¹), para ver la implicación del daño en el ADN en la muerte celular inducida por terfenadina. Hemos observado que en el caso de la histona H2A.X la fosforilación ocurre a partir de las 16 horas de tratamiento, excepto en el caso de MEL-HO que sucede a partir de las 24 horas. En el caso de la quinasa ATM su activación se produce a las 16 horas de tratamiento con terfenadina. Estos resultados coinciden con los resultados previos obtenidos en células de melanoma (Nicolau-Galmés y cols., 2011). Wang y cols. (2014) al igual que nosotros, describen el daño genómico que se produce en células de cáncer de próstata tratadas con terfenadina.

Para ejercer su función, ATM fosforila y activa diversas proteínas, entre las cuales se encuentran los factores p53 y p73 que a su vez activan la transcripción, entre otras, de p21 y NOXA (Schmitt y cols., 2007). p53 pertenece a una familia de factores de transcripción a la cual pertenecen también p73 y p63 (Levrero y cols., 2000). En condiciones normales, la célula presenta bajos niveles de la proteína p53; sin embargo, se activa y se acumula rápidamente en respuesta a una variedad de estímulos que incluyen el daño en el ADN. Una vez activada, p53 puede inducir

parada del ciclo celular o apoptosis a través de mecanismos transcripcionales y no transcripcionales (Amaral y cols., 2010). Así, p53 puede actuar como factor de transcripción sobre genes que regulan estas funciones o interactuar directamente con otras proteínas (Amaral y cols., 2010). Los genes diana de p53 implicados en la apoptosis pueden ser componentes de la vía apoptótica extrínseca o bien de la vía apoptótica mitocondrial (Kroemer y cols., 2007). Generalmente, las células que mueren a través de apoptosis dependiente de p53 activan la vía mitocondrial. Entre los componentes de la vía apoptótica mitocondrial inducidos por p53 se encuentran miembros proapoptóticos de la familia bcl-2 como Bax, PUMA, NOXA y Bid (Olsson y cols., 2007). Noxa es una proteína proapoptótica de la familia bcl-2 que permite la permeabilización de la membrana mitocondrial mediante el secuestro de proteínas antiapoptóticas de la familia bcl-2 (Roos y cols., 2006). Participa en la apoptosis inducida por la expresión de p53 o en respuesta al daño en el ADN (Oda y cols., 2000).

Cuando analizamos la expresión de p53, p73 y Noxa en las cuatro líneas celulares tratadas con terfenadina, observamos la activación de estas proteínas, haciendo evidente que la vía p53/p73 participa en la inducción de apoptosis. El tratamiento con terfenadina induce un incremento de la expresión de p53 y NOXA. En las células sin tratar, la proteína p73 presenta una distribución punteada que se localiza predominantemente en el citoplasma, mientras que en las células tratadas con terfenadina se localiza también en el núcleo. El aumento de intensidad de la señal fluorescente y su translocación al núcleo reflejan el aumento de expresión y la activación de p73. Otros autores han descrito que el tratamiento con terfenadina induce un incremento de la expresión de p53 en líneas celulares de adenocarcinoma de colon y de hepatocarcinoma humano (Wang y cols., 2002; Liu y cols., 2003).

En definitiva, la terfenadina induce apoptosis acompañada del proceso de autofagia, que posiblemente acelera la apoptosis, como previamente demostramos en las células de melanoma humano (Nicolau-Galmés y cols., 2011). En este

proceso se produce daño en el ADN lo que activa la ruta p53/p73 y desencadena la muerte de las células a través de la vía apoptótica mitocondrial.

Al igual que en las líneas de melanoma analizadas previamente (Jangi y cols., 2008), estudiamos la expresión del receptor H1 de la histamina en diferentes líneas tumorales humanas a nivel de ARN y a nivel de expresión de la proteína. Además, también incluimos el análisis del receptor H4 de la histamina, ya que recientemente se han publicado estudios sobre su posible implicación en la progresión maligna del melanoma (Medina y cols., 2010) y en el carcinoma de mama (Medina y cols., 2006). En este experimento además de las líneas de adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama, neuroblastoma y melanoma analizamos también otras líneas tumorales humanas procedentes de leucemias y melanomas para comprobar que se trata de un hecho generalizado o específico de cada línea tumoral. Los resultados mostraron diferentes niveles de expresión relativa de ARNm en las diferentes líneas celulares. Curiosamente, observamos que todas las líneas celulares excepto MEL-HO expresan el receptor H1 con diferente grado de intensidad. En cualquier caso, la inducción de apoptosis no se relaciona con el grado de expresión ya que es similar en todas las líneas.

En el caso del receptor H4 de la histamina los valores de expresión génica relativa fueron similares en todas las líneas tumorales, excepto en el caso del neuroblastoma SMS-KCNR en la que se puede apreciar que es algo mayor. Sin embargo, cuando analizamos la expresión a nivel de proteína observamos que sólo las líneas de melanoma A375 y HT144 expresan niveles altos de proteína de ambos receptores. Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos postranscripcionales que regulan y/o bloquean la síntesis proteica a partir de ARNm. En este sentido, Lippert y cols. (2004) también observan, en mastocitos de piel humanos, una falta de correspondencia entre la expresión relativa de ARNm y la expresión del receptor H1 de la histamina. No obstante, no podemos descartar posibles modificaciones en los receptores que dificulten el reconocimiento de los anticuerpos utilizados.

Estos resultados sugieren que el efecto antitumoral de la terfenadina es independiente de los receptores H1 y H4 de la histamina en todas las líneas tumorales analizadas; por lo tanto, deben ser otras las vías intracelulares involucradas en la muerte celular inducida por terfenadina.

II- Identificación de la diana molecular de la terfenadina en las células tumorales

Una vez descartada la participación de los receptores H1 y H4 de la histamina en la apoptosis inducida por terfenadina, analizamos si la terfenadina ejerce su efecto antitumoral a través de los receptores muscarínicos y los receptores de potasio hERG, ambos acoplados a proteínas G.

Al igual que los receptores H1 de la histamina, los receptores muscarínicos M₁, M₃ y M₅ se acoplan a proteínas G_{q/11} las cuales desencadenan la activación de la fosfolipasa C y con ello la activación del inositol trifosfato y del diacilglicerol. Los receptores M₂ y M₄, por otro lado, se acoplan a proteínas G_{i/0} que pueden inhibir la adenilato ciclasa, activar canales de potasio e inhibir canales de calcio dependientes de voltaje (Edelstein y cols., 2011).

