

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CC. QUÍMICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTITUMORALES  
DEL LAURIL-GALATO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR Eva Ortega Paíno**

Bajo la dirección del Doctor:  
Pedro González Porqué

**Madrid, 2002**

**ISBN: 84-669-1838-8**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Universidad Complutense de Madrid  
Facultad de Ciencias Químicas

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTITUMORALES DEL LAURIL  
GALATO: Mecanismos de inducción de apoptosis sobre células Wehi 231 en  
cultivo y efecto sobre el crecimiento y regresión de tumores inducidos  
químicamente en ratones.**

Memoria que para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas presenta la  
licenciada:  
Eva Ortega Paíno

Director: Dr. Pedro González Porqué  
Tutor: Dr. Fernando Vivanco Martínez

Servicio de Inmunología  
Hospital Ramón y Cajal  
Madrid, 2002

*“Como químico iba en la búsqueda de lo pequeño cuando descubrí lo más grande, los animales”*

*E.O.Paíno*

A mis padres

A David

A la memoria de Mayte

**AGRADECIMIENTOS**

## *Agradecimientos*

---

---

*No sé por dónde empezar a dar gracias a tantas y tantas personas que han hecho directa o indirectamente que este trabajo haya sido posible. No sólo a nivel personal, sino también a nivel profesional he tenido ayuda para que el sueño que tenía desde niña se haya podido cumplir. En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Antonio Rocamora por ayudarme con los estudios anatomopatológicos y al Dr. Jesús Sanz por la realización de la espectrometría de masas. También quiero dar las gracias a mi tutor, Fernando Vivanco que ha estado ahí siempre que le he necesitado, facilitándome la subida para llegar al final de esta cuesta.*

*No hay que decir que una de las personas a la que casi le debo todo es al Dr. Bootello. Gracias a él tuve la posibilidad de realizar lo que siempre quise. Siempre he tenido su apoyo e incluso la mayoría de las veces he sentido que a su lado tenía más a un amigo que a un jefe. Él me tendió su mano para entrar en el laboratorio en el que me encontré con montones de personas que me ayudaron incondicionalmente y que luego me dieron su amistad. La otra persona a la que le debo esto y muchas otras cosas más es a Pedro. Es muy difícil resumir en unas líneas qué clase de persona es. No sólo científicamente es la persona más brillante que he conocido, sino personalmente sus cualidades humanas sobrepasan con gran diferencia a las de la mayoría de la gente que me he encontrado durante parte del camino de mi vida. Gracias Pedro por compartir conmigo todo lo que sabes, y por hacerme sentir que a tu lado tenía a un cómplice, a un fantástico maestro más que al típico jefe que el resto de la humanidad critica. Con haber aprendido el 10% de tus conocimientos ya me siento satisfecha.*

*Dentro de las personas que me encontré en ese laboratorio quiero agradecer a Menchu y a Antonio Serrano que me enseñaran a dar los primeros pasos entre probetas y pipetas. A nivel más personal, además de científico, quiero dar las gracias a una persona muy especial para mí. A él le debo prácticamente todo dentro de mi formación y necesitaría más que esta tesis para enumerarlo. Un millón de gracias Tino por enseñarme tantas y tantas cosas, y muy especialmente por la paciencia que derrochaste en mí. Gracias por tus consejos, y sobre todo por darme el mejor de todos ellos. Ahora sé que “las cosas se deben hacer con cariño”. En el mismo laboratorio tengo que hacer una especial mención a mi compañero favorito, a mi amigo, a la persona con la que he compartido tantísimos buenos momentos. Gracias Jose por ser como eres, por hacer que el trabajo día tras día fuera un placer más que una cuesta, hasta llegar aquí. También quiero agradecer a Mai su ayuda sin peros, a Elena su complicidad, a Chelo los agradabilísimos momentos de risas entre experimento y experimento, y a Cruz (“Paz”) los momentos más dulces en el animalario. No te preocupes Cruz, que tú siempre serás la primera en ir al programa de Lorenzo Milá.*

## *Agradecimientos*

---

---

*Para cualquier persona que haya seguido de cerca este trabajo no hará falta decir que el agradecimiento más sincero es para “Lolín”. Gracias Manuel, te debo muchísimo. Sin tí y sin Garbi casi hubiese sido imposible realizar esta tesis.*

*Dentro de la sección de Celular me gustaría hacer un alto para agradecer a Ernesto (“el boquerón”) el tenerme en vilo con sus encarguitos musicales, especialmente el de la búsqueda de James Taylor, y a Carmen, porque con ella aprendí el significado de la libertad (desde entonces plancho, hago la compra, friego los cacharros, etc.)*

*No quiero dejar de dar gracias también a Marta y a Valle, no especialmente por el trabajo administrativo que han hecho para mí (ya que ellas siempre me recuerdan que fui secretaria), sino por unos buenísimos momentos mañaneros, junto con las “Azúcar Moreno” (Encarna y Toñi), además de por aumentar el índice de natalidad de este país (que sinceramente lo necesita).*

*Muy especialmente quiero dar las gracias a mis compañeros de fatigas gastronómicas: a José Luis por introducirme, no muy satisfactoriamente, en el mundo árabe e intentar ilustrarme con su sabiduría en general, a Andrés no sé sinceramente porqué, pero algún motivo tiene que haber que ahora mismo no recuerdo, y a Nena y a Chus, porque sin su apoyo en esas citas culinarias hubiese sido más difícil hacer la digestión.*

*Me gustaría también hacer mención a Paco, Pablo, Rebeca, Manuela Cuevas, Eloy, Jose Campos, José Antonio, Laura y Noelia por el cariño que les tengo y a Javier Coll por sus buenos consejos (futbolísticos, por su puesto).*

*No me gustaría olvidarme de todo el personal de Cirugía Experimental, especialmente de Ana que ha estado luchando todo este tiempo conmigo, de Begoña Cuevas y de María Eugenia, y tampoco de todo el servicio de Admisión del Hospital, donde durante 5 años me desarrollé profesional y personalmente, pasando allí una de las mejores etapas de mi vida y donde todavía conservo grandes amistades.*

*Fuera del laboratorio, también tengo que agradecer a un montón de amigos que me han estado apoyando todo este tiempo con su compañía, con su cariño y sobre todo con la confianza que pusieron en mí. Gracias Marisol (sí, es a ti Greta) por los mejores momentos de risas, no creo que jamás encuentre a nadie con un sentido del humor tan especial como el tuyo. Gracias Alex por haber vuelto a mi vida después de tanto tiempo sintiendo tu ausencia. Gracias Ana, que aunque debido a este trabajo vas a cobrar la productividad, me has ayudado desde el principio hasta el fin dándolo todo y más por mí. Eres una gran amiga. Gracias Esther por esas salidas de chismes y tortitas con nata. Espero que sigamos muchos años engordando en compañía. Gracias Marisol por tu amistad y tu hombro en todos los momentos malos. Gracias Carlos por estar siempre ahí, sin ninguna condición y con tanto cariño. Gracias Yolanda por tus*

## *Agradecimientos*

---

---

*buenos consejos en esas cañitas domingueras que tan bien nos sientan, y gracias Emma por tantos años de apoyo. Has estado ahí siempre que te he necesitado.*

*Finalmente me gustaría dar las gracias a mis cuatro grandes familias:*

*A la que me adoptado mientras escribía esta tesis. Gracias a toda la familia De Miguel por haberme dado tanto cariño, especialmente a Barti que aún no coincidiendo en nada, ni si quiera en la edad, he pasado con él los momentos más divertidos y también, gracias a ti Maruja por haberme tratado como a una hija.*

*A mi familia Inglesa, a la que le debo más que amor. Ellos siempre han estado junto a mí, apoyándome en cada momento. Gracias Catherine por ser la niña más adorable del mundo y por sentirme tan querida por ti. Gracias Val y Chris por confiar siempre en mí, and thank you Ted for all your encouragement. This work is a part of you as well.*

*A mis padres. A Fernando, a Pilar, mi abuela, y a Mayte. Sé que estés donde estés, estarás celebrándolo con tanta alegría o más que si hubieses estado aquí junto a mí. Gracias papá porque sin ti nunca hubiese llegado a nada en la vida. A tí y a mamá, sí que os lo debo todo. Gracias mamá por aguantarnos tantos años con una paciencia infinita, por tu apoyo, tu confianza y tu amor, y gracias a ti también Fernando por tus constantes palabras de ánimo.*

*Y por último quiero dar las gracias a mi pequeña familia. Gracias Eddie, Spot, Hueso, Linda, Lola, Dolly, Lucas y Kiko por vuestra fidelidad y compañía incondicional. Y por su puesto, las GRACIAS con mayúsculas, son para la persona que me ha sufrido todos estos años con mis dudas, mis momentos altos y bajos, mis desequilibrios y mis manías. Gracias David, porque nunca habría podido llegar hasta el final sin ti.*

**RESUMEN**

## **RESUMEN**

Durante años, en nuestro laboratorio, se ha investigado la capacidad que tienen los derivados del ácido gálico de inhibir a las PTKs purificadas de bazo humano. En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de uno de estos derivados, el lauril galato (LG) (antioxidante E-312), sobre la inhibición de las PTKs de extractos crudos y de células en cultivo de la línea Wehi-231 (linfoma- B murino). También se ha investigado el efecto de los derivados del ácido gálico sobre la proliferación de varias líneas tumorales así como de linfocitos de sangre periférica observando que presentan selectividad por células activadas, lo que hace pensar en la utilidad de estos compuestos como agentes antitumorales. Se ha visto también la capacidad del LG de inducir apoptosis en la línea tumoral Wehi-231, estudiándose los distintos estadios de este proceso (fragmentación del DNA en bandas oligonucleosomales, exposición de PS, eflujo del citocromo-c al citosol...). Para investigar el papel protector de la molécula de Bcl-2, tras la incubación con LG, se ha realizado un estudio comparativo entre células que sobre-expresan Bcl-2 (Wehi-231-bcl-2) y células Wehi-231-neo (vector vacío para Bcl-2) observándose un retraso de 2 horas en la aparición de los fenómenos proapoptóticos. Se ha estudiado el efecto del LG sobre la inhibición y la regresión de tumores de piel inducidos químicamente sobre ratones IRC. Se ha observado una relación dosis-efecto del compuesto tanto en la inhibición de la formación del tumor así como en la regresión de los mismos. Estudios anatomo-patológicos han demostrado la aparición de células en apoptosis en aquellos tumores tratados con LG.

Por último, se ha realizado una síntesis original del LG-<sup>14</sup>C con el fin de estudiar el metabolismo celular del compuesto, así como demostrar que este compuesto se une principalmente a la albúmina presente en el suero de ternera fetal y la capacidad de esta proteína de ceder el compuesto a las células.

## **ABSTRACT**

Our research team has spent several years studying the effects of acid gallic derivatives on the inhibition of isolated PTKs from human spleen. In this work the effect of one of these derivatives, Lauryl Gallate (LG) (antioxidant E-312), on the inhibition of PTKs from crude extracts and culture cells from the Wehi-231 cell line (murine B-cell lymphoma) has been studied. Research has also been carried out on the effect of gallic acid derivatives on the proliferation of several tumour cell lines and peripheral blood lymphocytes, showing selectivity for activated cells that suggests the use of these compounds as antitumoral agents. The capacity of LG to induce apoptosis on the Wehi-231 cell line has also been studied. Several steps of this process (DNA breakdown, PS exposure, cytochrome-c efflux to the cytosol...) have been analysed. With the aim of exploring the protective role of the Bcl-2 molecule after LG incubation, a comparative study between cells overexpressing Bcl-2 (Wehi-231-bcl-2) and Wehi-231-neo (empty vector for Bcl-2) has been carried out. A delay of 2 hours in the proapoptotic events has been demonstrated. The effect of LG on the inhibition and regression of chemically-induced skin tumours on IRC mice has also been studied. A dose-effect relationship between the compound and the inhibition and regression of tumours has been observed. Anatomico-pathological studies have demonstrated the appearance of apoptotic cells in tumours after LG treatment. Finally, an original LG-<sup>14</sup>C synthesis has been developed to study the metabolism of the compound and to demonstrate that in proteins from fetal calf serum, albumin is able to bind the compound and subsequently releasing it to the cells.

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS</b>	17
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	19
<b>1.1. Proteín tirosín quinasas. Generalidades.</b>	20
1.1.1. <u>PTKs en transducción de señal</u>	24
1.1.2. <u>PTKs implicadas en el ciclo celular</u>	27
1.1.3. <u>PTKs en la señalización oncogénica</u>	28
1.1.4. <u>Patologías asociadas a PTKs</u>	29
<b>1.2. Inhibidores de PTKs</b>	32
1.2.1. <u>Inhibidores competitivos con ATP</u>	33
1.2.2. <u>Inhibidores competitivos con tirosina</u>	36
1.2.3. <u>Otros</u>	37
<b>1.3. Derivados del ácido gálico</b>	38
1.3.1. <u>Efecto sobre PTKs</u>	39
1.3.2. <u>Efecto sobre otros sistemas</u>	42
<b>1.4. Potencial terapéutico de inhibidores de PTKs</b>	44
1.4.1. <u>Ensayos en tumores experimentales</u>	44
1.4.2. <u>Ensayos clínicos</u>	45
<b>2. OBJETIVOS</b>	46
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	48
<b>3.1. Materiales</b>	49
<b>3.2. Métodos</b>	53

3.2.1. <u>Cuantificación de proteínas</u>	53
3.2.2. <u>Ensayo de PTK por ELISA</u>	53
3.2.3. <u>Ensayo de actividad PTK en extractos crudos de células Wehi-231</u>	55
3.2.4. <u>Condiciones estándar de cultivos celulares</u>	55
3.2.5. <u>Ensayo de proliferación celular</u>	56
3.2.6. <u>Electroforesis en geles de acrilamida</u>	56
3.2.7. <u>Isoelectroenfoque en placa de agarosa</u>	57
3.2.8. <u>Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF</u>	57
3.2.9. <u>Inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina</u>	57
3.2.10. <u>Análisis de la fragmentación de DNA</u>	58
3.2.11. <u>Análisis citofluorimétrico</u>	58
3.2.12. <u>Exposición de fosfatidilserina en la superficie celular</u>	58
3.2.13. <u>Medida del potencial de membrana mitocondrial</u>	59
3.2.14. <u>Liberación del citocromo-c al citosol</u>	59
3.2.15. <u>Ensayo para la determinación de la actividad de caspasa-3</u>	60
3.2.16. <u>Hidrólisis de la poli(ADP ribosa)polimerasa (PARP)</u>	61
3.2.17. <u>RT-PCR para mRNA de Bcl-2</u>	61
3.2.18. <u>Protocolo de inducción de tumores por agentes químicos sobre ratones IRC</u>	62

3.2.19. <u>Síntesis química del lauril galato-<sup>14</sup>C</u>	62
3.2.20. <u>Purificación del compuesto de síntesis</u>	62
3.2.21. <u>Caracterización del compuesto</u>	63
3.2.22. <u>Estudio de un sistema de reparto</u>	63
3.2.23. <u>Ensayo de lipasas y estererasas y compartimentación celular del compuesto</u>	64
<b>4. RESULTADOS</b>	66
4.1. <b>Inhibición de PTKs en extractos crudos de células Wehi-231</b>	67
4.2. <b>Efecto sobre el estado de fosforilación en tirosina de células Wehi-231 en cultivo</b>	68
4.3. <b>Efecto de los derivados del ácido gálico sobre el crecimiento celular en líneas tumorales y linfocitos humanos</b>	72
4.4. <b>Estudio de los mecanismos sobre los cuales el LG ejerce su acción</b>	77
4.4.1. <u>Efecto sobre el potencial de la membrana mitocondrial</u>	77
4.4.2. <u>Efecto sobre la expresión de fosfatidilserina en las membranas</u>	79
4.4.3. <u>Efecto sobre la liberación de citocromo-c al citosol</u>	80
4.4.4. <u>Activación de caspasas</u>	81
4.4.5. <u>Activación de endonucleasas</u>	83
4.4.6. <u>Estudio del papel protector del Bcl-2 sobre la inducción de apoptosis por LG</u>	84

---

---

<b>4.5. Efecto del lauril galato sobre la inducción de tumores por agentes químicos sobre ratones IRC</b>	86
4.5.1. <u>Inducción de tumores por DMBA + PMA en acetona</u>	86
4.5.2. <u>Efecto del lauril galato sobre la inducción y regresión de tumores en acetona</u>	88
4.5.3. <u>Condiciones óptimas para la inducción de tumores. Modificación del protocolo</u>	91
4.5.4. <u>Efecto del LG en DMSO/Glicerol sobre la regresión de tumores inducidos químicamente</u>	92
4.5.5. <u>Estudios anatomo-patológicos de tumores inducidos químicamente con DMBA + PMA en DMSO/Glicerol</u>	99
<b>4.6. Síntesis del lauril galato radiactivo (LG-<sup>14</sup>C)</b>	104
4.6.1. <u>Separación de los reactivos</u>	105
4.6.2. <u>Condiciones óptimas de la síntesis</u>	106
4.6.3. <u>Purificación</u>	107
4.6.4. <u>Caracterización del producto sintetizado</u>	108
4.6.4.1. <u>HPTLC</u>	108
4.6.4.2. <u>Espectro de absorción</u>	109
4.6.4.3. <u>Espectro de masas</u>	110
4.6.5. <u>Estudio de las características hidrofóbicas/hidrofílicas del compuesto en un</u>	113

4.6.6. <u>Captación de LG por parte de células Wehi-231 en tampón fosfato y medio de cultivo completo.</u>	115
4.6.7. <u>Unión de LG a proteínas plasmáticas</u>	116
4.6.8. <u>Estabilidad y efecto de esterasas</u>	117
4.6.9. <u>Unión de LG a células Wehi-231 y K562</u>	119
<b>5. DISCUSIÓN</b>	121
5.1. <b>Inhibición de PTKs por LG en extractos crudos de células Wehi-231</b>	122
5.2. <b>Efecto del LG sobre las PTKs de células Wehi-231 en cultivo</b>	123
5.3. <b>Efecto de los derivados del ácido gálico sobre el crecimiento celular en líneas tumorales y linfocitos humanos</b>	125
5.4. <b>Estudio de los mecanismos sobre los cuales el LG ejerce su acción</b>	127
5.4.1. <u>Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial</u>	128
5.4.2. <u>Efecto sobre la expresión de fostatidilserina en las membranas</u>	139
5.4.3. <u>Efecto sobre la liberación de citocromo-c al citosol</u>	130
5.4.4. <u>Activación de caspasas</u>	130
5.4.5. <u>Activación de endonucleasas</u>	131

5.4.6. <u>Estudio del papel protector del Bcl-2 sobre la inducción de apoptosis por LG.</u>	131
5.5. Efecto del LG sobre la inducción y regresión de tumores por agentes químicos sobre ratones IRC	133
5.6. Síntesis y caracterización del lauril galato radiactivo (LG- <sup>14</sup> C)	135
5.7. Estudio de la captación y estabilidad del LG en células Wehi 231.	136
5.8. Consideraciones finales	138
<b>CONCLUSIONES</b>	144
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	148

**ABREVIATURAS**

**AIF:** Factor inductor de apoptosis  
**DIOC<sub>3</sub>(6):** yoduro de 3,3'-dihexil-oxocarbocianina  
**DMBA:** Dimetil benzantraceno  
**DMSO:** Dimetil sulfóxido  
**ELISA:** Enzimoimmunoensayo sobre soporte sólido  
**FCS:** Suero de ternera fetal  
**FPLC:** cromatografía líquida de alta velocidad  
**HPTLC:** Cromatografía en capa fina  
**IEF:** Isoelectroenfoque  
**LG:** Lauril galato  
**LOH:** Lauril alcohol  
**NB:** Nitrobenceno  
 **$\beta$ -NFS:**  $\beta$ -Naftalén sulfónico  
**OD:** Densidad óptica  
**PARP:** Poli(ADP-ribosa) polimerasa  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**PHA:** Fitohemaglutinina  
**PMA:** Forbol miristato acetato  
**PS:** Fosfatidil serina  
**PTK:** Proteín tirosín quinasas  
**RT-PCR:** Trascrición reversa de la reacción en cadena de la polimerasa  
**SDS:** Dodecil sulfato de sodio  
**SDS-PAGE:** Electroforesis en geles de acrilamida con SDS  
**TK:** Tirosín quinasa  
**UV:** Ultravioleta

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Proteín tirosín quinasas. Generalidades

Las proteín tirosín quinasas constituyen una clase de enzimas que catalizan la transferencia del grupo  $\gamma$ -fosfato, principalmente del ATP (Flockhart 1982) y en algunos casos del GTP (Graziani *et al* 1983), al grupo fenólico de la tirosina presente en ciertas proteínas. Aunque la fosforilación en residuos de tirosina constituye menos de un 0.01% del total de la fosforilación intracelular (Ullrich *et al* 1990), el descubrimiento, hace aproximadamente 20 años, de que el producto del gen transformante del virus del sarcoma de Rous era una proteín quinasa que fosforilaba residuos de tirosina supuso un gran impulso para el estudio de estas enzimas. Desde entonces una gran variedad de PTKs han sido identificadas como oncogenes (Hunter *et al* 1997, Blume-Jensen *et al* 2001). Estas enzimas son importantes mediadores de transducción de señal desde el exterior al interior de la célula, además de efectores intracelulares para algunos receptores de hormonas de crecimiento (Veillette *et al* 1989). De los más de 90 genes codificadores para PTKs que existen en el genoma humano, 58 codifican para receptores con actividad PTK (PTK-receptor) clasificadas en 20 subfamilias y 32 codifican para PTK citosólicas clasificadas en 10 subfamilias (Robinson *et al* 2000). Las PTKs-receptor son glicoproteínas transmembranales que se activan por la unión de su correspondiente

ligando, y que transducen la señal extracelular al citoplasma por mecanismos de fosforilación de Tyr presentes en ellas mismas (autofosforilación) o sobre Tyr presentes en proteínas en la cascada de señalización. Las PTKs-receptor activan numerosas vías de señalización que dan lugar a fenómenos de proliferación, diferenciación, migración o a cambios metabólicos celulares (**Schlessinger *et al* 1992**). La familia PTK-receptor engloba a los receptores para insulina (**White 1998**) y varios factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular, y factor de crecimiento nervioso. El desarrollo del sistema vascular depende de la acción concertada de varias subfamilias de PTKs-receptor y sus ligandos correspondientes (**Yancopoulos *et al* 1998**).

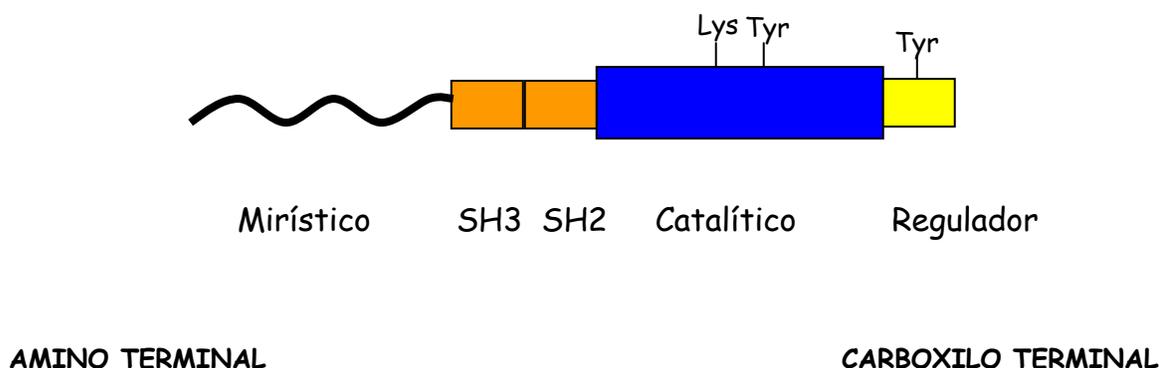
La estructura de las PTKs-receptor consta de un fragmento extracelular que une ligandos polipeptídicos, una hélice transmembrana, y un fragmento citoplasmático que posee actividad catalítica TK. La gran mayoría de estas PTKs se encuentran de forma monomérica en ausencia del ligando. En el fragmento extracelular las PTKs-receptor contienen un conjunto de diversos dominios globulares tales como el dominio tipo inmunoglobulina, dominio tipo fibronectina-III, dominios ricos en cisteína y dominios tipo factor de crecimiento endotelial.

Las PTKs-no receptor (**tabla I**) son componentes integrales de la cascada de señalización activadas por las PTKs-receptor o por otros receptores de la superficie celular, tales como los receptores acoplados a proteínas G y receptores del sistema inmune.

Tabla I  
Clasificación en familias de las PTKs no receptores

Familia	Miembros	Localización
Abl	Abl, Arg	Citosol, Núcleo
Jak	Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2	Citosol
Fak	Fak	Citosol
Ack	Ack	Citosol
Fes	Fes, Fer	Citosol, Núcleo
Syk/Zap	Syk, Zap-70	Citosol
Btk	Btk, Itk, Tec, Bmx, Txk	Citosol
Src	Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr, Yrk	Citosol
Frk	Brk, Rak, Srm	Citosol
Csk	Csk, Ntk	Citosol

La mayoría de las PTKs no receptor carecen de un dominio de unión a ligando y algunas están ancladas a la cara interior de la membrana celular a través de modificaciones aminoterminal, tales como miristoilación y palmitoilación (**Figura 1**). Además del dominio TK, algunas de ellas poseen dominios que median la interacción de proteína-proteína, proteína-lípido y proteína DNA. Los dominios SH2 (Src homología 2) y SH3 son los de interacción proteína-proteína. El residuo SH2 es el que une residuos de fosfotirosina, y el dominio SH3 une secuencias ricas en prolina, capaz de formar una hélice tipo II de poliprolina.



**Figura 1.** Esquema de la estructura de los miembros de la familia Src de PTKs.

La activación inicial de la función quinasa está frecuentemente asociada con la "autofosforilación" de uno más residuos de tirosina. Se piensa que esta autofosforilación es un proceso intermolecular entre PTKs vecinas seguida de una oligomerización como respuesta a distintos sucesos de señalización. Todas las PTKs-receptor identificadas contienen entre 1 y 3 tirosinas en el dominio de activación quinasa. La fosforilación de estas tirosinas se ha demostrado como punto crítico para la estimulación de la actividad catalítica y la función biológica de gran número de PTKs-receptor. La excepción de este aumento catalítico vía activación del dominio de autofosforilación, es el receptor del factor de crecimiento endotelial. Aunque una tirosina en el bucle de activación esta conservada en esta subfamilia, la sustitución con una Phe no ha demostrado cambios en las propiedades del receptor (Gotoh *et al* 1992). En principio, la

autofosforilación del receptor podría ocurrir en *cis* (en el mismo receptor), o en *trans* (entre receptores). En el primer caso, la dimerización inducida por la unión del ligando causaría un cambio conformacional en el receptor que facilitaría la autofosforilación en *cis*. En el segundo caso, no se necesitarían cambios conformacionales en la dimerización, puesto que un efecto de proximidad haría que ocurriera la fosforilación en *trans*. Estudios estructurales del dominio quinasa de la PTK-receptor de la insulina (Hubbard *et al* 2000) ponen de manifiesto la existencia de problemas estéricos que impiden la activación del bucle que contiene las tirosinas y que, por tanto, sólo puede ser fosforilado en *trans*. Otros sitios de autofosforilación (por ejemplo en la región yuxtamembranal o en la cola carboxiterminal) podrían estar potencialmente fosforilados en *cis*.

### 1.1.1 PTKs en transducción de señal

La fosforilación en tirosina puede considerarse como el principal indicador de transducción de señal en los organismos multicelulares. Las PTKs-receptor participan en la señalización transmembranal que posteriormente, por medio de las PTKs citosólicas, transducen la señal en el interior de la célula, incluyendo en algunos casos la transducción al núcleo (figura 2) (Lia *et al* 1994).

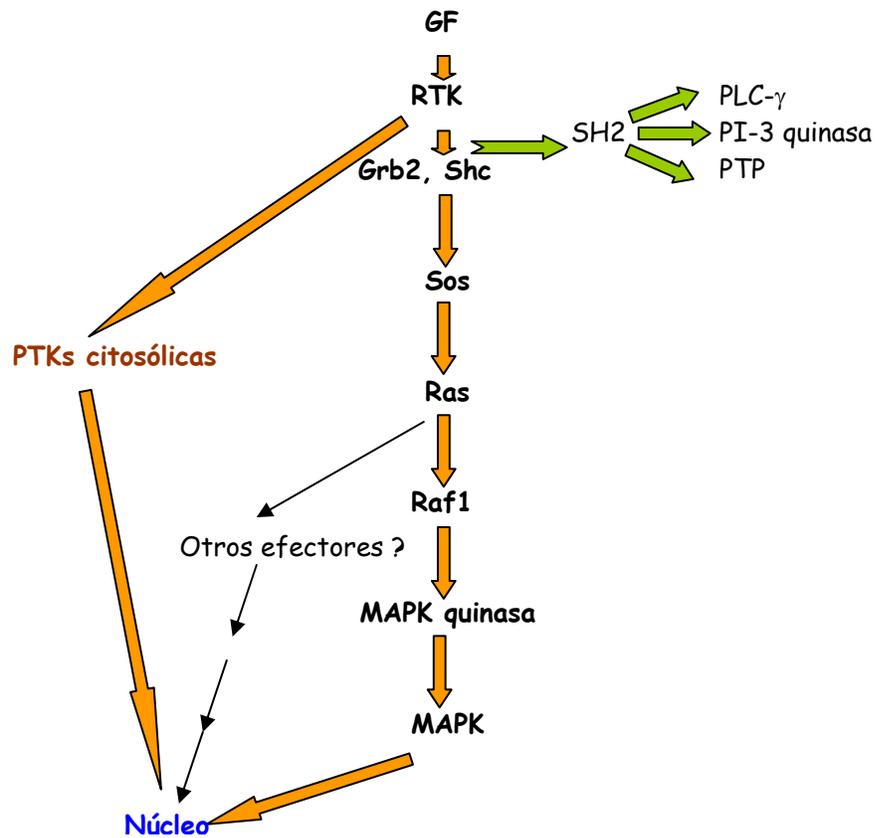


Figura 2. Ruta de transducción de señal desde la membrana hasta el núcleo celular.

Una de las funciones del sistema inmune es el reconocimiento de antígenos por parte de los receptores de los linfocitos T y B. Estos receptores carecen de actividad PTK pero son capaces de activar PTKs citosólicas y también una tirosín fosfatasa, CD45, siendo uno de los primeros acontecimientos detectables tras la estimulación antigénica la fosforilación en tirosina de diversas proteínas (June *et al* 1990).

Dos de las PTKs más estudiadas en el linfocito T son la p56<sup>lck</sup> y la p59<sup>fyn</sup>. Ambas PTKs pertenecen a la familia de Src y se asocian a la membrana celular mediante la miristoilación de un residuo de glicocola aminoterminal, mediando los sucesos más tempranos de la transducción de señal inducida por la unión del antígeno al receptor ya que el complejo TCR/CD3 transmembranal no posee actividad quinasa intrínseca (**Wange et al 1996**). La PTK p56<sup>lck</sup> interacciona no covalentemente con residuos de cisteína en la región citoplasmática de las moléculas de CD4 y CD8 (**Glaichenhaus et al 1991**), mientras que p59<sup>fyn</sup> puede asociarse directamente con el complejo TCR/CD3 (**Samelson et al 1990**).

También se ha estudiado la transducción de señal en linfocitos B. El receptor para el linfocito B está constituido por una inmunoglobulina de clase IgM o IgD unida a membrana, y asociada no covalentemente con el heterodímero Ig $\alpha$ -Ig $\beta$ . A este receptor se asocian las PTKs de la familiar Src (p53/56<sup>lyn</sup>, p55<sup>blk</sup>, p56<sup>lck</sup> y p59<sup>fyn</sup>) (**Campbell et al 1992**).

Además, una gran variedad de PTKs citosólicas que controlan la transducción de señal desde la membrana hasta el núcleo junto con proteínas como Sos, Ras y Raf, y factores de transcripción que median la expresión de genes como jun y fos. En las células T existen dos cascadas de señalización para la activación antigénica específica, una que implica a Ras, Raf, MAPK y Fos y otra que involucra a SEK1, SAPK/JNK y c-Jun.

### 1.1.2. PTKs implicadas en el ciclo celular.

La fosforilación en tirosina, controlada por las acciones coordinadas de proteínas tirosín fosfatasas y proteínas tirosín quinasas, es un mecanismo de regulación crítico para distintos procesos fisiológicos, incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación, el metabolismo, la regulación del ciclo celular y la función del citoesqueleto. La familia de quinasas de adhesión focal está constituida por la quinasa de adhesión focal (FAK) y la quinasa RAFTK/Pyk2 (también conocida como CAK-beta y CADTK). RAFTK/Pyk2 puede ser activada por gran variedad de señales extracelulares y por señales de estrés que elevan la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular. RAFTK/Pyk2 está expresada principalmente en el sistema nervioso central y en células derivadas de linajes hematopoyéticos, mientras que FAK está ampliamente expresada en distintos tejidos y conecta los receptores de integrina transmembranales con las vías intracelulares (Avraham *et al* 2000). La quinasa de adhesión focal (FAK) es un mediador importante en la vía de transducción de señal iniciado por integrinas en la migración celular, supervivencia y regulación del ciclo celular. La capacidad de FAK para mediar la señalización por integrinas en la regulación de la progresión del ciclo celular, depende de la fosforilación en la Tyr397 necesaria para la formación del complejo de señalización de FAK con Src, fosfatidil inositol-3 quinasa (PI3K), y Grb7. La formación del complejo FAK/PI3K no es suficiente para la progresión del ciclo celular, sin embargo la formación del complejo FAK/Src, juega un

papel esencial. Además la formación del complejo FAK/Grb7 no parece estar implicado en la regulación del ciclo celular, pero la asociación de Src/FAK con Grb2 y p130(Cas) se requiere para la progresión del mismo.