Abordamos este estudio diseñando un *array* de lisado de membranas celulares procedentes de las células de melanoma A375 y HT144, adenocarcinoma de colon HCT8, adenocarcinoma de mama MCF7, neuroblastoma SMS-KCNR, leucemia CEM, fibroblastos embrionarios de ratón MEF, melanocitos no tumorales de piel HEM (P-10853) y melanoma A375 inoculado en ratones desnudos Mela-FD. Además se incluyeron membranas celulares de carcinoma de ovario CHO-M2 como control positivo de los receptores muscarínicos. Los experimentos de desplazamiento de la fijación de la [³H]N-metilescopolamina con terfenadina revelaron que únicamente las membranas de corteza cerebral, de melanoma A375 inoculado en ratón desnudo y de células de carcinoma de ovario CHO-M2 presentan lugares de unión para la [³H]-NMS. Yasuda y cols. describieron la afinidad de la terfenadina por los receptores muscarínicos (Yasuda y cols., 1999), lo que se confirma con nuestros resultados en las células CHO-M2, que

sobreexpresan el receptor muscarínicos M2. Sin embargo, la falta de fijación de la [³H]-NMS a las diferentes estirpes tumorales sugiere que la expresión de los receptores muscarínicos es muy pequeña o nula en las mismas, y por lo tanto, es poco probable que dichos receptores sean los responsables de la actividad antitumoral de la terfenadina; todo indica que los receptores muscarínicos, a pesar de la afinidad demostrada por la terfenadina, no son la diana molecular preferente de la misma en las células tumorales. La unión del ligando [³H]-NMS a las membranas derivadas de Mela-FD no indica necesariamente expresión de receptores en las células tumorales puesto que se trata de un melanoma obtenido por inoculación de células A375 en ratones desnudos y, por tanto, contiene también células no tumorales provenientes de ratón. Es más, las membranas obtenidas de las células A375 no muestran fijación a [³H]-NMS.

Por otra parte, se ha descrito que los canales de potasio hERG están implicados en la regulación del ciclo celular, de la apoptosis y de la proliferación celular (Jehle y cols., 2011; Staudacher y cols., 2014). Además, en las células cardiacas estos canales participan en la repolarización de las membranas tras un potencial de acción. Recientemente se ha descrito que también están presentes en mayor medida en células cancerígenas (Dolderer y cols., 2010) y por ello su identificación y la caracterización de su funcionamiento en las células tumorales sugiere que pueden tener un importante potencial en la terapia contra el cáncer (Jehle y cols., 2011).

Una de las causas del “síndrome QT-largo” es el mal funcionamiento de los canales de potasio cardíaco, entre ellos los canales hERG (Sanguinetti y cols., 2006). El riesgo de actuación sobre estos canales se ha convertido durante los últimos años en la causa más frecuente de retirada del mercado de medicamentos prescritos para patologías no cardiacas. La terfenadina fue retirada del mercado en 2003 debido al potencial peligro de provocar alteraciones en el ritmo cardíaco como la prolongación del intervalo QT (Olasińska-Wiśniewska y cols., 2014).

Estos antecedentes nos indujeron a pensar que los canales de potasio hERG podrían ser la diana molecular de la terfenadina. Sin embargo, al estudiar el efecto de la terfenadina sobre las células de la línea HEK-293, que carecen de canales

hERG, pudimos comprobar que la terfenadina induce igualmente muerte celular. Estos resultados sugieren que los canales de potasio hERG no están implicados en la muerte provocada por terfenadina en las células tumorales.

Por otro lado, debido a que en la proliferación y supervivencia de la mayoría de las células tumorales participan activamente los receptores tirosina quinasa (Rettew y cols., 2014), también analizamos la participación de estos receptores en la muerte inducida por terfenadina. Tratando a las células tumorales con genisteína, un inhibidor de la actividad tirosina quinasa, encontramos que se revertía parcialmente la muerte celular inducida por terfenadina en el adenocarcinoma de colon y en el melanoma, sugiriendo que esta actividad participa en el proceso de muerte inducido por esta droga.

Las proteínas quinasas son enzimas que regulan el estado de fosforilación de proteínas intracelulares y se dividen en dos grupos: quinasas que funcionan como receptores (RTKs) y tirosina quinasas no-receptores (no-RTKs). Estas proteínas están activadas frecuentemente en células cancerosas incluso en ausencia de ligandos en el caso de RTKs debido a la sobreexpresión de ciertos genes (Ortiz-Melón, 2009). En este trabajo utilizamos los inhibidores específicos de receptores tirosina quinasa más abundantes en las células tumorales como son FGFR1, IGF-1 y EGFR (Chong y cols., 2011), con la intención de implicar a algunos de estos receptores en la muerte inducida por terfenadina, pero no obtuvimos resultados significativos (datos no mostrados).

Por tanto, nuestros resultados sugieren que la actividad tirosina quinasa está implicada en alguno de los puntos de la ruta apoptótica que activa la terfenadina, pero no implican directamente la participación de los receptores tirosina quinasa estudiados.

Llegados a este punto, pensamos que debido a la naturaleza lipofílica de la terfenadina ésta, al igual que otros muchos compuestos de la misma naturaleza, podría atravesar la membrana plasmática y actuar en los orgánulos celulares, sin necesidad de hacerlo a través de receptores de membrana. Sabemos, por ejemplo, que de alguna manera la terfenadina afecta al retículo endoplasmático que libera

calcio al citosol desencadenando la respuesta de muerte celular apoptótica (Jangi y cols., 2008; Nicolau-Galmés y cols., 2011). Además, nuestros resultados previos sobre los mecanismos intracelulares implicados en la apoptosis inducida por terfenadina apuntaban a un incremento de calcio citosólico, a la producción de ROS y a la autofagia. Todo ello nos indujo a pensar en la mitocondria como posible diana de la terfenadina, puesto que todos los procesos mencionados se han relacionado con una disfunción mitocondrial (Boland y cols., 2013).

Las mitocondrias son los orgánulos encargados del suministro energético de la célula a través de la cadena de transporte de electrones (CTE) y son las dianas moleculares de muchas drogas antitumorales (Vatrinet y cols., 2015). Las proteínas mitocondriales que componen la CTE están agrupadas en complejos multiproteicos conocidos como complejos I, II, III y IV. El complejo I, también conocido como NADH deshidrogenasa o NADH-Ubiquinona oxidorreductasa, es el responsable de transferir electrones del NADH a la ubiquinona (CoQ), un transportador liposoluble. Al mismo tiempo el Complejo I transloca cuatro protones a través de membrana, produciendo un gradiente de protones (Vinothkumar y cols., 2014).

Un inhibidor específico del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial es la rotenona, sustancia de origen vegetal utilizada ampliamente como pesticida y que causa neurotoxicidad; actúa como inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, bloquea la transferencia de electrones a la ubiquinona y afecta así a la síntesis de ATP (Goswami y cols., 2014).

Por otra parte, muy recientemente se ha descrito que la rotenona induce muerte celular por apoptosis en eritrocitos y en células de neuroblastoma murino (Lupesco y cols., 2012; Swarnkar y cols., 2012; Goswami y cols., 2014). Los experimentos llevados a cabo utilizando el radioligando [³H]-DHR, demuestran que la terfenadina se une con gran afinidad y específicamente al lugar de unión de la rotenona, el complejo I (Higgins y cols., 1996), si bien con una afinidad menor que la de la rotenona. Los resultados muestran que en las líneas celulares en las que se obtuvo una fijación de [³H]-DHR aceptable, se produce un desplazamiento

de la [³H]-DHR por la terfenadina de manera dosis-dependiente. Además, los resultados obtenidos sobre la actividad de la NADH deshidrogenasa y la CcO nos indican que la terfenadina no solo se une al complejo I mitocondrial, sino que también inhibe su actividad. Estos resultados, junto con la respuesta similar de la rotenona y la terfenadina sobre el calcio citosólico, nos permiten afirmar por primera vez, que la terfenadina actúa como inhibidor del complejo I mitocondrial y que el complejo I mitocondrial es la diana molecular mediante la cual la terfenadina ejercer su efecto antitumoral. La inhibición del complejo I mitocondrial justifica la producción de ROS, el estrés reticular y la salida masiva de calcio al citosol, que son los desencadenantes del proceso apoptótico inducido por la terfenadina en las células tumorales (Li y cols., 2003; Swarnkar y cols., 2012; Goswami y cols., 2014).