Otra de las proteínas tirosín quinasas implicadas en la regulación del ciclo celular es Jak2. La señalización mediada por receptores de citoquinas, incluyendo el factor estimulante de la colonia de granulocitos macrófagos (GM-CSF) induce la progresión del ciclo celular y la fosforilación en tirosina de proteínas celulares incluyendo la Jak2 quinasa en la línea EA.hy 926 (línea celular derivada de células endoteliales humanas) (Tsukada *et al* 1997).

### 1.1.3. PTKs en la señalización oncogénica.

La aparición de un cáncer no es necesariamente el resultado de un incremento de la tasa de proliferación celular, sino más bien es el balance crítico entre la tasa de progresión del ciclo celular (división y crecimiento celular) y la muerte celular programada (apoptosis) (Reed 1999). Las moléculas que gobiernan el crecimiento extracelular, diferenciación y desarrollo de señales, en particular, están a menudo mutadas en procesos cancerígenos (Pawson *et al* 2000).

Según Blume-Jensen *et al* (2001) existen cuatro vías principales para la transformación oncogénica en las que están implicadas las PTKs. Primero, la activación retroviral de un proto-oncogén que

codifica a una PTK defectuosa en su mecanismo de regulación. Segundo, reordenamientos genómicos, tales como translocaciones cromosómicas que pueden tener por resultado proteínas de fusión oncogénicas que incluyen dominios catalíticos de PTK y una proteína no relacionada que proporciona una función de dimerización necesaria para la activación. En tercer lugar, mutaciones que dan lugar a un aumento de la actividad TK. Finalmente, la sobre-expresión de las PTKs como resultado de la amplificación del gen.

#### 1.1.4. Patologías asociadas a PTK

El aumento de la actividad PTK puede activar mutaciones o conducir a la permanente estimulación por la secreción autocrina de factores de crecimiento, que a su vez causarían enfermedad. También la disminución de la función quinasa puede ser dañina; por ejemplo, una disminución en la actividad PTK del receptor de la insulina es la causa de varios tipos de diabetes (**Accili *et al* 1992**). La deficiencia de la tirosín quinasa de Bruton (BTK) de la célula B progenitora conduce a una agammaglobulinemia humana ligada al X (XLA)(**Tsukada *et al* 1993**) además de una inmunodeficiencia de células B ligada al X en ratones (XID) (**Vetrie *et al* 1993**). Un aumento de la actividad TK se ha visto implicado en muchos de los cánceres y enfermedades proliferativas, tales como aterosclerosis (**Ross 1993**) y psoriasis (**Elder *et al* 1993**) y en un gran número de respuestas inflamatorias tales como el shock séptico (**Weinstein *et al* 1991**). Son muchas las

PTKs y sus proto-oncogenes que se han visto implicados en distintos tipos de tumores. Dentro de éstas, una vez más, se pueden distinguir las PTKs-receptor y las PTKs citosólicas. Dentro de las PTKs-receptor nos encontramos principalmente con Ret/GDNFR (receptor del factor neurotrófico derivado de Ret/glia). Ret es requerido para el desarrollo de los riñones y del sistema entérico y para la supervivencia y la diferenciación neuronal. Es parte de un receptor formado por distintos componentes de la familia de neurotrofinas del factor neurotrófico derivado de glia (GDNF), que incluyen la neurturina (NTN), artemina (ART) y persefina (PSP). En respuesta al ligando, Ret se activa por la formación de un heterodímero con uno de los cuatro receptores relacionados estructuralmente de glicofosfatidilinositol unidos a la superficie celular. Al menos ocho reordenamientos comunes dan como resultado fusiones entre la zona amino terminal de distintas proteínas y el dominio PTK de Ret (**Jhiang 2000**) dando lugar a carcinomas papilares de tiroides.

Otra de las PTKs-receptor implicadas en otro tipo de neoplasias es la Kit/SCFR que es el primer ejemplo de pérdida de función por mutaciones puntuales en línea germinal en mamíferos. Los fenotipos resultantes demuestran la importancia de este receptor para una hematopoyesis normal y desarrollo de los mastocitos, melanogénesis, gametogénesis y células intersticiales de Cajal (**Ashman 1999**). Recientemente, más de 30 mutaciones de ganancia de función han sido identificadas en Kit/SCFR, y están asociadas a distintos tumores malignos en humanos.

Tabla II

Patología	PTK implicada	Mecanismo
Ciertos cánceres	EGFR	Amplificación y sobreexpresión del gen de EGFR
Psoriasis	EGFR	Sobreexpresión de la amfipregulina o del gen TGF- $\alpha$ , o de ambos, que conduce a una estimulación autocrina del EGFR
Carcinoma de mama y ovario	HER2-Neu	Amplificación del gen y sobreexpresión de la proteína HER2
Aterosclerosis, restenosis y fibrosis pulmonar	PDGFR	Estimulación de PDGFR por liberación patológica de PDGF
Gliomas y glioblastomas	PDGFR	Amplificación de PDGFR, coexpresión de PDGF y de PDGFR en el tumor
CML	p210 <sup>Bcr-Abl</sup> y p185 <sup>Bcr-Abl</sup>	Reordenamiento cromosómico que resulta de la fusión de Bcr y p140c-Abl, que lleva a un aumento de la actividad quinasa
ALL	JAK-2	Aumento de la fosforilación en tirosina de proteínas intracelulares
Sepsis y otras condiciones inflamatorias	LPS, TNF- $\alpha$ dependientes de la fosforilación en Tyr	Probable aumento de la actividad de las PTKs citoplasmáticas de la familia Src

Dentro de estas malignidades se encuentran tumores del estroma gastrointestinal, leucemias mieloides agudas, síndromes mielodisplásicos, etc. (Blume-Jensen *et al* 2001).

Entre las PTKs citosólicas implicadas en oncogénesis destaca c- Src que fue la primera homóloga celular de una oncoproteína viral (Stehelin *et al* 1976) que se asocia con una gran variedad de patologías cancerígenas (Bjorge *et al* 2000), como el cáncer de colon (por la truncamiento de c-

Src aumentado la actividad quinasa), cánceres mamarios y pancreáticos, neuroblastomas y otros tipos de tumores por sobre-expresión de c-Src. También, otras PTKs citosólicas, están implicadas en patologías cancerígenas, por ejemplo mutaciones puntuales y el truncamiento de la región terminal de c-fgr da lugar a leucemias mieloblásticas agudas, leucemias linfocíticas crónicas y linfomas inducidos por el EBV . La sobre-expresión o alteración de la actividad quinasa de Jak provoca distintos tipos de leucemias (**Ihle *et al* 1997**).

Para poder combatir este tipo de enfermedades, en los últimos años, se han abierto líneas de investigación cuyo fin principal el desarrollo de inhibidores específicos para estos enzimas.

## **1.2. Inhibidores de PTKs**

Como hemos visto anteriormente, un gran número de enfermedades que afectan al hombre (reacciones inflamatorias, cáncer, etc.) son consecuencia de señales incontroladas procedentes de receptores con actividad PTK y de PTKs citosólicas. Por esto es de gran interés el diseño de inhibidores para este tipo de enzimas que serían útiles como herramientas frente a estas enfermedades.

Dado que la función principal de las PTKs es el reconocimiento y la unión del nucleósido trifosfato (normalmente ATP) y de un sustrato que contiene Tyr, seguido de la consiguiente transferencia del grupo fosfato del ATP a la Tyr del sustrato (**Erneux *et al* 1983**) el diseño de inhibidores irá dirigido a: 1) impedir la unión del ATP, 2) impedir la unión

del sustrato que porta la Tyr, 3) disminuir la eficiencia catalítica del enzima por otros mecanismos. Una forma de clasificar estos inhibidores es la que a continuación se detalla.

### 1.2.1. Inhibidores competitivos con ATP

a) **Basados en nucleósidos.** Estos compuestos fueron los primeros ensayados para impedir la unión del ATP a las PTKs. Uno de los primeros en ser estudiado fue un inhibidor de las serín/treonín quinasas 5'-[4-(fluorosulfonyl)benzoil] adenosina (5'-FSBA) que forma enlaces covalentes con un residuo de Lys en el sitio activo de las PTKs (**Kamps *et al* 1984**). También el ADP y el GDP inhiben a estas enzimas (**Barkenow 1983**), sin embargo problemas en el transporte através de la membrana unido con la ausencia de especificidad y potencia hacen que estos compuestos no se utilicen con fines terapéuticos.

b) **Flavonoides.** Estos inhibidores tienen la capacidad de interaccionar con el sitio de unión del nucleótido en distintos sistemas enzimáticos. La Quercitina fue el primer compuesto flavonoide natural empleado (**Stavric *et al* 1994**), sin embargo no presentaba especificidad exclusiva por las PTKs. Ésta, junto con la Genisteína, compuesto isoflavonoide producto de la soja (**Akiyama *et al* 1987**), han mostrado la capacidad de inhibir la función PTK por competición con el ATP (**Khols *et al* 1997**). Un

derivado metilado de la Genisteína, la Biochanina, tiene mayor especificidad que ésta por células tumorales en cultivo (Peterson *et al* 1996). En general el potencial inhibitorio de estos compuestos aumenta a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo presentes en la molécula.

- c) **Compuestos heterocíclicos no flavonoides.** Uno de estos compuestos es la Amilorida, competidor del ATP, que inhibe las PTKs en concentraciones similares a las requeridas para bloquear la respuesta mitogénica por los factores de crecimiento (Davis *et al* 1985), aunque no puede ser utilizado con fines terapéuticos debido a que también inhibe otro gran número de quinasas. El compuesto heterocíclico no flavonoide más conocido es la Estaurosporina, antibiótico derivado del indolcarbazol, que muestra una marcada actividad citotóxica (Ruegg *et al* 1989).
- d) **Quinona, quinolina y derivados de quinazolina.** Los derivados de quinazolina constituyen un nuevo grupo de inhibidores de PTKs (Levitzki *et al* 1995; Kelloff *et al* 1996). Estos compuestos han sido descritos como inhibidores competitivos con el ATP y que muestran cierta selectividad por el EGFR (Osherov *et al* 1994).
- e) **Miscelánea.** Dentro de este grupo de inhibidores destacan la Adriamicina y la Lavendustina A. La Adriamicina es una

antraciclina utilizada como agente antineoplásico por su capacidad de interaccionar con el DNA, aunque también puede interaccionar con membranas lipídicas. Se ha postulado un mecanismo de acción basado en la competición con el ATP, sin embargo también parece afectar a esta inhibición la naturaleza y la concentración del sustrato aceptor, lo que lleva a pensar en posibles interacciones adicionales. Este compuesto parece afectar a la proteína quinasa-C, lo que limita su valor como un inhibidor específico (Donella-Deana *et al* 1989). La Lavendustina A inhibe el crecimiento de células neoplásicas en cultivo a concentraciones superiores que las que se requieren para inhibir a las PTKs en ensayos *in vitro*. Al igual que la Adriamicina actúa inhibiendo la unión del ATP, sin embargo contiene el grupo 2,5-dihidroxifenilo característico de la Erbstatina, que como veremos posteriormente es un compuesto que inhibe a las PTKs por competición con el sustrato, y que es esencial para su actividad (Onoda *et al* 1989).

En este grupo también se enmarcan las piridopirimidinas, como la CGP59326A, que es un inhibidor nuevo, competitivo con el ATP diseñado sobre un modelo en 3D del dominio quinasa del EGFR, que ha sido descrito como altamente selectivo para la actividad tirosín quinasa *in vitro* (Lyndon *et al* 1998).

### 1.2.2. Inhibidores competitivos con tirosina

Este tipo de compuestos inhibirá la acción de las PTKs por competición con el sustrato. A diferencia del grupo anterior, estas moléculas serán específicas para PTK y no para serín/treonín quinasas. Dentro de este grupo los inhibidores se encuentran subclasificados en función de su mecanismo de acción.

a) **Inhibidores que interaccionan con el sitio catalítico.** Se ha observado que pequeños péptidos que contienen secuencias parecidas al sitio de autofosforilación de las PTKs puede inhibir a estas enzimas, pero debido a su alta  $K_m$ , inestabilidad y dificultad para atravesar la membrana no se han utilizado con fines terapéuticos. Dentro del grupo de inhibidores que compiten con el sustrato uno de los más utilizados es la Erbstatina. Este compuesto posee un grupo estiril en su estructura que le confiere un gran poder inhibidor de las PTKs (Nakamura *et al* 1986). Además de la Erbstatina, un grupo de derivados sintéticos que poseen el grupo estiril y que muestran gran poder inhibidor y gran especificidad sobre las PTKs son las tirfostinas (Levitzki 1991). En los últimos años este grupo de inhibidores ha sido ampliamente estudiado y muchas tirfostinas se han ensayado sobre células en cultivo (Kobari *et al* 1998). Algunas, como por ejemplo el AG 1571 (SU 5271), se encuentran ya en estudios preclínicos (Ben Bassat *et al* 2000).

**b) Análogos bisustrato que interactúan con el sitio catalítico.**

Estos inhibidores presentan analogías estructurales con el ATP además de contener grupos tiosilo, por lo que muestran mayor afinidad que los compuestos que sólo compiten por uno de los dos sitios de unión (**Wong *et al* 1984**).

**c) Compuestos que no interactúan con el sitio catalítico.**

Se ha descrito que fragmentos de 21 aminoácidos derivados del dominio SH2 de v-src son capaces de inhibir a las PTKs pero por un mecanismo distinto a la competición del ATP o del sustrato (**Sato *et al* 1990**).

**1.2.3. Otros**

Uno de los inhibidores más utilizados es la Herbimicina A, compuesto aislado de extractos fúngicos (**Billis *et al* 1997**), que pertenece a la familia de benzoquinoides (inhibidores por competición con el ATP) y cuyo mecanismo de acción se encuentra en la actualidad en estudio.

### 1.3. Derivados del ácido gálico. Generalidades.

El ácido gálico, compuesto procedente de plantas, está formado por un anillo bencénico y tres grupos hidroxilo en posiciones 3, 4, 5 con respecto al grupo funcional carboxílico (**figura 3**), es decir, es un compuesto trifenólico.

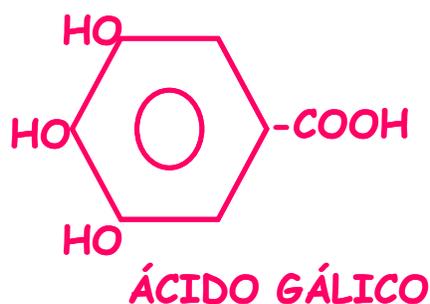


Figura 3. Estructura del ácido gálico.

Los derivados de ácido gálico han sido extensamente estudiados, no sólo por sus propiedades antioxidantes sino porque los taninos, compuestos que se encuentran en gran variedad de plantas utilizadas como alimentos, en el vino y en el té han suscitado un gran interés científico, especialmente en zonas donde el consumo de estos alimentos es elevado. Desde hace años existe una controversia entre las propiedades de estos compuestos. Se describieron como sustancias nocivas (**Salunke et al 1982; Deshpande et al 1984**) debido a los daños que ejercían sobre el tracto de la mucosa gastrointestinal, y como compuestos potencialmente cancerígenos (**Kaiser 1967**), induciendo tumores de piel en ratones. Sin embargo actualmente, se están estudiando los beneficios que aportan estas sustancias, encontrándose muchas de ellas en estudios preclínicos. Dentro de las propiedades beneficiosas de los derivados del ácido gálico merecen destacar: su acción como agentes antibacterianos (**Scalbert**

1991), anticancerígenos (**Ahmad *et al* 2001**), antimutagénicos (**Huang, M.T *et al* 1985**) y antivíricos (**Chang *et al* 1994**).

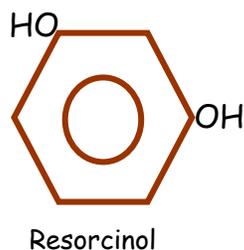
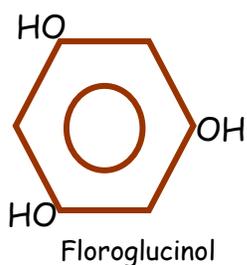
A parte de los taninos, otros derivados del ácido gálico han sido ampliamente utilizados. Estos derivados, sintéticos, engloban principalmente los ésteres del ácido gálico, entre los que encontramos el propil, octil y lauril galato. Estos compuestos son de gran interés ya que, debido a sus propiedades antioxidantes, se utilizan como aditivos alimentarios para evitar el enranciamiento de grasas en salsas, mayonesas, quesos fundidos, pastelería, etc., con los códigos E310 (propil galato), E311 (octil galato) y E312 (lauril galato). Las concentraciones de uso varían desde 100 mg/Kg en mayonesas y quesos fundidos hasta 300-1000 mg/Kg en gomas de mascar (**Cumbreño 1987; Carbajo Sánchez 1994**). Este grupo de derivados sintéticos del ácido gálico es sobre el que versará el presente estudio.