Se ha demostrado recientemente que, al igual que la terfenadina, la rotenona causa neurotoxicidad debido a su capacidad para producir ROS e induce apoptosis en varios tipos celulares (Li y cols., 2003; Panov y cols., 2005; Pal y cols., 2014; Goswami y cols., 2014). También se ha descrito que la rotenona es capaz de alterar la homeostasis del calcio (de Groot y cols., 2014). Lupesco y cols. (2012) incluyen el aumento de calcio citosólico como uno de los procesos en la muerte inducida por rotenona en eritrocitos, y Yuan y cols. (2014) observan este aumento de calcio en células neuronales.

El hecho de que tanto la terfenadina como la rotenona tengan un efecto similar sobre el calcio citosólico, mensajero que inicia los procesos moleculares que inducen apoptosis (Jangi y cols., 2008), refuerzan la idea de que la terfenadina actúa al mismo nivel que la rotenona, es decir, inhibiendo el complejo I mitocondrial. Ambas drogas inducen un incremento de calcio citosólico y el patrón de liberación depende de la concentración de la droga en ambos casos.

El conjunto de todos los resultados nos indican que la diana molecular de la terfenadina es el complejo I mitocondrial. La terfenadina, al igual que la rotenona, inhiben el complejo I mitocondrial. Esta inhibición del complejo I supone una

alteración en los mecanismos energéticos de la célula, lo cual se refleja en una falta de ATP y estrés oxidativo (Rybalka y cols., 2014). En el caso de la rotenona está descrito que la inducción de la apoptosis está mediada por la producción de ROS mitocondriales (Swarnkar y cols., 2012; Pal y cols., 2014; Goswami y cols., 2014). De igual manera, la producción de ROS es un proceso clave en la muerte celular inducida por terfenadina en las células de melanoma humano (Nicolau-Glamés y cols., 2011). El aumento de los niveles de ROS en la mitocondria es una característica que se asocia a las células que tienen la cadena de transporte de electrones defectuosa o deficiente (Hamanaka y cols., 2010; Schumacker y cols., 2006; Sena y cols., 2012; Wheaton y cols., 2011). Esta alteración en la homeostasis de la mitocondria junto con el aumento de los niveles de ROS activa también el proceso de autofagia (Poillet-Perez y cols., 2014).

El estrés oxidativo también afecta a las funciones del retículo endoplásmico pudiendo causar un estrés reticular en las células. Se ha demostrado que la rotenona induce estrés reticular en células de neuroblastoma (Goswami y cols., 2014) que da lugar a un aumento de calcio citosólico en la célula, al igual que ocurre en las células tumorales cuando se tratan con terfenadina (Jangi y cols., 2008).

La mayoría de autores apoyan que el transporte de calcio desde el retículo a la mitocondria juega un papel muy importante en la regulación bioenergética de la célula, en la producción de especies reactivas de oxígeno, en la autofagia y en la apoptosis (Kaufman y cols., 2014).

Aunque el retículo endoplásmico es el principal almacén de calcio en la célula, la liberación de calcio al citosol hace que la mitocondria, el núcleo y otros orgánulos respondan de manera dinámica y coordinada. Recientemente, se han identificado nuevas moléculas como la proteína MCUR1, que participan en el transporte de calcio entre el retículo y las mitocondrias (Mallilankaraman y cols., 2012a; Mallilankaraman y cols., 2012b; Sancak y cols., 2013). Por otro lado también se han demostrado, en la membrana externa mitocondrial, zonas de interacción con el retículo endoplasmático, conocidas con el nombre de “membranas asociadas a

mitocondria" (MAM; "*Mitochondria Associated Membranes*"). Esta interacción del retículo endoplasmático con la mitocondria es de gran importancia para el papel del Ca^{+2} como mensajero intracelular (Pizzo y cols., 2007) y explicaría la implicación del retículo endoplasmático en la liberación del Ca^{+} al citosol a través de una señalización iniciada en la mitocondria a causa de la terfenadina.

Además, la rotenona induce autofagia (Dadakhujayev y cols., 2010; Xiong y cols., 2013), al igual que hemos demostrado que la autofagia es un mecanismo que participa activamente desde las primeras horas del tratamiento con terfenadina, posiblemente desencadenada por el estrés reticular.

En resumen, hemos demostrado que la terfenadina actúa como potente agente antitumoral en diferentes estirpes tumorales y que inhibe el complejo I mitocondrial. A partir de aquí, y con los datos obtenidos en este trabajo y en otros previos, estamos en condiciones de elaborar un modelo que explica los procesos desencadenados. Así, la inhibición del complejo I mitocondrial induce un aumento de la producción de ROS dando lugar a un estrés oxidativo, lo que provoca un estrés reticular y liberación de calcio al citosol. La célula ante este estrés reticular y la falta de energía derivada de la inhibición de la CTE, activa el mecanismo de autofagia, que favorece el proceso de muerte celular. El aumento de calcio intracelular puede inducir también daño en el ADN provocando lesiones irreparables, lo que activa la vía ATM-p73 y provoca la muerte celular por apoptosis tras la activación de las caspasas -2 y -4 (Jangi y cols., 2008).

Existen diferentes moléculas, además de la rotenona, que actúan inhibiendo la cadena respiratoria mitocondrial (figura 53). Está descrito que los inhibidores del complejo I mitocondrial poseen propiedades antitumorales, como por ejemplo las acetogeninas, entre las que destacan el rollinistatin y bullatacin; las biguanidas, la metformina y la fenformina; y la rotenona (Pathania y cols., 2009; Palorini y cols., 2013; Vatrinet y cols., 2015).