### 1.3.1. Efecto sobre PTKs.

En la búsqueda de inhibidores de PTKs, se ensayaron en nuestro laboratorio (**Lázaro *et al* 1995**) distintos compuestos monofenólicos, difenólicos y trifenólicos sobre PTKs purificadas de bazo humano. Mientras que los compuestos monofenólicos no eran buenos inhibidores de las PTKs, la introducción de un segundo grupo OH en el anillo bencénico (catecol, dopa, dopamina, epinefrina y norepinefrina) aumentaba su poder inhibidor. Finalmente los compuestos trifenólicos y especialmente los

derivados del ácido gálico eran potentes inhibidores con  $I_{50}$  inferiores a otros inhibidores de PTKs utilizados, como la Genisteína o las tirfostinas (**tabla III**). Además, no sólo era importante el número de grupos hidroxilo en el anillo bencénico, sino también su posición en éste. Esto se demuestra al comparar el floroglucinol (1,3,5- trihidroxibenceno) que produce una inhibición menor del 10% a concentración de 1mM con el pirogalol (1,2,3- trihidroxibenceno) cuya  $I_{50}$  es de 12  $\mu$ M (**figura 4**).

NO CONTIGÜEDAD: NO-INHIBICIÓN



CONTIGÜEDAD: INHIBICIÓN

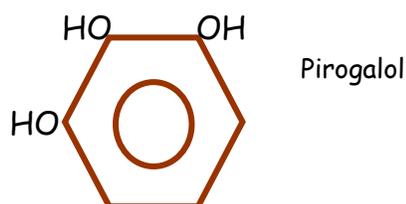


Figura 4. Efecto de la proximidad de grupos hidroxilo en el anillo bencénico

Tabla III

Inhibición de las PTK de bazo humano por compuestos fenólicos

Compuesto	%Inhibición a 1mM	I <sub>50</sub> (μM)
<b>Compuestos monofenólicos</b>		
Fenol; ácidos (o,m,p) hidroxibenzoico; (o,m,p) nitrofenoles; (o,m,p) acetamidofenoles ácidos (o,m,p) fenil acéticos, ácido salicílico; salicidamida, ácido acetilsalicílico; tirosina	<25	
<b>Compuestos difenólicos</b>		
1,3- Dihidroxibenceno; 1,4- dihidroxibenceno; ácido 3,5- dihidroxibenzoico, 2,4-dihidroxibenzoico; 2,6-dihidroxibenzoico; 2,5- dihidroxibenzoico	<25	
1,2- Dihidroxibenceno (catecol)		850
3,4- Hidroxifenilalanina (dopa)		40
3,4- Dihidroxifeniletilamina (dopamina)		25
3,4- Dihidroxi ((metilamino)metil)-bencialcohol (epinefrina)		300
1-(3,4-Dihidroxifenil)-2 aminoetanol (norepinefrina)		100
<b>Compuestos trifenólicos</b>		
1,3,5- Trihidroxibenceno (floroglucinol)	<25	
1,2,3- Trihidroxibenceno (pirogalol)		12
3,4,5- ácido trihidroxibenzoico (ácido gálico)		25
Ácido gálico metil éster		30
Ácido gálico propil éster		80
Ácido gálico octil éster		5
Ácido gálico lauril éster		5
<b>Otros compuestos</b>		
Tirfostina 25		150
Genisteína		125

Según Lázaro *et al* 1995

### 1.3.2. Efecto sobre otros sistemas

El efecto de los derivados del ácido gálico, en concreto los ésteres sintéticos, no sólo se ha estudiado en la inhibición de PTK, sino también en otros sistemas enzimáticos. Por ejemplo **Abe et al (2000)** han demostrado que estos compuestos son capaces de inhibir la acción de la p-hidroxibenzoato hidrolasa y de la escualeno epoxidasa. Además estos compuestos también han sido utilizados como antifúngicos (**Kubo et al 2001**), y también como antiparasitarios (**Letelier et al 1990**). Una de los fenómenos adversos descritos ha sido su capacidad para inducir reacciones alérgicas (**Hausen et al 1992, Raccagni et al 1997**).

Puesto que algunos de los inhibidores clásicos de PTKs son capaces de inducir apoptosis, como es el caso de la Estaurosporina, en distintas líneas celulares (**Falcieri et al 1993**), es interesante saber si estos derivados del ácido gálico también pueden actuar de manera similar.

La apoptosis es el resultado de una cascada ordenada de sucesos celulares que se pueden agrupar en 3 fases (**figura 5**): Una *fase de iniciación* que cronológicamente es muy temprana en la que la célula recibe un insulto, al que responde activando una cascada de reacciones que pueden, eventualmente, conducir a la restauración de la normalidad. Si el insulto se mantiene o el daño es muy fuerte, el proceso de apoptosis continúa y la segunda fase se activa. Esta es la fase de iniciación donde la cascada de fosforilaciones en tirosina y serina/treonina de proteínas juega un papel importante.

El siguiente estadio es la *fase efectora*, en la que la mitocondria asume el papel central. Una vez que se ha desestabilizado el potencial de membrana y el citocromo-c y el AIF se liberan al citosol, se alcanza el punto de no retorno y la célula se compromete a morir. Por último nos encontramos con la *fase de degradación*, en la que se activa la cascada de caspasas, suceden grandes cambios morfológicos y la activación de endonucleasas produce el patrón clásico de degradación del DNA en bandas oligonucleosomales. **Inoue et al (1994)** han demostrado que el ácido gálico puede inducir apoptosis a través de un mecanismo no definido sobre la línea celular HL-60RG. Puesto que en nuestro laboratorio se habían estudiado la acción inhibidora sobre las PTKs en extractos crudos y enzimas purificados de bazo humano de distintos derivados del ácido gálico, se estudiará posteriormente el efecto de estos compuestos sobre la proliferación y apoptosis en distintas líneas celulares.

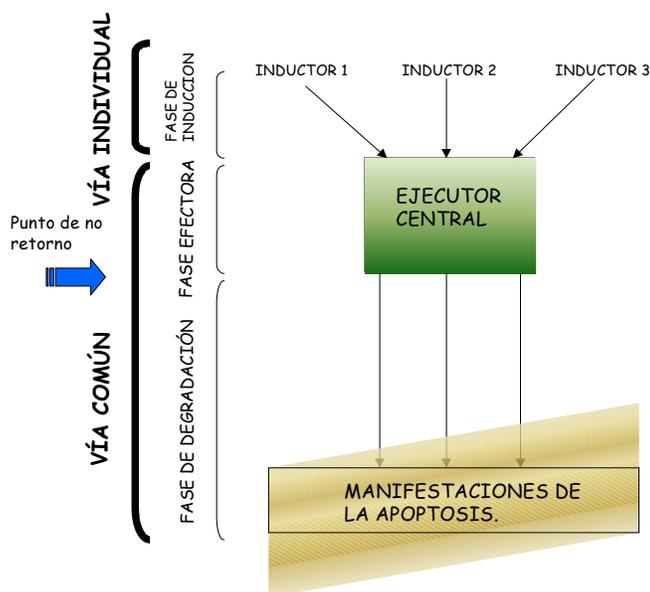


Figura 5. Fases del proceso de apoptosis

## 1.4. Potencial terapéutico de los inhibidores de PTKs

Dado que las PTKs están implicadas en aspectos importantes del tumor (crecimiento, supervivencia, metástasis y angiogénesis), es posible que sus inhibidores puedan ser utilizados con fines terapéuticos.

### 1.4.1 Ensayos en tumores experimentales

Entre los inhibidores de PTKs muchos de ellos se han sometido a estudios sobre tumores experimentales. En general los inhibidores más utilizados son los clásicos como la Herbimicina y las Genisteína, ya sea en estado libre o asociados a anticuerpos monoclonales (Uckun *et al* 1995). Puesto que estos compuestos inhiben a las PTKs inespecíficamente, en los últimos años se vienen diseñando inhibidores específicos para algunas PTKs, por ejemplo VHI-P131 para la inhibición de Jak-3, que es una PTK que se expresa abundantemente en leucemias linfoblásticas agudas (Uckun *et al* 1998), el SU5416 que inhibe a la PTK Flk-1 (Fong *et al* 1999). Constantemente están apareciendo nuevos inhibidores de PTKs, la mayoría tipo flavonoides (Genisteína), tiazolidinas y tirfostinas (Peyrade *et al* 1998; Novogrodsky *et al* 1998). También se han estudiado derivados del ácido gálico sobre la prevención de algunos tumores (Gali *et al* 1991), dado que muchos de estos compuestos se llevan utilizando desde hace años en la farmacopea tradicional.

Por tanto, es de interés ensayar si los derivados del ácido gálico estudiados en nuestro laboratorio durante años son capaces de

actuar sobre la inducción y la regresión de tumores en animales de experimentación.

#### 1.4.2 Ensayos clínicos

No son muchos los inhibidores de PTKs que se encuentran sometidos a ensayos clínicos. Entre ellos se halla la tirfostina conocida con el código STI571, este compuesto se utiliza para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (**Faderl *et al* 2000**). Otra tirfostina en ensayo clínico es AG 1571 (SU 5271) para el tratamiento de lesiones psoriásicas. Esta tirfostina parece inhibir la autofosforilación del receptor del factor de crecimiento endotelial y los sucesos de transducción de señal posteriores, la replicación del DNA, la progresión del ciclo celular a concentraciones de micromolar (**Ben-Bassat *et al* 2000**). También un derivado del ácido gálico obtenido del té verde (epigallocatequina-galato) (**Suganuma, M *et al* 1999**), se está utilizando en ensayos preclínicos como terapia en el carcinoma de células pequeñas de pulmón.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

Los objetivos principales que se plantearon para este trabajo fueron los siguientes:

2.1. Estudio de uno de los derivados del ácido gálico, el lauril galato, sobre la inhibición de la actividad PTK en extractos de células Wehi-231 así como en células Wehi-231 en cultivo.

2.2. Estudio de la acción de distintos derivados del ácido gálico sobre la proliferación de varias líneas celulares.

2.3. Estudio del LG sobre las distintas fases del proceso de apoptosis en células de linfoma B-murino (Wehi-231).

2.4. Efecto del lauril galato sobre la inducción y regresión de tumores de piel inducidos químicamente en ratones.

2.5. Síntesis de lauril galato radiactivo, estabilidad del compuesto y unión a proteínas séricas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. MATERIALES**

#### **Anticuerpos**

Monoclonal antifosfotirosina (1G2) (ATCCSD 990 USA) y RC20 (Transduction Laboratories); Fragmento de IgG de conejo frente a ratón peroxidado (BOEHRINGER MANHEIM); FITC-anexina V (Brand Applications); Monoclonal anti-citocromo-c (7H8.2C12, Pharmingen); Monoclonal anti-PARP (Clone C-2-10, Biomol)

#### **Sustratos de fosforilación**

Poly (Glu.Na, Tyr) 4:1 (Sigma)

#### **Placas de plástico**

ELISA: placas de poliestireno de 96 pocillos, MAXISORB, (NUNC). Cultivo celular: placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar)

#### **Sistema de aislamiento de RNA**

Promega RNA isolation system 751110.

## **Líneas celulares**

Linfocitos de sangre periférica humana obtenidos de donantes sanos. JY (linfoma de células B humano), K-562 (leucemia mieloide crónica humana), MOLT-4 (leucemia linfoblástica aguda humana), HT29 (adenocarcinoma de colon humano), Daudi (linfoma de Burkitt humano), Wehi-231 (linfoma de células B murino Balb-c), L929 (fibroblastos murinos c34/An), EAT (Ascitis del tumor de Ehrlich y X-653 (mieloma de ratón P3X63Ag8.653), Wehi-neo y Wehi-bcl2 (cedidas por Dr. Stanley J. Korsmeyer de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington, St. Louis, MO).

## **Aparataje**

Fotómetro de 8 canales Multiskan Titertek (Flow); Columnas para cromatografía (Pharmacia, Bio-Rad); Bombas peristálticas (Minipuls 3-GILSON); Colector de fracciones Redi Frac (Pharmacia), Columna de FPLC Superdex® 200 HR 10/30 (Pharmacia Biotech), Placas (HPTLC) de gel de sílice (Merck); Espectrofotómetro (Zeiss); Espectrofluorímetro MQ3 (Zeiss); Cubeta para electroforesis Mini- Slab (Bio-Rad); Cubeta para electroforesis de proteínas (Bio-Rad). Fuente alimentadora (LKB); pHmetro micropH 2001 (Crison); Centrífuga refrigerada RC-3 (Sorvall); Centrífuga de alta velocidad Centrikon T-124 Rotor A 8.24; Balanza y microbalanza (Sartorius);

Transferencia en semiseco JKA (Biotech); Capilares de vidrio de 5  $\mu$ l (Sigma); Cubeta para cromatografía en capa fina (Sigma).

### **Productos químicos**

Lauril galato, octil galato, propil galato (Fluka); ácido gálico, metil galato, tanino (Sigma); yoduro de 3,3'-dihexil-oxocarbocianina (DIOC<sub>6</sub>(3), Molecular Probes); Genisteína y Herbimicina A, sustrato de caspasa 3 (DEVD-AFC) (Calbiochem); Agua oxigenada (Merck); OPD (Sigma); BSA (Sigma). Tween-20 (Sigma); Hepes (Sigma); ATP (Pharmacia); BCIP/NBT (Bio-Rad); EGTA (Sigma); Conjunto de reactivos para inmunodetección por quimioluminiscencia (Amersham); MgCl<sub>2</sub> y MnCl<sub>2</sub> (Merck); CoCl<sub>2</sub> (Sigma); Conjunto de patrones preteñidos de amplio rango y kaleidoscope (Bio- Rad); Placas de agarosa para IEF de rango de pH de 3-10 (Bio Whittaker Molecular Applications); hexano, ácido acético, acetona, dioxano, tolueno, xileno, benceno (Merck); lauril alcohol (Sigma); lauril alcohol [1-<sup>14</sup>C] (American Radiolabeled Chemicals Inc.); Conjunto de calibración para determinaciones pI (amersham pharmacia biotech); octil- $\beta$ -D-glucopiranosido (Sigma).

### **Animales**

Ratones blancos IRC (Charlie River Laboratories)

## **Enzimas**

Conjunto de lipasas y esterases (Chirazyme, BOEHRINGER MANNHEIM)

## **Otros**

Membrana de PVDF (Millipore), Sistemas de ultrafiltración (Amicon).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Cuantificación de proteínas

Se emplearon dos métodos:

1. Biuret, como se describe en **Reinhold (1983)**
2. Absorbancia a 280 nm, considerado como unidad de densidad óptica (1 OD), a la cantidad de proteína que en solución posee una absorbancia de 1.0 medida en un espectrofotómetro Zeiss y en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### 3.2.2. Ensayo de PTK por ELISA

#### *Etapa 1: Fijación del sustrato*

A cada pocillo se le añade 100  $\mu$ l de PBS conteniendo 1  $\mu$ g del sustrato GT 4:1. Tras una noche de incubación a 4°C, se bloquea la placa con 200  $\mu$ l por pocillo de BSA 10 mg/ml en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se lava por inmersión en PBS 5 veces.

#### *Etapa 2: Reacción de fosforilación.*

A cada pocillo se le añade 50  $\mu$ l de la mezcla de reacción doblemente concentrada (100 mM HEPES pH 7.4; 2 mM  $\text{CoCl}_2$ ; 60  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 600

$\mu\text{M}$  ATP) y 50  $\mu\text{l}$  del extracto de PTK a la dilución apropiada. Las concentraciones finales son de 50 mM Hepes, 1 mM  $\text{CoCl}_2$ , 30  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 300  $\mu\text{M}$  ATP. En algunas ocasiones se utilizó  $\text{MgCl}_2$  o  $\text{MnCl}_2$ . Después de incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, las placas se lavaron por inmersión en PBS Tween-20 0.1% 5 veces.

*Etapa 3: Adición del anticuerpo antifosfotirosina, y de la IgG de carnero antiratón marcada con peroxidasa.*

A cada pocillo se le añade 100  $\mu\text{l}$  de PBS Tween-20 0.1% BSA 10 mg/ml conteniendo el anticuerpo monoclonal antifosfotirosina a una concentración de 250 ng/ml, y fragmento Fab de IgG de carnero marcados con peroxidasa a una dilución de 1/8000. Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lava como en la etapa 2.

*Etapa 4: Adición del sustrato de la peroxidasa.*

A cada pocillo se le añade 100  $\mu\text{l}$  de una solución 3 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 10 mM o-fenilendiamina (OPD) en tampón citrato 0.1 M pH 5.5, y se incuba hasta que se desarrolla color. La reacción se para por adición de 100  $\mu\text{l}$  de 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y se lee el color a 492 nm en un espectrofotómetro multicanal.

3.2.3. Ensayo de actividad PTK de extractos crudos de células Wehi-231.

Alícuotas de lisados (1 % octilglucósido en PBS) correspondientes a 30000 células se incuban siguiendo el método expuesto en 3.2.2.

3.2.4. Condiciones estándar de cultivos celulares

Las células Wehi 231, Wehi-neo y Wehi-bcl-2 se cultivan ( $10^5$  células/ml en 200  $\mu$ l/pocillo) en RPMI 1640 suplementado con 2 mM L-glutamina, 10% suero de ternera fetal (FCS), 50  $\mu$ g/ml ampicilina, 50  $\mu$ g/ml cloxacilina, 50  $\mu$ g/ml gentamicina, y 50  $\mu$ M mercaptoetanol a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Los efectos del LG a largos periodos de incubación (máximo 24 h) se estudian bajo las condiciones estándar. Para estudios en periodos cortos de tiempo (máximo 1 h), las células se incuban en PBS en presencia de cantidades crecientes de LG a los tiempos que se indican en las figuras correspondientes.

Para el resto de las líneas celulares las condiciones son las estándar sin 50  $\mu$ M 2-mercaptoetanol. Los PBL se cultivan a una densidad celular de  $10^6$  células/ml en 200  $\mu$ l/pocillo y se estimulan con PHA a una concentración de 40  $\mu$ g/ml. L929, EAT, X-653, y HT29 se cultivan a  $10^5$  células/ml en medio esencial mínimo Eagle modificado Dulbecco (DMEM).

JY, K562, MOLT-4 y células Daudi se siembran a una densidad de  $3.10^5$  células/ml en RPMI 1640.

### 3.2.5. Ensayo de proliferación celular

Las células se cultivaron por triplicado en presencia de diferentes compuestos en placas de microcultivo (200  $\mu$ l/pocillo, 96 pocillos). El número de células viables (media de triplicados) se evalúa a las 72 h de cultivo por la conversión MTT en el ensayo de azul de formazán (**Hansen et al 1989**), y los valores que se obtienen se relacionan con los controles sin tratar (100% de proliferación). Los pocillos con el mismo número de células que las inicialmente sembradas representa una proliferación de 0%. Todos los derivados del ácido gálico se añaden de una solución stock en PBS, excepto el propil, octil y lauril galato que se disuelven en etanol. El máximo de concentración de etanol en el medio de cultivo nunca supera el 0.01%.

### 3.2.6. Electroforesis en geles de acrilamida.

La electroforesis se realizó según el método de **Laemli (1970)**

### 3.2.7. Isoelectroenfoque en placas de agarosa

Se emplean placas comerciales con rango de pH de 3 a 10, siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial.

### 3.2.8. Electrotransferencia de proteínas a membranas de PVDF

El gel de acrilamida se transfiere a una membrana de PVDF mediante un sistema de transferencia semiseco JKA (Biotech). El tampón de transferencia utilizado es 50 mM Tris, 40 mM Glicina, 0.037% SDS, 20% metanol. La transferencia se realiza aplicando una corriente constante de 0.8 mA/cm<sup>2</sup> de gel durante una hora a temperatura ambiente.

### 3.2.9. Inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina

Las proteínas fosforiladas en tirosina separadas por electroforesis sobre un gel de acrilamida al 12% PAGE-SDS, y transferidas a una membrana de PVDF, se detectan por medio del anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina RC20. Todo el procedimiento se lleva a cabo siguiendo el protocolo N°. 1 para Western blotting con conjugados de peroxidasa proporcionado por Transduction Laboratories.

### 3.2.10. Análisis de la fragmentación de DNA

Las células se resuspenden en 20  $\mu$ l de tampón de lisis ( 0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 0.8% w/v de lauril sarcosinato sódico), se incuba con 10  $\mu$ l de RNasa A (10 mg/ml durante 1 h a 37°C) y posteriormente se incuba de nuevo durante 2 h a 50°C con 10  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ml). Después de la extracción del DNA con fenol/cloroformo, las muestras se someten a un gel de electroforesis horizontal en agarosa (Shi *et al* 1990) y se visualizan por bromuro de propidio y luz UV.

### 3.2.11. Análisis citofluorimétrico

Todos los estudios se llevan a cabo en un citómetro de flujo FACScan de Beckton-Dickinson. El contenido en DNA se mide por medio de la tinción con yoduro de propidio (PI) de células permeabilizadas con etanol seguido del análisis citofluorimétrico del ciclo celular. El índice de muerte celular se mide a través de la captura de PI.

### 3.2.12. Exposición de fosfatidil serina a la superficie celular

Se mide utilizando el conjugado del Anexina V-FITC. El marcaje se lleva a cabo durante 15 minutos a 4°C a una concentración de Anexina V-FITC de 1  $\mu$ M/ml en 10 mM Hepes, pH 7.5, 25 mM CaCl<sub>2</sub> y 150 mM NaCl.

### 3.2.13. Medida del potencial de membrana mitocondrial

El potencial transmembrana mitocondrial se mide utilizando el fluorocromo catiónico lipofílico DIOC<sub>6</sub>(3). Previo al análisis, las células se incuban con 40 nM DIOC<sub>6</sub>(3) en PBS a 37° C durante 15 minutos y la fluorescencia se mide a 525 nm en el citómetro de flujo.

### 3.2.14. Liberación del citocromo-c al citosol

El efecto del LG sobre la liberación del citocromo-c al citosol desde la mitocondria al citoplasma se estudia siguiendo la metodología descrita por **Wolf *et al* (1999)**, con mínimas modificaciones. Tras la incubación de las células en presencia de 10 µM LG en medio completo suplementado con 10% FCS durante los tiempos que se indican en la figura del apartado 4.4.3. de resultados, las células se centrifugan y el botón celular se resuspende y se incuba a 37°C durante 20 minutos en presencia de estreptolisina O (60 U/10<sup>6</sup> células) en un tampón que contiene 20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 250 mM sacarosa, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 1mM DTT, 0.1 mM PMSF, 5 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml de leupeptina, y 2 µg/ml de aprotinina. La mezcla de incubación se centrifuga a 16000g durante 20 minutos a 4° C, el sobrenadante citosólico se somete a PAGE-SDS al 15% de acrilamida, y las proteínas se electrotransfieren a una membrana de PVDF. Seguidamente la

membrana se bloquea con PBS, 0.1% Tween, 5% leche desnatada (PBSTM) durante 1 h a temperatura ambiente. La membrana se incuba posteriormente con un anticuerpo monoclonal anti-citocromo-c a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBSTM durante 1 h. Después del lavado con PBST se incuba con IgG de carnero anti-ratón marcada con peroxidasa a una dilución de 1/10 000 en PBSTM. La actividad peroxidasa se detecta utilizando el kit de quimioluminiscencia (ECL) de Amershan siguiendo las instrucciones del proveedor.

### 3.2.15. Ensayo para la determinación de la actividad de caspasa-3

Las células ( $10^6$ ) se incuban en 1 ml de medio completo suplementado con 10% de FCS y 10  $\mu\text{M}$  LG durante los tiempos que se indican en la figura 12 de resultados. El botón celular obtenido por centrifugación se resuspende en 0.1 ml de tampón de lisis frío (25 mM Hepes pH 7.0, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 10  $\mu\text{M}$  digitonina) durante 10 minutos. Posteriormente se centrifuga a 4° C durante 20 minutos a 12000g. La actividad de caspasa 3 se mide tras la adición de 50  $\mu\text{l}$  de sobrenadante con 50  $\mu\text{l}$  de 0.5 mM DEVD-AFC y 400  $\mu\text{l}$  de 25 mM Hepes, pH 7.0, 5 mM EDTA, 2 mM DTT. Después de incubar durante 15 minutos a 37° C, se mide la fluorescencia en un espectrofluorímetro (excitación a 400 nm y emisión a 505 nm)

### 3.2.16. Hidrólisis de la Poli(ADP ribosa) polimerasa (PARP)

Las células ( $10^6$ ) se incuban con 10  $\mu$ M LG en medio de cultivo completo suplementado con 10% FCS a distintos tiempos y posteriormente se lavan con PBS, se lisan con 50  $\mu$ l de tampón de lisis PAGE- SDS (0.05 M Tris-HCl 10% glicerol, 2% SDS, 6% mercaptoetanol, 0.003% azul de bromofenol), y se someten las muestras a electroforesis en un gel del 12% de acrilamida (PAGE-SDS). Posteriormente se transfiere a una membrana de PVDF, y se analiza con un monoclonal anti-PARP a una dilución de 1/5000 detectándose por quimioluminiscencia (ECL).

### 3.2.17. RT-PCR para mRNA de Bcl-2

El RNA total se extrae utilizando el método de isotiocianato de guanidinio siguiendo las instrucciones del kit de aislamiento de RNA de Promega. Los niveles de mRNA y de Bcl-2 se evalúan mediante PCR transcryptasa inversa semicuantitativa usando el oligo-d(T)15 como iniciador de la reacción de síntesis del cDNA. La amplificación de la PCR se lleva a cabo usando el oligo-5' (1171-1150 pb) y el oligo 3' (1586-1608 pb) como iniciadores (número de acceso al banco de secuencias de genes humanos n° X064487) bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos a 96° C, 1 minuto; 65° C, 1 minuto; 72° C, 1 minuto. El producto de la PCR se analiza en un gel al 1% agarosa y se visualiza bajo luz ultravioleta. Como

control interno para confirmar la especificidad del fragmento amplificado se utilizó una sonda GAPDH (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa).

3.2.18. Protocolo de inducción de tumores por agentes químicos sobre ratones IRC.

Debido a que este protocolo es uno de los objetivos de este trabajo se desarrollará posteriormente en el apartado 4.5 de resultados.

3.2.19. Síntesis química del LG-<sup>14</sup>C

Puesto que la puesta a punto de esta síntesis ha sido uno de los objetivos de este trabajo, las condiciones del método vienen descritas en la sección de resultados (4.6.2.)

3.2.20. Purificación del compuesto de síntesis

Para purificar este compuesto se ha puesto a punto un método de cromatografía en capa fina utilizando como disolventes hexano/acetona/acético (50/50/0.625). Una vez que se han separado los

distintos compuestos de síntesis, la placa de gel de sílice se autorradiografía obteniéndose dos bandas de radiactividad, una que corresponde al lauril alcohol que no ha reaccionado y otra que corresponde al lauril galato de síntesis. Posteriormente se rasca la banda de la placa de sílice que corresponde al lauril galato y se extrae el compuesto tras varios lavados con etanol absoluto.

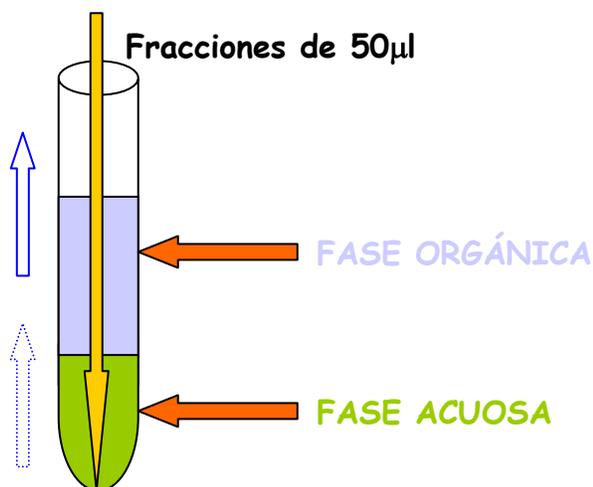
### 3.2.21. Caracterización del compuesto

Debido a que la caracterización del compuesto es una de las finalidades de este estudio, las condiciones del protocolo se describen en la sección de resultados (4.6.4).

### 3.2.22. Estudio de sistema de reparto

Se toman 2.5  $\mu\text{l}$  de una solución de LG de síntesis (5  $\mu\text{M}$ / 15 000 cpm) y se le añaden 47.5  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato 50 mM. A estos 50  $\mu\text{l}$  totales se le añaden 200  $\mu\text{l}$  de las distintas fases acuosas a estudio ( $\text{H}_2\text{O}$ , HCl 0.1 N, NaOH 0.1N). Sobre la fase acuosa se añaden 500  $\mu\text{l}$  de hexano como fase orgánica. Los tubos se agitan y se centrifugan para diferenciar bien las dos fases. Se toman fracciones de 50  $\mu\text{l}$  comenzando por la fase

acuosa como indica la **figura 1**, y cada fracción se lleva a tubos de centelleo para posterior contaje.



**Figura 1. Método de extracción de las distintas fracciones en un sistema de reparto**

### 3.2.23. Ensayo de lipasas y esterases y compartimentación celular del compuesto

Sobre 950 µl de una solución albúmina a una concentración de 20 mg/ml se le añaden 50 µl de LG\* [0.5 mM]. Después de 24 horas de incubación se añaden 900 µl de esta mezcla sobre 9.1 ml de RPMI suplementado con Gln y antibióticos. La concentración final a la que se encuentra la

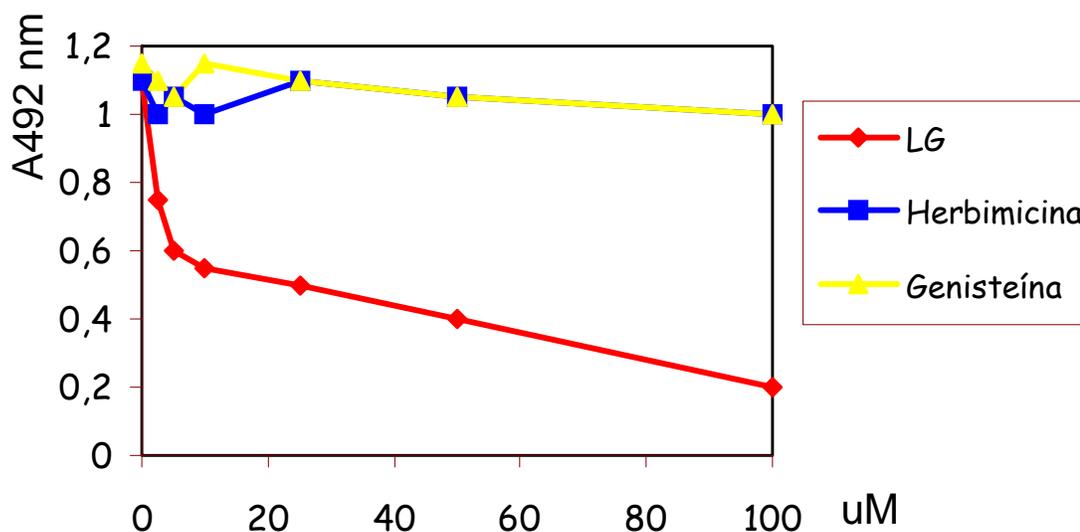
albúmina es de 33  $\mu\text{M}$  y la de  $\text{LG}^*$  de 2.5  $\mu\text{M}$  en este medio completo modificado ( $\text{MC}_m$ ). El efecto de lipasas y estererasas sobre el compuesto así como la compartimentación celular se ha llevado a cabo según se especifica en los apartados 4.6.6. y 4.6.8. de resultados.

## **RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Inhibición de PTK en extractos crudos de células Wehi-231.

En estudios anteriores en el laboratorio se había observado que los derivados del ácido gálico y especialmente el LG eran potentes inhibidores de PTKs tanto en extractos crudos de bazo, como purificadas (c-Src de plaquetas). En el presente trabajo se propuso estudiar el efecto de este compuesto sobre la línea celular Wehi-231 tanto desde el punto de vista de su acción sobre las células en cultivo, como en extractos celulares. Como se puede apreciar en la **figura 1** el LG inhibe la fosforilación del sustrato artificial poli(Glu, Tyr 4:1) unido a una placa de micro ELISA por las PTKs presentes en extractos crudos de células Wehi 231. En la gráfica se puede también observar que el LG muestra una actividad inhibidora muy superior a la que otros inhibidores clásicos de PTKs como la Herbimicina A y la Genisteína ejercen sobre estas enzimas. Mientras que el LG muestra una  $I_{50}$  alrededor de  $10\mu\text{M}$ , la Herbimicina A y la Genisteína solamente producen una ligera inhibición (alrededor del 10%) cuando se ensayaron a concentraciones superiores ( $100\mu\text{M}$ ).



**Figura 1. Inhibición de PTK en extractos crudos de Wehi 231.** La actividad PTK se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2.

- ◆ Inhibición por LG
- Inhibición por Herbimicina
- ▲ Inhibición por Genisteína

#### 4.2. Efecto sobre el estado de fosforilación en tirosina de células Wehi 231 en cultivo.

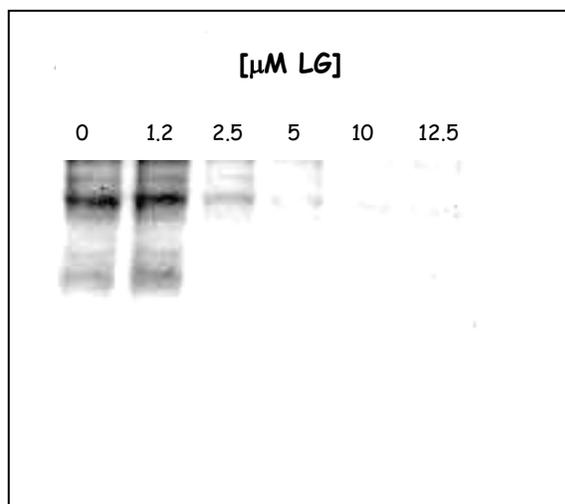
Para evaluar la acción inhibitoria del LG sobre las PTKs de células en cultivo, se analizó el contenido total de proteínas fosforiladas en tirosina presentes en lisados de células cultivadas en presencia de LG y posteriormente estimuladas con dos tipos distintos de estímulos. En el primer caso las células fueron tratadas con pervanadato, que es un

inductor general de fosforilación en tirosina. En el segundo las células fueron estimuladas con anti-IgM, que es un inductor característico de apoptosis en este tipo de células ya que presentan IgM de superficie. La **figura 2.A** muestra el efecto del tiempo de incubación en presencia de una concentración fija de 10 $\mu$ M LG sobre el contenido de proteínas fosforiladas en tirosina de células Wehi-231 posteriormente estimuladas durante 5 minutos con 1mM pervanadato. El efecto inhibitorio sobre la fosforilación de proteínas en tirosina por LG se puede observar después de 15 minutos y es prácticamente total en torno a 1 hora. La **figura 2.B** muestra que tanto la Genisteína como la Herbimicina A no se comportan como buenos inhibidores a concentraciones de 50  $\mu$ M.