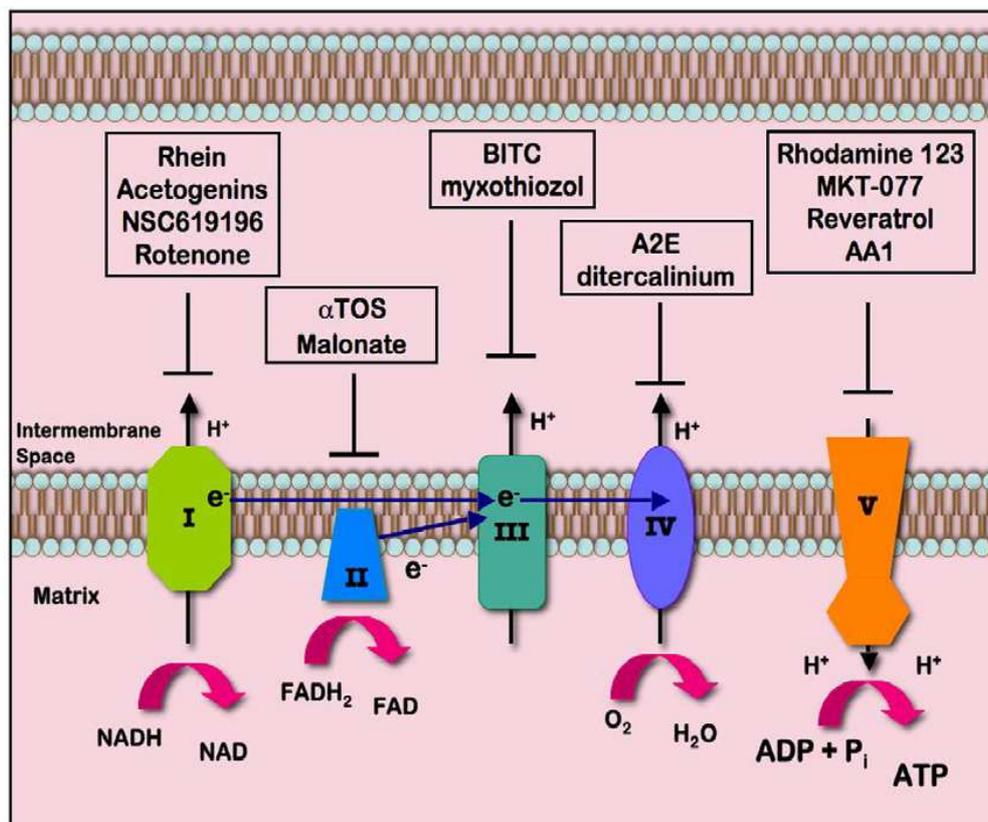


Figura 53. Esquema representativo del efecto inhibitor de algunos fármacos sobre la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Los electrones entran en la cadena de transporte de electrones a través de los complejos I y II en forma de NADH y $FADH_2$, respectivamente. En el proceso, los complejos I, III y IV bombean los protones a través de la membrana mitocondrial interna. La acumulación de protones en el espacio intermembrana crea un gradiente de carga que es utilizado por complejo V (ATP sintasa) para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i . Los inhibidores específicos de la maquinaria de la fosforilación oxidativa se muestran en negrita (Pathania y cols., 2009).

Hay autores que señalan al complejo I mitocondrial como diana de muerte. Por ello se propone como tratamiento antitumoral adyuvante varios de los fármacos citados anteriormente que inciden a nivel mitocondrial, en combinación con fármacos anti-proliferativos y anti-glicolíticos (Vatrinet y cols., 2015). Sin embargo, pocos estudios han aportado hasta el momento resultados significativos *in vitro* e *in vivo*.

Estudios previos de nuestro grupo han demostrado la efectividad de la terfenadina *in vivo*. Concretamente demostramos que el tratamiento con terfenadina de los ratones atímicos a los que previamente se les inocularon células

de melanoma humano, redujo muy significativamente el tamaño de la masa tumoral (Blaya y cols., 2010). Sin embargo, los resultados de esta tesis apuntan a que el principal metabolito de la terfenadina, la fexofenadina, no tiene un efecto antitumoral *in vitro* y por lo tanto, su efecto *in vivo* es poco probable. Por ello, los efectos de la terfenadina observados *in vivo* deben ser necesariamente consecuencia de su acción directa sobre el tumor, previa a su transformación a fexofenadina en el hígado. En este sentido, los experimentos que se llevaron a cabo en el grupo incorporaban una bomba osmótica subcutánea que cada 12 horas inyectaba directamente sobre el tumor las dosis efectivas de terfenadina, lo que explica el éxito de los experimentos.

Estos estudios *in vivo*, junto con todos los mecanismos moleculares demostrados *in vitro* en diferentes líneas tumorales humanas, sugieren el uso de la terfenadina como agente antitumoral la cual podría constituir una nueva herramienta para el tratamiento del cáncer.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento con terfenadina induce una disminución significativa de la viabilidad celular de las líneas tumorales humanas de melanoma, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama y neuroblastoma. Las líneas de melanoma son más sensibles al tratamiento con terfenadina, ya que sus IC_{50} son cercanos a $10 \mu M$, mientras que en las demás líneas tumorales los valores de IC_{50} oscilan entre $15-20 \mu M$.
2. La fexofenadina, metabolito activo de la terfenadina, no produce ningún efecto en la viabilidad celular a ninguna de las dosis testadas en las líneas de melanoma, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama y neuroblastoma, resultando inocua para todas ellas. Este hecho sugiere que el efecto citotóxico se debe exclusivamente a la molécula de la terfenadina.
3. La terfenadina induce apoptosis y autofagia de manera simultánea en las líneas de melanoma, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de mama y neuroblastoma.
4. La terfenadina produce un incremento de calcio citosólico, daños en el ADN, activación de la ruta ATM-p53/p73 y desencadena la apoptosis a través de la ruta mitocondrial.
5. La muerte celular inducida por terfenadina es independiente de la ruta de la histamina.
6. La diana molecular de la terfenadina a través de la cual ejerce su efecto antitumoral es el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. La terfenadina se une e inhibe el complejo I mitocondrial.

BIBLIOGRAFÍA

- AAACR Cancer Progress Report 2011; American Cancer Society
- AAACR Cancer Progress Report 2013; American Cancer Society
- Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003; 17(20):2481-95
- AECC Asociación Española Contra el Cáncer 2014; www.aecc.es
- Airley R. Cancer chemotherapy. Wiley-Blackwell. 2009
- Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br J Pharmacol* 2008; 153 (Suppl 2):S1-209
- Almeida A, Bolaños JP. A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem.* 2001;77(2):676-90
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996; 87(2):171
- Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med.* 2010; 9(45):145-52
- Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 1983; 302:832-7
- Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature.* 2003; 421(6922):499-506
- Bartholeyns J, Fozard JR. Role of histamine in tumor development. *Trends Pharmacol Sci* 1985; 7:123
- Beutler B, Cerami A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320: 584-588
- Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 189-210
- Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. Definition and antagonism of histamine H2 -receptors. *Nature* 1972; 236(5347):385-90
- Blanco MD, Guerrero S, Benito M, Teijón C, Olmo R, Muñiz E, Katime I, Teijón JM. Tamoxifen-loaded folate-conjugate poly[(p-nitrophenyl acrylate)-co-(N-isopropylacrylamide)] sub-microgel as antitumoral drug delivery system. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 95(4):1028-40

- Blaya B, Nicolau-Galmés F, Jangi SM, Ortega-Martínez I, Alonso-Tejerina E, Burgos-Bretones J, Pérez-Yarza G, Asumendi A, Boyano MD. Histamine and histamine receptor antagonists in cancer biology. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2010; 9(3):146-57
- Boland ML, Chourasia AH, Macleod KF. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Front Oncol*. 2013 Dec 2; 3:292
- Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D. Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem*. 1995; 270(1):387-91
- Bonaventure P, Letavic M, Dugovic C, Wilson S, Aluisio L, Pudiak C, Lord B, Mazur C, Kamme F, Nishino S, Carruthers N, Lovenberg T. Histamine H3 receptor antagonists: from target identification to drug leads. *Biochem Pharmacol*. 2007; 73(8):1084-96
- Bossy-Wetzell E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J*. 1998; 17(1):37-49
- Brune M, Castaigne S, Catalano J, Gehlsen K, Ho AD, Hofmann WK, Hogge DE, Nilsson B, Or R, Romero AI, Rowe JM, Simonsson B, Spearing R, Stadtmauer EA, Szer J, Wallhult E, Hellstrand K. Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia: results of a randomized phase 3 trial. *Blood*. 2006 Jul 1; 108(1):88-96
- Brunner T, Yoo NJ, LaFace D, Ware CF, Green DR. Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. *Int Immunol* 1996; 8: 1017-1026
- Camelo-Nunes IC. New antihistamines: a critical view. *J Pediatr (Rio J)*. 2006; 82(5 Suppl):S173-80
- Cantarella G, Di Benedetto G, Ribatti D, Sacconi-Jotti G, Bernardini R. Involvement of caspase 8 and c-FLIPL in the proangiogenic effects of the tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *FEBS J*. 2014; 281(5):1505-13
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 3666-3670
- Cascón A. Bases genéticas de la susceptibilidad al cáncer. En Bandrés F y Urioste M: "Planteamientos básicos del cáncer hereditario: Pries síndromes", Fundación Tejerina: Madrid, 2011; 15-26

- Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, Letai A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 2006; 9: 351-365
- Chial, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education*. 2008. 1(1):33
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. 2010; 37(3):299-310
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 151: 10-27
- Cianchi F, Cortesini C, Schiavone N, Perna F, Magnelli L, Fanti E, Bani D, Messerini L, Fabbroni V, Perigli G, Capaccioli S, Masini E. The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(19 Pt 1):6807-15
- Clark MA, Korte A, Egan RW. Guanine nucleotides and pertussis toxin reduce the affinity of histamine H3 receptors on AtT-20 cells. *Agents Actions* 1993; 40:129-34
- Clark WH. Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer*. 1991; 64(4):631-44
- Corrie PG. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine* 2011; 39(12):717-722
- Cortes M, Hirsch B, de la Maza C. The importance of folic acid in present medicine. *Rev. méd. Chile*. 2000; 128 (2)
- Cortes R, Probst A, Palacios JM. Quantitative light microscopic autoradiographic localization of cholinergic muscarinic receptors in the human brain: brainstem. *Neuroscience* 1984; 12(4):1003-26
- Coruzzi G, Morini G, Adami M, Grandi D. Role of histamine H3 receptors in the regulation of gastric functions. *J Physiol Pharmacol* 2001; 52:539-53
- Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002 Sep; 2(9):647-56
- Creus N, Massó J, Codina C, Ribas J. Anticuerpos monoclonales en Oncología. *Farmacia Hosp*. 2002; 26 (1): 28-43
- Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart CL, Olson MF. Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol*. 2005; 168 (2):245-55.
- Dadakujaev S, Noh HS, Jung EJ, Cha JY, Baek SM, Ha JH, Kim DR. Autophagy protects the rotenone-induced cell death in alpha-synuclein overexpressing SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*. 2010; 472(1):47-52

- Davio C, Cricco GP, Andrade N, Bergoc RM, Rivera ES. H1 and H2 histamine receptors in human mammary carcinomas. *Agents Actions* 1993; 38: 172-4
- Davio C, Madlovan A, Shayo C, Lemos B, Baldi A, Rivera E. Histamine receptors in neoplastic transformation. *Studies in human cell lines. Inflamm Res* 1996; 45: 62-3
- de Groot MW, Westerink RH. Chemically-induced oxidative stress increases the vulnerability of PC12 cells to rotenone-induced toxicity. *Neurotoxicology*. 2014; 43:102-9
- Debnath J. The multifaceted roles of autophagy in tumors-implications for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2011; 16(3):173-87
- Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239-252
- Dillman RO. Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2011; 26(1):1-64
- Ding WX, Ni HM, Gao W, Hou YF, Melan MA, Chen X, Stolz DB, Shao ZM, Yin XM. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem*. 2007; 282(7):4702-10
- Dolderer JH, Schuldes H, Bockhorn H, Altmannsberger M, Lambers C, von Zabern D, Jonas D, Schwegler H, Linke R, Schröder UH. HERG1 gene expression as a specific tumor marker in colorectal tissues. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36:72-77
- Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, et al. Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol* 2001; 59:1-8
- Edelstein J, Hao T, Cao Q, Morales L, Rockwell P. Crosstalk between VEGFR2 and muscarinic receptors regulates the mTOR pathway in serum starved SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Cell Signal*. 2011; 23(1):239-48
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*. 2009; 16(7):966-75
- El-Deiry, WS, Tokino, T, Velculescu, VE, Levy, DB, Parsons, R, Trent, JM, Lin, D, Mercer, WE, Kinzler, KW, Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75, 4:817-25
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4):495-516
- Engel N, Cricco G, Davio C, Martin G, Croci M, Fitzsimons C, Bergoc R, Rivera E. Histamine regulates the expression of histidine decarboxylase in N-nitroso-N-methylurea (NMU)-induced mammary tumors in rats. *Inflamm Res*. 1996; 45 Suppl 1:S64-5
- Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998; 281(5381):1317-22

- Fahraeus R. Do peptides control their own birth and death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(3):263-7
- Falus A, Hegyesi H, Lázár-Molnár E, Pócs Z, László V, Darvas Z. Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends Immunol.* 2001; 22(12):648-52
- Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, Piredda L. Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy.* 2008; 4(4):435-41
- Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet.* 2012; 13(2): 97-109
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. GLOBOCAN 2012; 1
- Flaherty KT. Next generation therapies change the landscape in melanoma. *F1000 Med Rep.* 2011; 3:8
- Francis H, DeMorrow S, Venter J, Onori P, White M, Gaudio E, Francis T, Greene JF Jr, Tran S, Meiningner CJ, Alpini G. Inhibition of histidine decarboxylase ablates the autocrine tumorigenic effects of histamine in human cholangiocarcinoma. *Gut.* 2012;61(5):753-64
- Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012; 19(1):107-20
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007; 14(7):1237-43
- Garcia-Caballero M, Neugebauer E, Rodriguez F, Nuñez de Castro I, Vara-Thorbeck C. Histamine synthesis and content in benign and malignant breast tumours. Its effects on other host tissues. *Surg Oncol.* 1994; 3(3):167-73
- González MA, Estes KS. Pharmacokinetic overview of oral second-generation H1 antihistamines. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998; 36(5):292-300
- Goswami P, Gupta S, Biswas J, Joshi N, Swarnkar S, Nath C, Singh S. Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Key Role in Rotenone-Induced Apoptotic Death of Neurons. *Mol Neurobiol.* 2014