Los sucesos iniciales de señalización activados por el entrecruzamiento del receptor de células B implican la activación de las PTKs. La **figura 2.C** muestra que el LG (concentración fija 10  $\mu$ M) también es capaz de inhibir la fosforilación en tirosina inducida por anti-IgM. Se puede observar que este es un fenómeno temprano que ya comienza a detectarse a los 5 minutos, alcanza un máximo a los 15 minutos, y se mantiene al menos hasta los 30 minutos. Para todos los tiempos ensayados la acción inhibitoria del LG se hace evidente.

**Figura 2. Inhibición de PTK en células Wehi 231.** (A) Efecto del LG en función del tiempo sobre la fosforilación en tirosina inducida por pervanadato. (B) Comparación del efecto entre herbimicina, Genisteína y LG sobre proteínas fosforiladas en tirosina inducida por pervanadato. (C) Efecto del LG sobre la fosforilación en tirosina inducida por anti-IgM. El lisado correspondiente a  $2 \times 10^5$  células se aplicaron en cada carril en presencia de SDS. El procedimiento seguido se explica en el apartado 3.2.9 de materiales y métodos

Este estudio se llevó a cabo sobre células incubadas en PBS y tiempo máximo de 1 hora durante el cual no se ve afectada la viabilidad celular como se verá posteriormente. Además de este tipo de ensayo se estudió también la inhibición de PTKs por parte del LG en células en cultivo en medio completo (suplementado con 10% FCS) durante 24 horas y concentraciones crecientes del LG. La **figura 3** muestra que las células tratadas bajo esas condiciones perdían gradualmente la capacidad de fosforilar en tirosina después de ser estimuladas con pervanadato, indicando que el LG también era un buen inhibidor de las PTKs en células Wehi-231 en cultivo. Se pudo apreciar que cuando las células se cultivan en presencia de FCS existe un retraso en la acción del LG, cuyo motivo se estudiará posteriormente (apartado 4.6.7.).



**Figura 3. Inhibición de las PTKs presentes en células Wehi 231 en cultivo.** Después de 24 h de cultivo en presencia de concentraciones crecientes de LG, las células fueron tratadas con 1mM pervanadato durante 5 minutos y posteriormente lisadas, las proteínas fosforiladas en tirosina fueron inmunodetectadas tras PAGE-SDS como se describe en el apartado 3.2.9 de materiales y métodos.

### 4.3. Efecto de los derivados del ácido gálico sobre el crecimiento celular en líneas tumorales y linfocitos humanos.

Puesto que se había detectado, en estudios anteriores, que el ácido gálico y especialmente sus ésteres, octil y lauril galato, mostraban gran poder inhibitorio sobre las PTKs de extractos crudos de bazo así como en células Wehi 231, se proyectó estudiar el efecto que distintos derivados del ácido gálico (metil, propil, octil, lauril galato, tanino) ejercían sobre el crecimiento de distintas líneas tumorales y de linfocitos humanos.

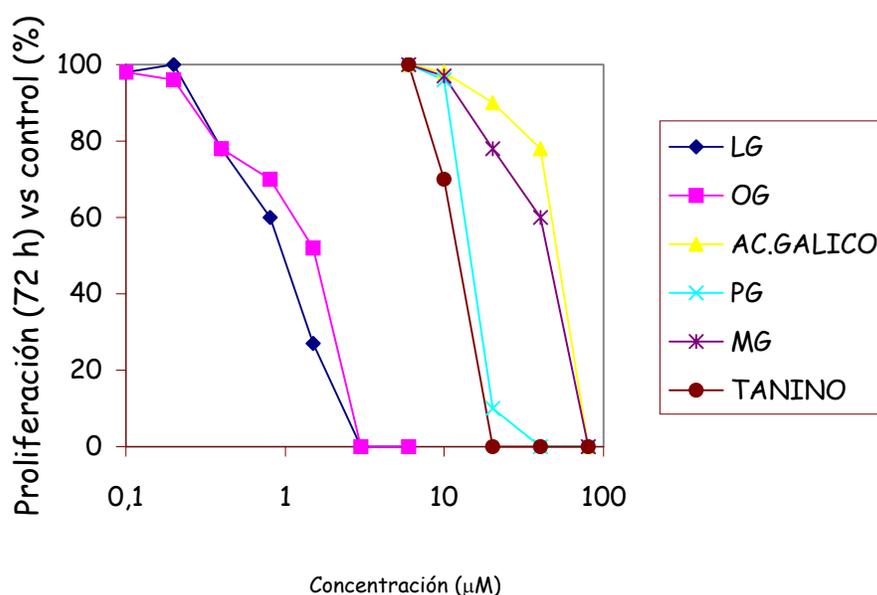
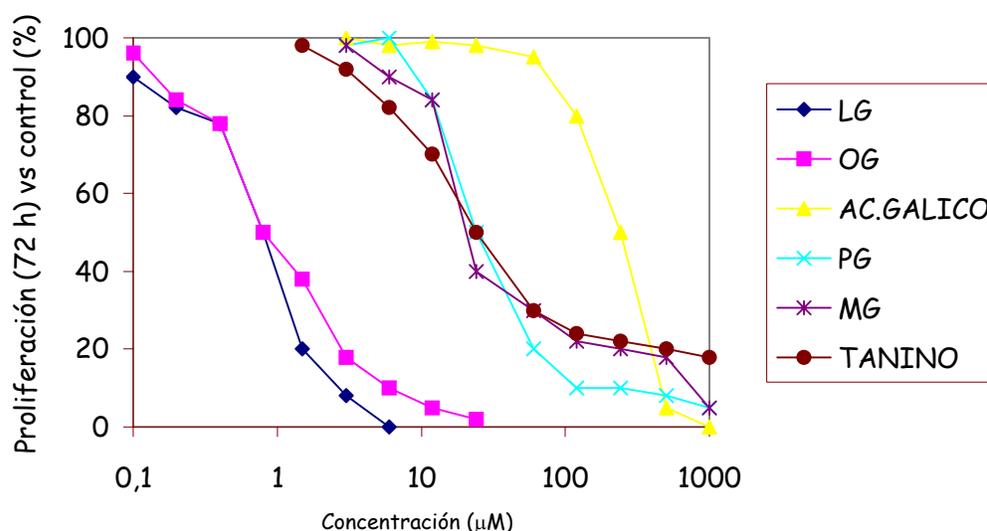


Figura 4. Inhibición de la proliferación de las células Wehi 231 por derivados del ácido gálico. Las células se cultivaron como se indica en el apartado 3.2.4. de materiales y métodos en presencia de concentraciones crecientes de los distintos compuestos.

La **figura 4** muestra el efecto de este tipo de compuestos sobre la línea Wehi 231. A medida que se aumentaban las concentraciones de los diferentes derivados del ácido gálico se pudo detectar su efecto claramente antiproliferativo. Como se puede observar existe una clara relación estructura-función con respecto a la hidrofobicidad de los compuestos, ya que a medida que aumentaba el tamaño de la cadena alifática la  $I_{50}$  disminuía ( $I_{50}$  de 40, 35, 12, 1.5 y 1  $\mu\text{M}$  para el ácido gálico y metil, propil, octil y lauril galato respectivamente). También el tanino, polímero del ácido gálico, mostraba un alto poder antiproliferativo presentando una  $I_{50}$  de alrededor de 9  $\mu\text{M}$ .

La **figura 5** muestra el efecto de estos mismos compuestos sobre la proliferación de la línea L929 (fibroblastos murinos).



**Figura 5.** Efecto de los derivados del ácido gálico sobre la línea celular L929 de fibroblastos murinos. Cada valor representa la media de un triplicado para cada concentración.

De nuevo, la influencia de la hidrofobicidad de la molécula jugaba un papel determinante sobre el potencial antiproliferativo, observando

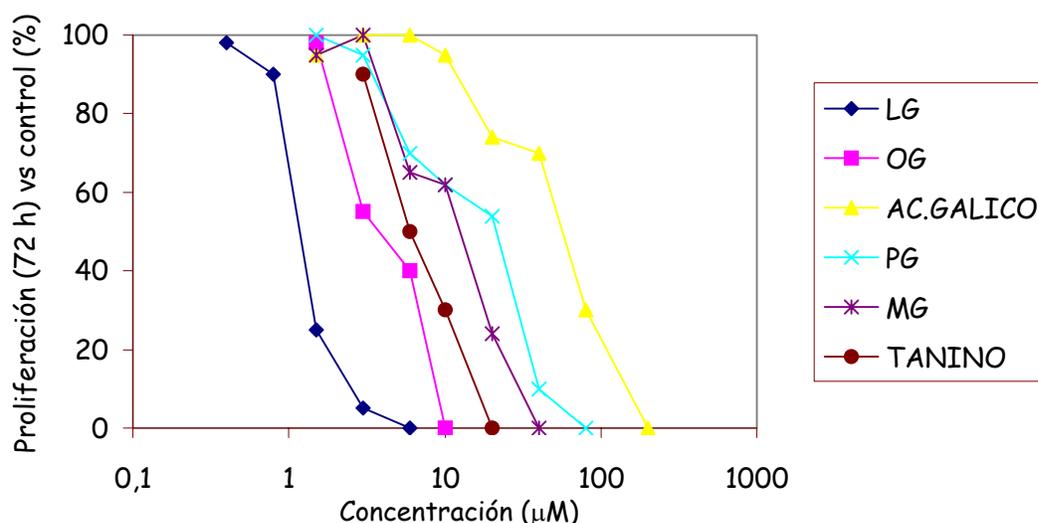
que la  $I_{50}$  de estos compuestos disminuía a medida que aumentaba la hidrofobicidad del mismo ( $I_{50}=250 \mu\text{M}$  para el ácido gálico;  $I_{50}=30-40 \mu\text{M}$  para el metil galato, propil galato y tanino; y  $I_{50}= 1 \mu\text{M}$  para el octil y el lauril galato). Dado que el LG es el que mostraba mayor actividad inhibitoria dentro de los compuestos ensayados, el siguiente paso fue investigar el efecto de este compuesto sobre el crecimiento de otras líneas celulares. Como se puede apreciar en la **tabla I** el crecimiento de todas las líneas fue inhibido por esta molécula, aunque existían diferencias en las concentraciones requeridas para producir el mismo efecto.

**TABLA I**

<b><math>I_{50}</math> DEL LG EN DISTINTAS LÍNEAS CELULARES</b>	
<b>Célula</b>	<b><math>I_{50}</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
JY	$1.2 \pm 0.2$
MOLT-4	$0.6 \pm 0.1$
Daudi	$1.4 \pm 0.2$
HT-29	$17.0 \pm 1.3$
K-562	$19.5 \pm 1.4$
Wehi 231	$0.8 \pm 0.1$
L929	$1.0 \pm 0.2$
EAT	$0.8 \pm 0.1$
X-653	$1.8 \pm 0.3$

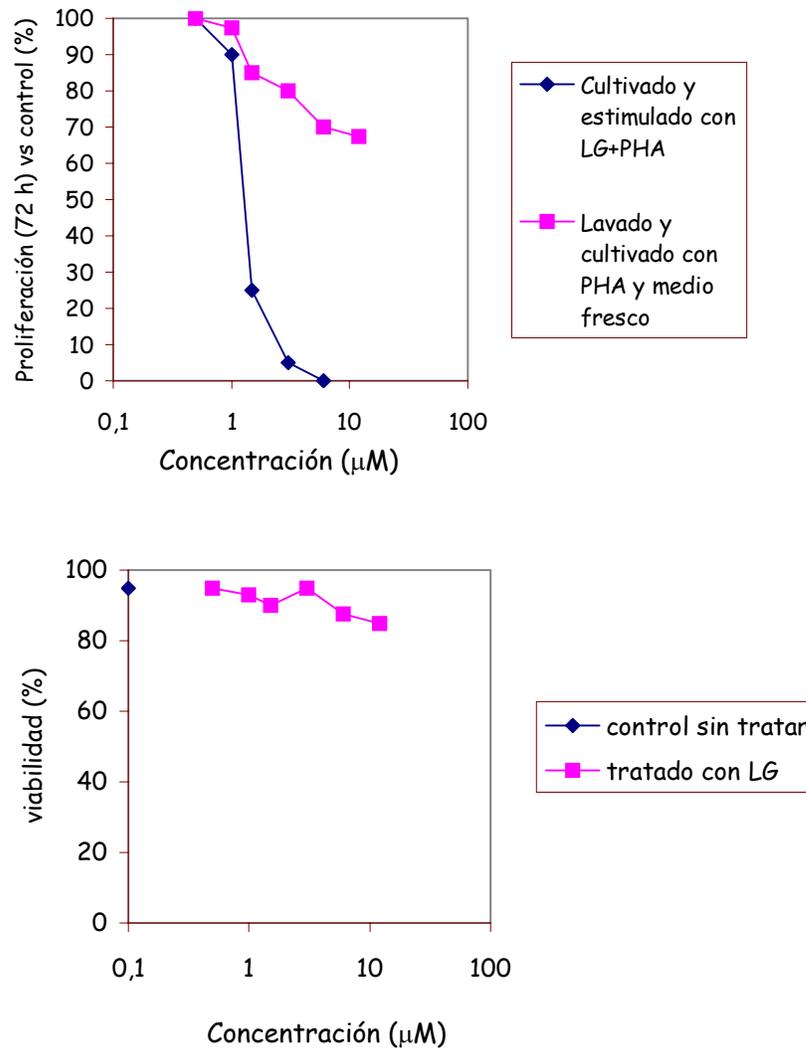
**TABLA I.** Los datos que se muestran en esta tabla son la media de triplicados de tres experimentos independientes en ensayos de proliferación evaluados a las 72 horas de cultivo con el ensayo MTT (ver apartado 3.2.5. de materiales y métodos).

Posteriormente se ensayaron estos compuestos sobre linfocitos de sangre periférica estimulados con PHA. Una vez más la relación estructura-función se hizo evidente. La **figura 6** muestra que a medida que aumentaba el número de carbonos de la cadena alifática en los derivados del ácido gálico, la  $I_{50}$  disminuía (1.5  $\mu\text{M}$  para el lauril galato y 150  $\mu\text{M}$  para el ácido gálico).



**Figura 6.** Efecto de los derivados del ácido gálico sobre linfocitos de sangre periférica. Cada valor representa la media de un triplicado para cada concentración.

El efecto del LG se hace evidente cuando los linfocitos son estimulados con PHA (**figura 7.A**), sin embargo los linfocitos incubados con LG en ausencia de PHA siguen manteniendo su viabilidad (por encima de un 70%) (**figura 7.B**) y su capacidad de proliferar.



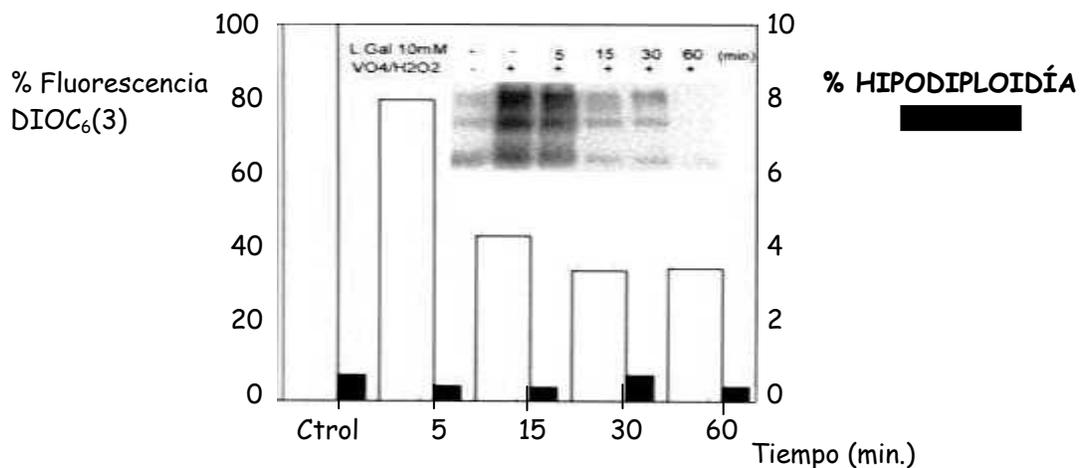
**Figura 7. A. Reversibilidad del efecto del LG sobre PBLs humanos.** PBLs en suspensión ( $10^6$  células/ml) fueron expuestas a distintas concentraciones de LG: Los PBLs expuestos 24 h a concentraciones crecientes de LG, se lavaron y posteriormente se cultivaron en medio fresco en presencia de PHA (+); Se incubaron con PHA (40 μg/ml) y LG simultáneamente (sin lavar) durante 72 horas (♦). **B. Viabilidad de los PBL humanos estimulados con PHA.** Después de 72 h expuestos a distintas concentraciones de LG, la viabilidad fue evaluada por exclusión de azul tripán (+). El símbolo (♦) a concentración cero representa la viabilidad del control sin tratar.