- Goto T, Ishizaka A, Kobayashi F, Kohno M, Sawafuji M, Tasaka S, Ikeda E, Okada Y, Maruyama I, Kobayashi K. Importance of tumor necrosis factor- α cleavage process in post-transplantation lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1239-1246
- Grandér D, Kharaziha P, Laane E, Pokrovskaja K, Panaretakis T. Autophagy as the main means of cytotoxicity by glucocorticoids in hematological malignancies. *Autophagy*. 2009; 5(8):1198-200
- Greenamyre JT, Higgins DS, Eller RV. Quantitative autoradiography of dihydrorotenone binding to complex I of the electron transport chain. *J Neurochem*. 1992; 59(2):746-9
- Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, Eisenberg-Lerner A, Shohat G, Zhang M, Laudet V y cols. The dependence receptor UNC5H2/B triggers apoptosis via PP2A-mediated dephosphorylation of DAP kinase. *Mol Cell* 2010; 40: 863-876
- Haas H, Panula P. The role of histamine and the tuberomamillary nucleus in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4:121-30
- Hadzijasufovic E, Peter B, Gleixner KV, Schuch K, Pickl WF, Thaiwong T, Yuzbasiyan-Gurkan V, Mirkina I, Willmann M, Valent P. H1-receptor antagonists terfenadine and loratadine inhibit spontaneous growth of neoplastic mast cells. *Exp Hematol*. 2010; 38(10):896-907
- Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. 2010; 35:505-513
- Hamasaki M, Yoshimori T. Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS Lett*. 2010 Apr 2; 584(7):1296-301. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.061
- Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *New England Journal of Medicine* 1999; 340(2):77-84
- Helt CE, Cliby WA, Keng PC, Bambara RA, O'Reilly MA. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J Biol Chem*. 2005; 280(2):1186-92
- Higgins DS Jr, Greenamyre JT. [3 H]dihydrorotenone binding to NADH: ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain: an autoradiographic study. *J Neurosci*. 1996; 16(12):3807-16
- Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 354-359
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, et al. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 1997; 49:253-78

- Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 2000; 103: 839-842
- Imamura M, Seyedi N, Lander HM, Levi R. Functional identification of histamine H3-receptors in the human heart. *Circ Res* 1995; 77:206-10
- Jangi SM, Asumendi A, Arlucea J, Nieto N, Perez-Yarza G, Morales MC, de la Fuente-Pinedo M, Boyano MD. Apoptosis of human T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by diphenhydramine, an H1 histamine receptor antagonist. *Oncol Res.* 2004; 14(7-8):363-72
- Jangi SM, Díaz-Pérez JL, Ochoa-Lizarralde B, Martín-Ruiz I, Asumendi A, Pérez-Yarza G, Gardeazabal J, Díaz-Ramón JL, Boyano MD. H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Carcinogenesis.* 2006; 27(9):1787-96
- Jangi SM, Ruiz-Larrea MB, Nicolau-Galmés F, Andollo N, Arroyo-Berdugo Y, Ortega-Martínez I, Díaz-Pérez JL, Boyano MD. Terfenadine-induced apoptosis in human melanoma cells is mediated through Ca²⁺ homeostasis modulation and tyrosine kinase activity, independently of H1 histamine receptors. *Carcinogenesis* 2008; 29: 500-509
- Janssen, A.J., Trijbels, F.J., Sengers, R.C., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., Wintjes, L.T., Stoltenborg-Hogenkamp, B.J., Rodenburg, R.J. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clinical Chemistry.*2007; 53:729-34
- Jehle J, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. Novel roles for hERG K(+) channels in cell proliferation and apoptosis. *Cell Death Dis.* 2011; 2:e193
- Jutel M, Akdis M, Akdis CA. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy.* 2009; 39(12):1786-800
- Kastan MB, Lim DS. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000; 1(3):179-86
- Kastan MB, Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research* 1991; 51: 6304-6311
- Kaufman RJ, Malhotra JD. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(10):2233-9
- Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* 2004; 14(5):359-72
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 1995; 14(22):5579-88

- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012; 8(4):445-544
- Köchl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*. 2006; 7(2):129-45
- Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*. 1992; 80(4):879-86
- Kozlov SV, Graham ME, Peng C, Chen P, Robinson PJ, Lavin MF. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J*. 2006; 25(15):3504-14
- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2005; 12 Suppl 2:1463-7
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007; 87(1):99-163
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G; Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009; 16(1):3-11
- Kvansakul M, Yang H, Fairlie WD, Czabotar PE, Fischer SF, Perugini MA, Huang DC, Colman PM. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1564-1571
- Laane E, Tamm KP, Buentke E, Ito K, Kharaziha P, Oscarsson J, Corcoran M, Björklund AC, Hulténby K, Lundin J, Heyman M, Söderhäll S, Mazur J, Porwit A, Pandolfi PP, Zhivotovsky B, Panaretakis T, Grandér D. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differ*. 2009; 16(7):1018-29
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-5
- Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16
- Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997; 29(12):1305-12
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 2005a; 118: 265-267

- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005b; 115: 2665-2672
- Lemos B, Davio C, Gass H, Gonzales P, Cricco G, Martín G, Bergoc R, Rivera E. Histamine receptors in human mammary gland, different benign lesions and mammary carcinomas. *Inflamm Res* 1995; 44:68-9
- Leurs R, Smit MJ, Timmerman H. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* 1995; 66:413-63
- Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331
- Leverro M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* 2000; 113(10):1661-70
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003; 278(10):8516-25
- Libermann TA, Zerbini LF. Targeting transcription factors for cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2006; 6(1):17-33
- Ling P, Ngo K, Nguyen S, Thurmond RL, Edwards JP, Karlsson L, Fung-Leung WP. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol* 2004; 142(1): 161-171
- Linzer, DI, Levine, AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17, 1:43-52
- Lippert U, Artuc M, Grützkau A, Babina M, Guhl S, Haase I, Blaschke V, Zachmann K, Knosalla M, Middel P, Krüger-Krasagakis S, Henz BM. Human skin mast cells express H2 and H4, but not H3 receptors. *J Invest Dermatol*. 2004; 123(1):116-23
- Liu C, Ma X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N, Lovenberg TW. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor [H(4)] expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* 2001; 59 (3): 420-426
- Liu JD, Wang YJ, Chen CH, Yu CF, Chen LC, Lin JK, Liang YC, Lin SY, Ho YS. Molecular mechanisms of G0/G1 cell-cycle arrest and apoptosis induced by terfenadine in human cancer cells. *Mol Carcinog*. 2003; 37(1):39-50
- Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. Vaccines for tumour prevention. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6(3):204-216
- Lowell Strayer D; Rubin R; Rubin, Emanuel. Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. 2008; 138-139