#### 4.4. Estudio de los mecanismos sobre los cuales el LG ejerce su acción.

##### 4.4.1. Efecto sobre el potencial de la membrana mitocondrial

Uno de los puntos clave del proceso de apoptosis donde convergen las distintas vías, de una gran variedad de inductores apoptóticos, es la función mitocondrial.

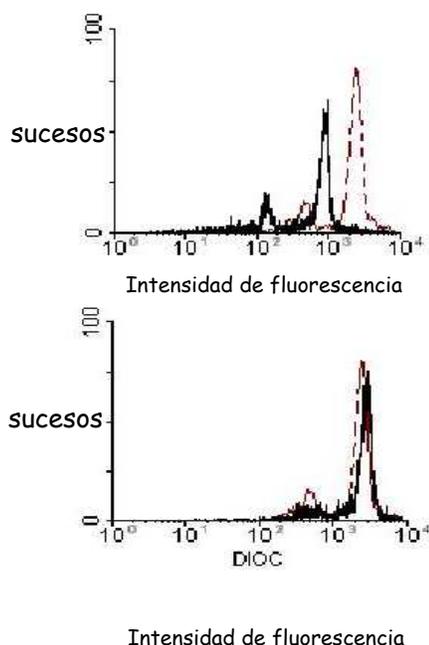
La **figura 8** muestra que células que fueron tratadas con 10 $\mu$ M LG durante los tiempos que se indican y después lavadas y cargadas con DIOC<sub>6</sub>(3), experimentaron un rápido descenso en la intensidad de fluorescencia, lo que indicaba que uno de los efectos tempranos que el LG ejercía sobre las células Wehi 231 era la despolarización de la membrana mitocondrial. Este estudio se llevó a cabo sobre esta línea celular en un periodo corto de cultivo en PBS (tiempo máximo de 1 hora).



**Figura 8.** Análisis cinético del efecto del LG sobre la integridad del potencial de membrana mitocondrial, inhibición de proteínas tirosín quinasa, y contenido de DNA hipodiploide de células Wehi 231. El experimento se llevó a cabo como se indica en el apartado 3.2.13. de materiales y métodos.

También se pudo observar que las señales nucleares de apoptosis (% hipodiploidía) no se hacían presentes durante los períodos de incubación con LG. Tiempos de incubación mayores (3-5 h) indujeron cambios morfológicos importantes, incluyendo la hidrólisis del DNA (apartado 4.4.5). El inserto de la **figura 8** muestra el efecto que el LG ejerce sobre la fosforilación de proteínas en tirosina inducida por pervanadato en células tratadas bajo las mismas condiciones (apartado 4.2). Se pudo observar un paralelismo cronológico entre la disrupción del potencial de membrana mitocondrial y la inhibición de la fosforilación de proteínas en tirosina.

Para comprobar si la Herbimicina y el LG compartían un mecanismo similar de acción, se comparó el efecto de ambos compuestos sobre la despolarización del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (**figura 9**)



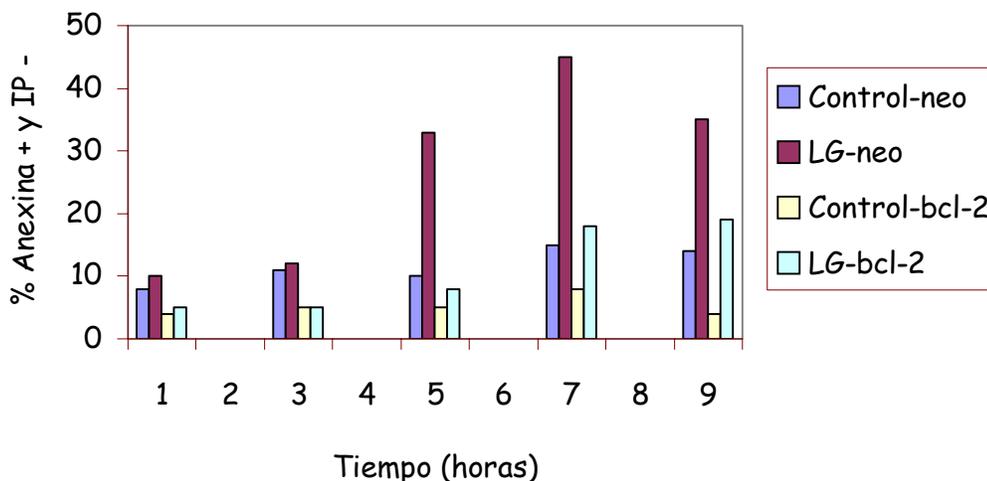
**Figura 9. Análisis comparativo de LG y herbimicina como agentes despolarizantes tempranos mitocondriales. A.** Se mantuvieron las células Wehi 231 en presencia de 10  $\mu$ M LG (—) o en ausencia (---) durante 30 minutos seguido de la carga del DIOC<sub>6</sub>(3) y análisis por citometría de flujo. **B.** Efecto de la herbimicina. Las células Wehi 231 fueron mantenidas en presencia de 25  $\mu$ M herbimicina (—) o en ausencia (---) durante 30 minutos y procesado como en el estudio con LG.

Mientras que el LG descargaba eficazmente el  $\Delta\Psi_m$ , no se pudo observar ningún efecto con Herbimicina, lo que hace pensar que los mecanismos de inducción de apoptosis de estos compuestos ocurren por distintas vías.

#### 4.4.2. Efecto sobre la expresión de fosfatidilserina en las membranas.

Una de las características del proceso de apoptosis es la pérdida de la asimetría con respecto a los fosfolípidos de la membrana celular. Cuando la célula se compromete a morir, uno de los efectos más tempranos es la exposición de la fosfatidilserina (PS) al exterior. El efecto del LG sobre la exposición de la PS se estudió en dos tipos de líneas celulares, una la Wehi-neo y otra la Wehi-bcl-2 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.12. de materiales y métodos. Esta última sobre-expresaba la proteína Bcl-2 cuya acción protectora en el proceso de apoptosis ya ha sido descrita por distintos autores.

Cuando se analizó el efecto que el LG provocaba sobre la expresión de PS en la superficie celular en ambos tipos de células, se pudo observar que éste es un efecto temprano dentro del proceso de muerte celular programada (**Figura 10**) que empezaba a ser visible a las 5 horas siendo máximo a las 7 horas para las células Wehi-neo mientras que era detectable entre las 7-9 horas para las Wehi-bcl-2.



**Figura 10. Efecto protector del Bcl-2 sobre la exposición de PS inducida por LG.** Las células Wehi-neo y Wehi-bcl-2 fueron tratadas con 10 $\mu$ M LG durante el tiempo indicado y el porcentaje de exposición en la superficie de PS se midió como se indica en el apartado 3.2.12. de materiales y métodos.

#### 4.4.3. Efecto sobre la liberación de citocromo-c al citosol

Diversos autores han demostrado que el paso siguiente a la despolarización mitocondrial es la liberación de citocromo c y del AIF al citosol (**Susin *et al* 1999**). Para estudiar si el LG era capaz de ejercer algún efecto sobre la liberación del citocromo-c se trataron las dos líneas anteriores (Wehi-neo/Wehi-bcl-2) con 10  $\mu$ M LG. Como muestra la **figura 11** el LG era capaz de inducir la liberación del citocromo-c al citosol, tanto en células Wehi-neo y Wehi-bcl-2, observándose un retraso de éstas últimas de entorno

a 2 horas, debido a un papel protector parcial de la integridad mitocondrial ejercido por Bcl-2.

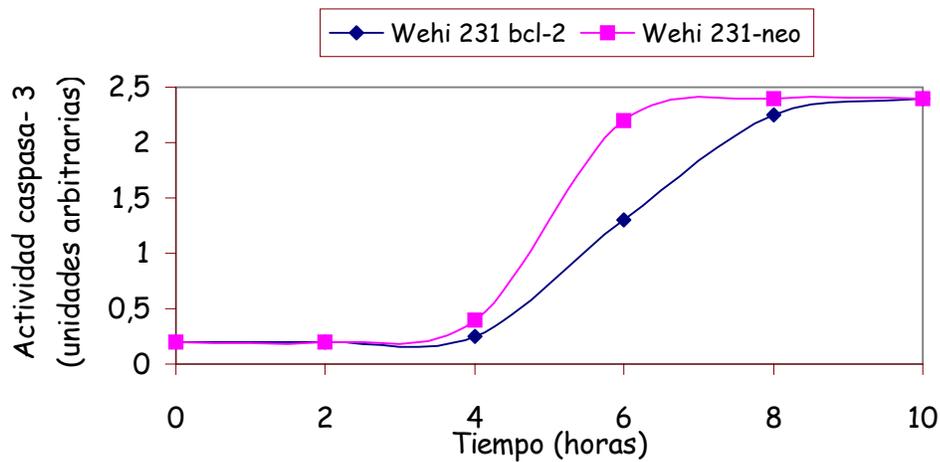


**Figura 11. Liberación del citocromo-c al citosol.** Las células Wehi-neo y Wehi-bcl-2 se cultivaron en medio completo en presencia de 10  $\mu$ M LG. A los tiempos indicados se obtuvieron extractos citosólicos de  $10^6$  células y el contenido de citocromo-c se analizó como se describe en el apartado 3.2.14. de materiales y métodos.

#### 4.4.4. Activación de caspasas

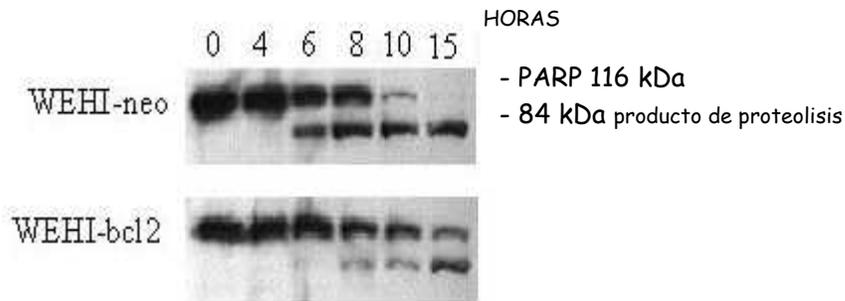
Es un fenómeno conocido que durante el proceso de apoptosis se activan gran número de caspasas. La **figura 12** muestra la actividad de caspasa-3 medida con el sustrato artificial DEVD-AFC en células Wehi-231-neo y células que sobre-expresaban Bcl-2 (Wehi-bcl-2) detectando un retraso de aproximadamente 2 horas en las células Wehi-bcl-2 frente a las células Wehi-neo. Al

igual que en los otros estudios (exposición de PS a la membrana, liberación del citocromo-c,...) el Bcl-2 ejercía un papel parcialmente protector para la célula.



**Figura 12. Ensayo de la actividad de caspasa-3.** A los tiempos que se indican las células ( $10^6$ ) se lisaron y la actividad caspasa se midió con DEVD-AFC como sustrato. El eje de las ordenadas representa unidades arbitrarias de fluorescencia (excitación 405 nm y emisión a 505 nm) como se describe en el apartado 3.2.15. de materiales y métodos.

También se estudió la hidrólisis de PARP que es un sustrato natural que representa uno de los estadios más tardíos en el proceso de apoptosis.

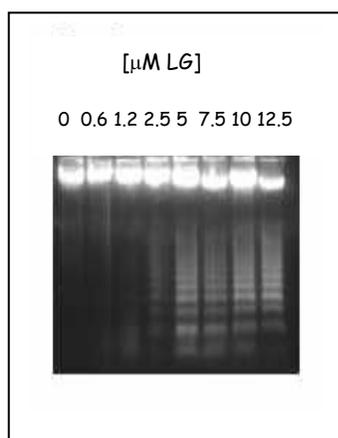


**Figura 13. Hidrólisis de la PARP.** A los tiempos que se indican las células ( $5 \cdot 10^5$ ) se lisaron y fueron sometidas a un PAGE-SDS. PARP y su producto de hidrólisis fueron tratados como se indica en el apartado 3.2.16. de materiales y métodos.

En la **figura 13** se observa que mientras que la hidrólisis de la PARP es claramente visible a las 6 horas y después de 10 horas el sustrato ha sido totalmente hidrolizado en las células Wehi-neo, solamente se observa alrededor de un 50% de hidrólisis después de 15 horas para las células Wehi-bcl-2.

#### 4.4.5. Activación de endonucleasas

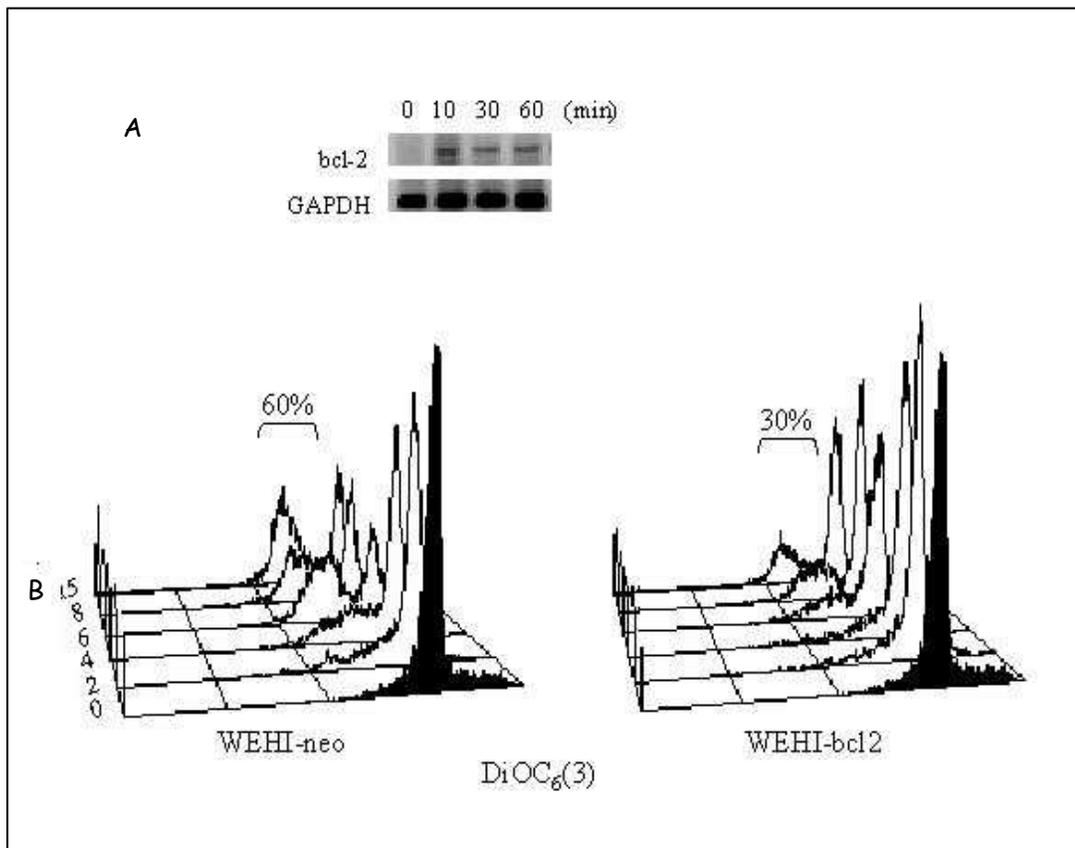
Otro de los ensayos que se llevó a cabo fue ver si este compuesto inducía la activación de las endonucleasas nucleares provocando la fragmentación del DNA en bandas oligonucleosomales. Siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.10. de materiales y métodos se observó que el LG, en efecto, inducía fragmentación del DNA como muestra la **figura 14**. Este efecto se hacía evidente a concentraciones superiores a 1-2 $\mu$ M y mostraba una relación dosis-efecto semejante al de la inhibición de PTKs (apartado 4.2.).



**Figura 14.** Análisis de la fragmentación de DNA de células Wehi 231 inducida por concentraciones crecientes de LG durante 24 h en cultivo.

4.4.6. Estudio del papel protector del Bcl-2 sobre la inducción de apoptosis por LG

Puesto que el Bcl-2 está también involucrado en la protección de la integridad mitocondrial, se estudió el efecto del LG sobre la expresión del m-RNA del Bcl-2 por RT-PCR (apartado 3.2.17. de materiales y métodos) semicuantitativa. Como muestra la **figura 15.A** en células en reposo prácticamente no se pudo detectar mRNA para Bcl-2, sin embargo después de la incubación con LG, el Bcl-2 se induce al máximo en minutos.



**Figura 15. Efecto protector del Bcl-2 sobre la inducción de la despolarización mitocondrial por LG.** (A) Inducción del m-RNA para Bcl-2 después de la exposición con LG 10  $\mu$ M a distintos intervalos de tiempos. (B) Cinética de la despolarización mitocondrial inducida por LG sobre células Wehi-neo y Wehi-Bcl-2. Las células fueron incubadas en medio completo en presencia de 10 $\mu$ M LG a los tiempos que se indican, seguido de la carga con DiOC<sub>6</sub>(3) y análisis citofluorimétrico.