- Lupescu A, Jilani K, Zbidah M, Lang F. Induction of apoptotic erythrocyte death by rotenone. *Toxicology*. 2012; 300(3):132-7
- Mace PD, Shirley S, Day CL. Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ* 2010; 17: 46-53
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 741-752
- Mallilankaraman K, Cárdenas C, Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golenár T, Csordás G, Madireddi P, Yang J, Müller M, Miller R, Kolesar JE, Molgó J, Kaufman B, Hajnóczky G, Foskett JK, Madesh M. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 2012; 14(12):1336-43
- Mallilankaraman K, Doonan P, Cárdenas C, Chandramoorthy HC, Müller M, Miller R, Hoffman NE, Gandhirajan RK, Molgó J, Birnbaum MJ, Rothberg BS, Mak DO, Foskett JK, Madesh M. MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca⁽²⁺⁾ uptake that regulates cell survival. *Cell*. 2012; 151(3):630-44
- Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, Monle n I, Lasierra P, Larrad L, Pineiro A, Alava MA, Naval J. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 1999; 163: 1274-1281
- Masini E, Fabbroni V, Giannini L, Vannacci A, Messerini L, Perna F, Cortesini C, Cianchi F. Histamine and histidine decarboxylase up-regulation in colorectal cancer: correlation with tumor stage. *Inflamm Res* 2005; 54(1):80-1
- Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br J Pharmacol*. 2010; 161(4):755-67
- Medina V, Cricco G, Nuñez M, Martin G, Mohamad N, Correa-Fiz F, Sanchez-Jimenez F, Bergoc R, Rivera ES. Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. *Cancer Biol Ther* 2006; 5(11): 1462-1571
- Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal* 2011; 4: mr2
- Michels J, Johnson PW, Packham G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 267-271
- Mikhailov V, Mikhailova M, Pulkrabek DJ, Dong Z, Venkatachalam MA, Saikumar P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*. 2001; 276(21):18361-74
- Mille F, Thibert C, Fombonne J, Rama N, Guix C, Hayashi H, Corset V, Reed JC, Mehlen P. The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 739-746
- Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death and Differentiation* 2005; 12:1535-1541

- Molina-Hernandez A, Nunez A, Sierra JJ, Arias-Montano JA. Histamine H3 receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 2001; 41:928-34
- Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, Pineiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J y cols. Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* 2001; 167: 6736-6744
- Montes J., Flores J., Alfonso Barrón E. Histamina, receptores y antagonistas. *Rev Med Hosp Gen Mex* 2005; 68 (3): 164-169
- Mordier S, Deval C, Béchet D, Tassa A, Ferrara M. Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem.* 2000; 275(38):29900-6
- Morisset S, Rouleau A, Ligneau X, Gbahou F, Tardivel-Lacombe J, Stark H, et al. High constitutive activity of native H3 receptors regulates histamine neurons in brain. *Nature* 2000; 408:860-4
- Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC, Kroemer G. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793(9):1524-32
- Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279 (2): 615-620
- N.C.I., National Cancer Institute 2008; <http://www.cancer.gov/>
- Nencioni A, Cea M, Montecucco F, Longo VD, Patrone F, Carella AM, Holyoake TL, Helgason GV. Autophagy in blood cancers: biological role and therapeutic implications. *Haematologica.* 2013; 98(9):1335-43
- Nicolau-Galmés F, Asumendi A, Alonso-Tejerina E, Pérez-Yarza G, Jangi SM, Gardeazabal J, Arroyo-Berdugo Y, Careaga JM, Díaz-Ramón JL, Apraiz A, Boyano MD. Terfenadine induces apoptosis and autophagy in melanoma cells through ROS-dependent and -independent mechanisms. *Apoptosis.* 2011; 16(12):1253-67
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000; 288(5468):1053-8
- Oike M, Kitamura K, Kuriyama H. Histamine H3-receptor activation augments voltage-dependent Ca²⁺ current via GTP hydrolysis in rabbit saphenous artery. *J Physiol* 1992; 448:133-52

- Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K. Recent advances in Molecular Pharmacology of the Histamine Systems: Organic Cation Transporters as a Histamine Transporter and Histamine metabolism. *J Pharmacol Sci* 2006; 101: 24-30
- Olasínska-Wisniewska A, Olasiński J, Grajek S. Cardiovascular safety of antihistamines. *Postepy Dermatol Alergol.* 2014; 31(3):182-6
- Olsson A, Manzl C, Strasser A, Villunger A. How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2007; 14(9):1561-75
- O.M.S., Organización Mundial de la Salud 2012; <http://www.who.int/es/>
- Ortega-Camarillo C, Díaz-Flores M, Avalos-Rodríguez A, Vergara-Onofre M, Rosales-Torres AM. Apoptosis and its biomedical significance. *Gac Med Mex.* 2001; 137(6):563-77
- Ortiz-Melón JM. Proteínas quinasas como dianas farmacológicas. Monografía XXIV. Redes de señalización y estrategias terapéuticas 2009. Real Academia Nacional de Farmacia.
- Oztürk S, Schleich K, Lavrik IN. Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs): fine-tuners of life and death decisions. *Exp Cell Res.* 2012; 318(11):1324-31
- Pal R, Monroe TO, Palmieri M, Sardiello M, Rodney GG. Rotenone induces neurotoxicity through Rac1-dependent activation of NADPH oxidase in SHSY-5Y cells. *FEBS Lett.* 2014; 588(3):472-81
- Palorini R, Simonetto T, Cirulli C, Chiaradonna F. Mitochondrial complex I inhibitors and forced oxidative phosphorylation synergize in inducing cancer cell death. *Int J Cell Biol.* 2013; 2013:243876
- Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, Greenamyre JT. Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem.* 2005; 280(51):42026-35
- Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol.* 2007; 178(4):1975-9
- Parsons ME, Ganellin CR. Histamine and its receptors. *Brit J Pharmacol* 2006; 147: 127-135
- Pathania D, Millard M, Neamati N. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61(14):1250-75
- Perez-Vizcaino F, Casis O, Rodriguez R, Gomez LA, Garcia Rafanell J, Tamargo J. Effects of the novel potassium channel opener, UR-8225, on contractile responses in rat isolated smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1993; 110(3):1165-71
- Pazos A. Mediadores celulares I. Histamina y 5-hidroxitriptamina. *Farmacología de la migraña. Farmacología humana*, 3ªed. Masson-Salvat. 1997; 19: 305-325

- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996; 271: 12687-12690
- Pizzo P, Pozzan T. Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(10):511-7
- Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* 2014; 4C:184-192
- Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6(2):99-104
- Pós Z, Müller K, Novalphak I, Buzás E, Solbach W, Falus A, Laskay T. Different patterns of the L-histidine decarboxylase (HDC) gene expression in mice resistant and susceptible to experimental cutaneous leishmaniasis. *Inflamm Res.* 2004; 53(1):38-43
- Pratt C, Brown AM, Rampe D, Mason J, Russell T, Reynolds R, Ahlbrandt R. Cardiovascular safety of fexofenadine HCl. *Clin Exp Allergy.* 1999; 29 Suppl 3:212-6
- Prell GD, Hough LB, Khandelwal J, Green JP. Lack of a precursor-product relationship between histamine and its metabolites in brain after histidine loading. *J Neurochem* 1996; 67:1938-44
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell.* 2007; 128(5):931-46
- Ramos-Jiménez J, Garduño-Torres B, Arias-Montaña JA. Histamina y comunicación intercelular: 99 años de historia. *Rev Biomed* 2009; 20:100-126
- Rasola A, Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007; 12: 815-833
- Rettew AN, Getty PJ, Greenfield EM. Receptor tyrosine kinases in osteosarcoma: not just the usual suspects. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 804:47-66
- Rivera ES, Cricco GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martín GA, Bergoc RM. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin Cancer Biol.* 2000; 10(1):15-23
- Robles, AI, Bemmels, NA, Foraker, AB, Harris, CC. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2001; 61,18:6660-4
- Rodríguez-Puertas R, Pascual J, Vilaró T, Pazos A. Autoradiographic distribution of M1, M2, M3, and M4 muscarinic receptor subtypes in Alzheimer's disease. *Synapse.* 1997; 26(4):341-50

- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem.* 2000; 275(13):9390-5
- Ross HM, Mahmoud N, Fry RD. The current management of rectal cancer. *Curr Probl Surg.* 2005; 42(2):72-131
- Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med.* 2006; 12(9):440-50
- Rotter V, Aloni-Grinstein R, Schwartz D, Elkind NB, Simons A, Wolkowicz R, Lavigne M, Beserman P, Kapon A, Goldfinger N. Does wild-type p53 play a role in normal cell differentiation? *Semin Cancer Biol.* 1994; 5(3):229-36
- Rouleau A, Ligneau X, Tardivel-Lacombe J, Morisset S, Gbahou F, Schwartz JC, et al. Histamine H3-receptor-mediated [³⁵S]GTP gamma[S] binding: evidence for constitutive activity of the recombinant and native rat and human H3 receptors. *Br J Pharmacol* 2002; 135:383-92
- Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 1997; 16(23):6914-25
- Rupinder SK, Gurpreet AK, Manjeet S. Cell suicide and caspases. *Vascul Pharmacol* 2007; 46: 383-393
- Rybalka E, Timpani CA, Cooke MB1, Williams AD, Hayes A. Defects in mitochondrial ATP synthesis in dystrophin-deficient mdx skeletal muscles may be caused by complex I insufficiency. *PLoS One.* 2014; 9(12):e115763
- Salama M, El-Morsy D, El-Gamal M, Shabka O, Mohamed WM. Mitochondrial complex I inhibition as a possible mechanism of chlorpyrifos induced neurotoxicity. *Ann Neurosci.* 2014; 21(3):85-9
- Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature.* 2006; 440(7083):463-9
- Sarnow P., Ho Y.S., Williams J., Levine A.J. Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 1982; 28: 387-394
- Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovács-Bogdán E, Kamer KJ, Udeshi ND, Carr SA, Chaudhuri D, Clapham DE, Li AA, Calvo SE, Goldberger O, Mootha VK. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science.* 2013; 342(6164):1379-82
- Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A, Esumi H. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res.* 2007; 67(20):9677-84

- Schlom J, Arlen PM, Gulley JL. Cancer vaccines: moving beyond current paradigms. *Clinical Cancer Research* 2007; 13(13):3776-3782
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2007; 8(6):377-97
- Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*. 2006; 10:175-176
- Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 655-662
- Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 1973 ; 7(3):253-66
- Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012; 48:158-167
- Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell*. 2004; 116(2):235-46
- Shibue T, Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* 2006; 119: 2036-2043
- Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 308-317
- Sieja K, Stanosz S, von Mach-Szczypiński J, Olewniczak S, Stanosz M. Concentration of histamine in serum and tissues of the primary ductal breast cancers in women. *Breast* 2005; 14(3): 236-41
- Staudacher I, Jehle J, Staudacher K, Pledl HW, Lemke D, Schweizer PA, Becker R, Katus HA, Thomas D. HERG K⁺ channel-dependent apoptosis and cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *PLoS One*. 2014; 9(2):e88164
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 2000; 69:217-45
- Stratton MR. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science*. 2011; 331(6024):1553-8
- Suzuki K, Ohsumi Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 2007; 581(11):2156-61
- Swarnkar S, Goswami P, Kamat PK, Gupta S, Patro IK, Singh S, Nath C. Rotenone-induced apoptosis and role of calcium: a study on Neuro-2a cells. *Arch Toxicol*. 2012; 86(9):1387-97
- Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 621-632

- Tanaka, H, Arakawa, H, Yamaguchi, T, Shiraishi, K, Fukuda, S, Matsui, K, Takei, Y, Nakamura, Y. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 2000; 404, 6773:42-9
- Todd R, Wong DT. *Oncogenes. Anticancer Res.* 1999; 19(6A):4729-46
- U S Food and Drug Administration; <http://www.fda.gov/>
- U.S. National Cancer Institute 2014; www.cancer.gov
- Vatrinet R, Iommarini L, Kurelac I, De Luise M, Gasparre G, Porcelli AM. Mitochondria: Targeting respiratory complex I to prevent the Warburg effect. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015; S1357-2725(15)00027-8
- Vergote IB, Marth C, Coleman RL. Role of the folate receptor in ovarian cancer treatment: evidence, mechanism, and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev.* 2015
- Vinothkumar KR, Zhu J, Hirst J. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature.* 2014; 515(7525):80-4
- Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.* 2002; 296(5573):1635-6
- Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98:13884-13888
- Wang WT, Chen YH, Hsu JL, Leu WJ, Yu CC, Chan SH, Ho YF, Hsu LC, Guh JH. Terfenadine induces anti-proliferative and apoptotic activities in human hormone-refractory prostate cancer through histamine receptor-independent Mcl-1 cleavage and Bak up-regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014; 387(1):33-45
- Wang YJ, Yu CF, Chen LC, Chen CH, Lin JK, Liang YC, Lin CH, Lin SY, Chen CF, Ho YS. Ketoconazole potentiates terfenadine-induced apoptosis in human Hep G2 cells through inhibition of cytochrome p450 3A4 activity. *J Cell Biochem.* 2002; 87(2):147-59
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292:727-730
- Weiss SW, Goldblum JR. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumours.* 4th ed. St Louis: Mosby; 2001; 571-694
- Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79
- Wheaton WW, Chandel NS. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 300:C385-393

- Wieland K, Bongers G, Yamamoto Y, Hashimoto T, Yamatodani A, Menge WM, et al. Constitutive activity of histamine H3 receptors stably expressed in SK-N-MC cells: display of agonism and inverse agonism by H3 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:908-14
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA y cols. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995; 3: 673-682
- Willis SN, Adams JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 617-625
- Wong-Riley, M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Research*.1979; 171:11-28
- www.deficitdao.org
- Xiong N, Xiong J, Jia M, Liu L, Zhang X, Chen Z, Huang J, Zhang Z, Hou L, Luo Z, Ghoorah D, Lin Z, Wang T. The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. *Behav Brain Funct*. 2013; 9:13
- Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-704
- Yasuda SU, Yasuda RP. Affinities of brompheniramine, chlorpheniramine, and terfenadine at the five human muscarinic cholinergic receptor subtypes. *Pharmacotherapy*. 1999; 19(4):447-51
- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(1):47-59
- Yuan YH, Yan WF, Sun JD, Huang JY, Mu Z, Chen NH. The molecular mechanism of rotenone-induced α -synuclein aggregation: Emphasizing the role of the calcium/GSK3 β pathway. *Toxicol Lett*. 2014
- Zhang M, Thurmond RL, Dunford PJ. The histamine H4 receptor: A novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharmacol Therapeut*. 2007; 113: 594-606
- Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000; 408(6811):433-9
- Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci*. 2004; 19:124-8