También se estudió el efecto que causaba el LG sobre células Wehi 231 que sobre expresaban Bcl-2 (Wehi 231-bcl-2) y células transfectadas con un vector vacío para bcl-2 (Wehi 231-neo). La concentración a la que se utilizó el compuesto fue de 10  $\mu$ M. El estudio se llevó a cabo a distintos tiempos y se analizó el efecto que este compuesto tenía sobre la integridad mitocondrial, hipodiploidía, exposición de PS y liberación del citocromo-c. Ya hemos visto anteriormente que tanto la exposición de la PS y la liberación del citocromo-c en las células Wehi-bcl-2 sufrían un retraso frente a los mismos efectos causados por LG en las células Wehi-neo (apartados 4.5.2 y 4.5.3 respectivamente). El estudio de la integridad mitocondrial (**figura 15.B**) no mostró una disminución en la carga de DIOC<sub>6</sub>(3) en las células Wehi-neo hasta las 7 horas de exposición al LG. Sin embargo, las células Wehi-bcl-2 mantenían su integridad mitocondrial hasta al menos las 12 horas de exposición.

Otro objetivo fue estudiar las variaciones del contenido de DNA (hipodiploidía) inducidas por LG en ambos tipos de células. Mientras que en torno al 20% de las células Wehi-neo mostraban señales de hipodiploidía a las 6 horas y más del 50% a las 8 horas, sólo un 15% de las células Wehi-bcl-2 mostraban estas señales después de las 8 horas de incubación en presencia del compuesto (**figura 16**).

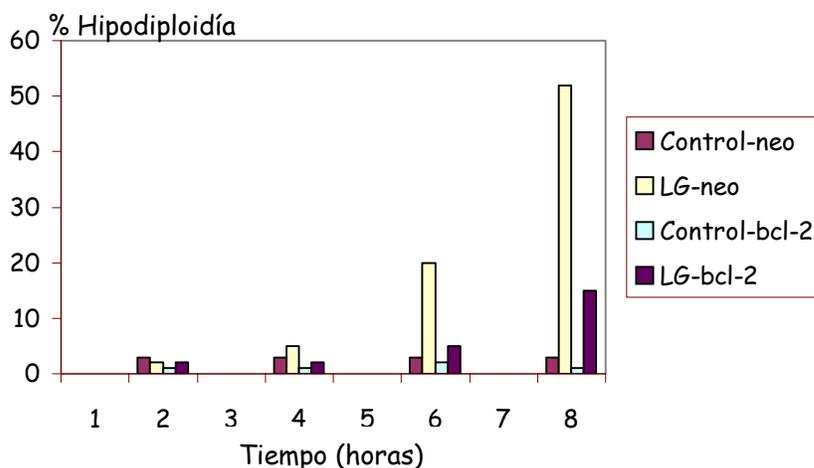


Figura 16. Efecto protector del Bcl-2 sobre la hipodiploidía inducida por LG.

#### 4.5. Efecto del lauril galato sobre tumores inducidos por agentes químicos sobre ratones IRC.

Puesto que el LG era capaz de inducir apoptosis en líneas tumorales, el siguiente paso que se planteó fue el estudio del efecto de este compuesto sobre tumores experimentales inducidos químicamente en ratones IRC.

##### 4.5.1. Inducción de tumores por DMBA + PMA en acetona.

50 ratones (25 machos/ 25 hembras) se dividieron en distintos grupos como se indica en la **tabla II**. Como inductor se utilizó 7,12-dimetilbenzan(a)antraceno (DMBA) y como mitógeno PMA

(forbol miristato acetato) siguiendo el protocolo descrito por **Segal et al (1978)**.

En primer lugar se individualizaron los ratones, se rasuraron en la zona del cuello (entre las orejas) y se aplicó tópicamente el DMBA a la concentración que se muestra en la **tabla II**. El disolvente utilizado para solubilizar estos compuestos fue acetona.

Tras quince días sin ningún tipo de tratamiento se comenzó a aplicar tópicamente el PMA junto con el LG a distintas concentraciones (2.5, 10, 50  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  por aplicación) 3 veces por semana. Al quinto grupo de ratones solamente se le aplicó el PMA. La **figura 17** muestra un esquema del protocolo seguido para la inducción de estos tumores.

TABLA II

Nº RATONES 50% M- 50% H	Tratamiento primario	Tratamiento secundario
8	DBA 25 $\mu\text{g}$	PMA 5 $\mu\text{g}$ + acetona
8	DBA 25 $\mu\text{g}$	PMA 5 $\mu\text{g}$ + LG 2.5 $\mu\text{g}$
8	DBA 25 $\mu\text{g}$	PMA 5 $\mu\text{g}$ + LG 10 $\mu\text{g}$
8	DBA 25 $\mu\text{g}$	PMA 5 $\mu\text{g}$ + LG 50 $\mu\text{g}$
18a	DBA 25 $\mu\text{g}$	PMA 5 $\mu\text{g}$

a: este grupo de ratones se utilizará para estudios con LG tras formación del tumor

También se indujeron tumores sobre un grupo de ratones (ratones control) a los que solo se les trató con PMA.

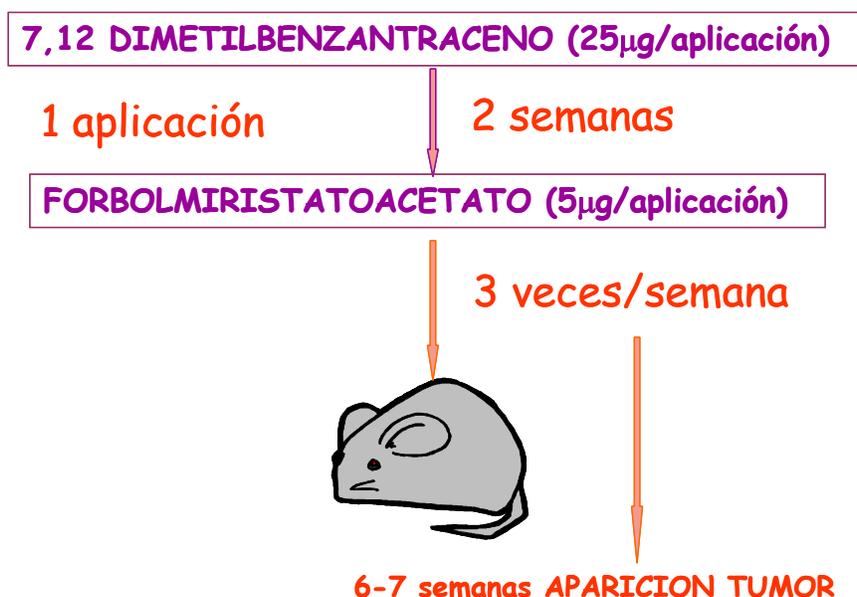


Figura 17. Esquema de inducción de tumores con DMBA y PMA.

#### 4.5.2. Efecto del lauril galato sobre la inducción y regresión de tumores en acetona.

Tras 6-7 semanas los tumores aparecieron sobre los ratones control y sobre aquellos que iban a ser tratados post-inducción del tumor con distintas dosis de LG. Sin embargo muchos de los ratones que se trataron con LG junto con el PMA no mostraban aparición del tumor y además esta inhibición de la formación de tumores seguía una correlación lineal en función de la dosis (**tabla**

III). El 100% de las hembras que fueron tratadas con una dosis de 50µg en 10 µl de aplicación 3 veces por semana no desarrollaron ningún tipo de tumoración sobre la zona de aplicación de los compuestos ni sobre el resto del cuerpo.

TABLA III

INHIBICIÓN DE LA INDUCCIÓN (Aplicación del PMA+ LG)

↓ 8 semanas post-DBA

% INHIBICIÓN DEL TUMOR			
	LG 2.5*	LG 10*	LG 50*
MACHOS	0%	50%	75%
HEMBRAS	25%	50%	100%

\* Cantidad del producto en µg/aplicación

**CONTROLES: 90% desarrollaron el tumor**

Por otro lado aquel grupo en el que se había llevado a cabo la inducción de los tumores fue tratado con distintas concentraciones de LG como se indica en la **tabla IV**.

TABLA IV  
 INDUCCIÓN DEL TUMOR + TRATAMIENTO CON  
 DISTINTAS DOSIS DE LG

↓ 8 semanas tratamiento

% DESPARICIÓN DEL TUMOR			
	LG 50*	LG 100*	LG 250*
MACHOS	25%	25%	50%
HEMBRAS	25%	50%	75%

\* Cantidad del producto en  $\mu\text{g}$ /aplicación

Una vez más se observó que la desaparición del tumor era directamente proporcional al aumento de la concentración del producto (LG).

Sin embargo a medida que se iba avanzando en el tratamiento, utilizando como disolvente la acetona, comenzaron a formarse escaras en la zona de aplicación del producto debido, probablemente, a un proceso de deslipidización. Por esta razón el protocolo fue modificado cambiando el disolvente en el que se aplicaban los distintos compuestos.

#### 4.5.3. Condiciones óptimas para la inducción de tumores. Modificación del protocolo.

Para evitar la formación de escaras en la zona de aplicación de los compuestos se modificó el disolvente (**figura 18**) en el que se iban a disolver los distintos compuestos (DMBA, PMA y LG).



Figura 18. Modificación del protocolo de inducción de tumores. Condiciones óptimas para la inducción de éstos.

Para ello el disolvente que se empleó fue una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol en una relación de 1:1. De esta manera se evitaba la formación de escaras y se favorecía la penetrabilidad del compuesto. También se modificó el volumen de aplicación pasando de 10  $\mu$ l a 20  $\mu$ l.

4.5.4. Estudio del efecto del LG en DMSO/Glicerol sobre la regresión de tumores inducidos químicamente.

Tras el cambio del disolvente se plantearon nuevos grupos de ratones a los que se les indujo la tumoración con DMBA y PMA en DMSO/Glicerol (1:1). Un resumen del protocolo se puede ver en la **figura 19**. Se establecieron 3 grupos distintos de ratones: aquellos que iban a ser tratados con 100  $\mu\text{g}$  del compuesto (LG100), los tratados con 250 y 500  $\mu\text{g}$  (LG250 Y LG500 respectivamente). La zona de aplicación en este estudio fue el dorso y el volumen de aplicación 20  $\mu\text{l}$ . Es decir, la concentración del compuesto en los distintos grupos era de 50, 125 y 250 mg/ml para LG100, LG250 y LG500 respectivamente.

Una vez más la aparición del tumor se hace visible a las 6-7 semanas. De los 24 ratones 4 no desarrollaron ningún tumor, 3 de ellos del grupo LG100 y el cuarto del grupo LG500. Todos los ratones del grupo LG250 desarrollaron tumores. A los ratones que no desarrollaron el tumor se les aplicó la concentración de LG correspondiente a sus grupos durante todo el tratamiento.



Figura 19. Esquema del protocolo de regresión de tumores.

Como se puede observar en la figura 20 de los ratones LG100 no se curó ninguno, sin embargo del grupo LG250 se curaron el 50% de ellos y del grupo con mayor dosis de LG (LG500), se curaron el 71%. Una vez más se ve que la cantidad de compuesto aplicada es directamente proporcional a la regresión del tumor.

% REGRESIÓN DE TUMORES			
Sexo \ Grupo	LG100	LG250	LG500
Machos	0%	50%	50%
Hembras	0%	50%	100%

Figura 20. Tabla de resultados de la regresión de tumores en ratones IRC tratados con distintas dosis de LG

Estos resultados se han obtenido tras 24 semanas (3 veces / semana) de tratamiento con LG,

Las **figuras 21, 22, 23** muestran ejemplos de ratones de cada grupo es decir de LG100, LG250 y LG500 respectivamente.

Además la **figura 24** muestra el ejemplo de un ratón al que no se le desarrollaron tumores en el proceso de inducción y que sin embargo fue tratado con 500 $\mu$ g del compuesto por aplicación durante todo el tiempo del tratamiento del resto de los ratones.

Figura 21. Evolución del tumor tras aplicación de 100 µg de LG (3 veces / semana)

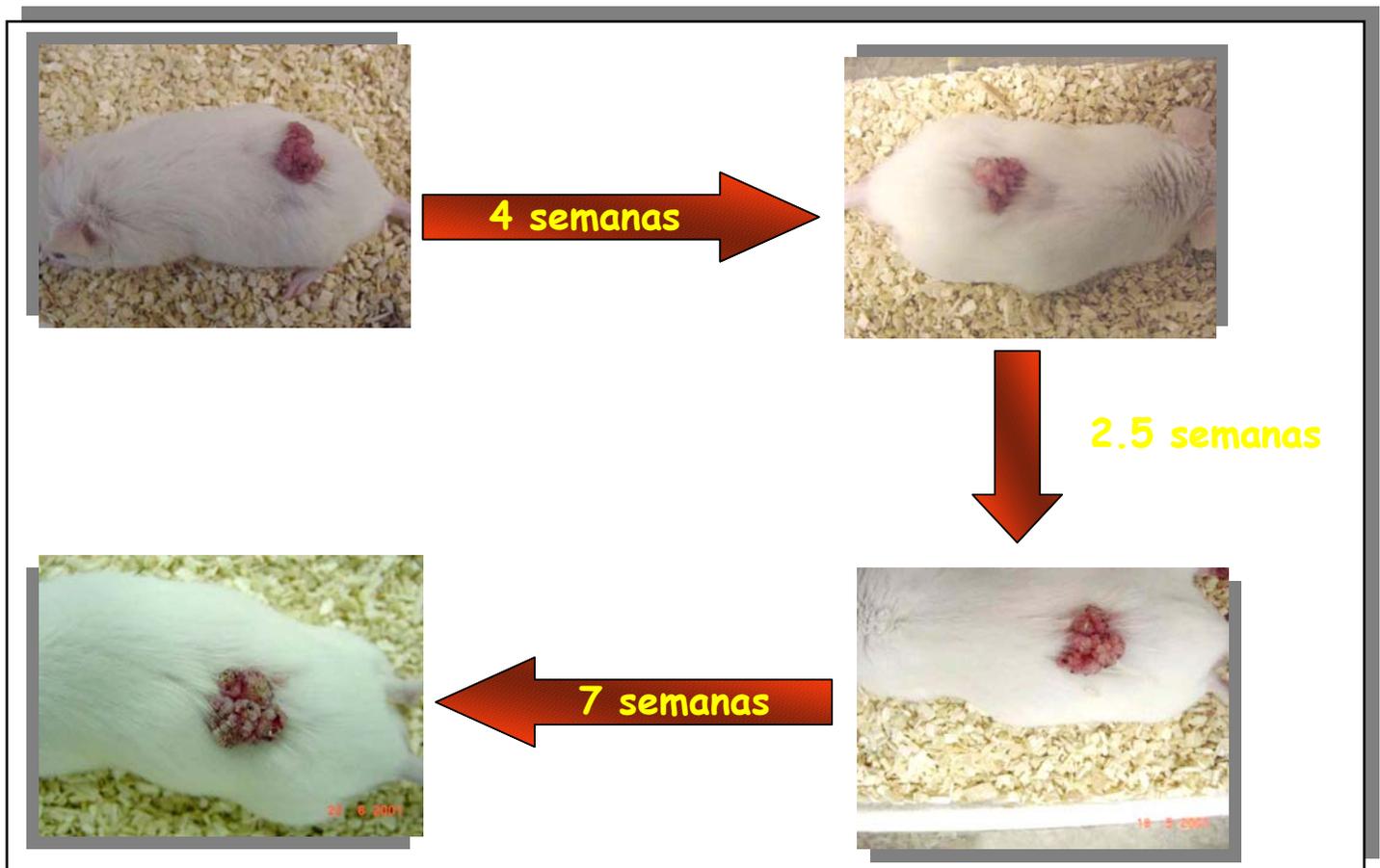
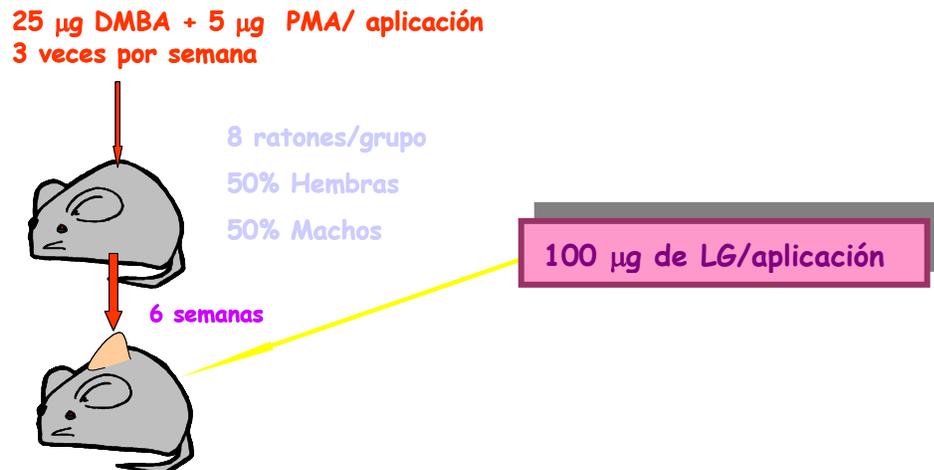


Figura 22. Evolución del tumor tras aplicación de 250 µg de LG (3 veces / semana)

25 µg DMBA + 5 µg PMA/ aplicación  
3 veces por semana

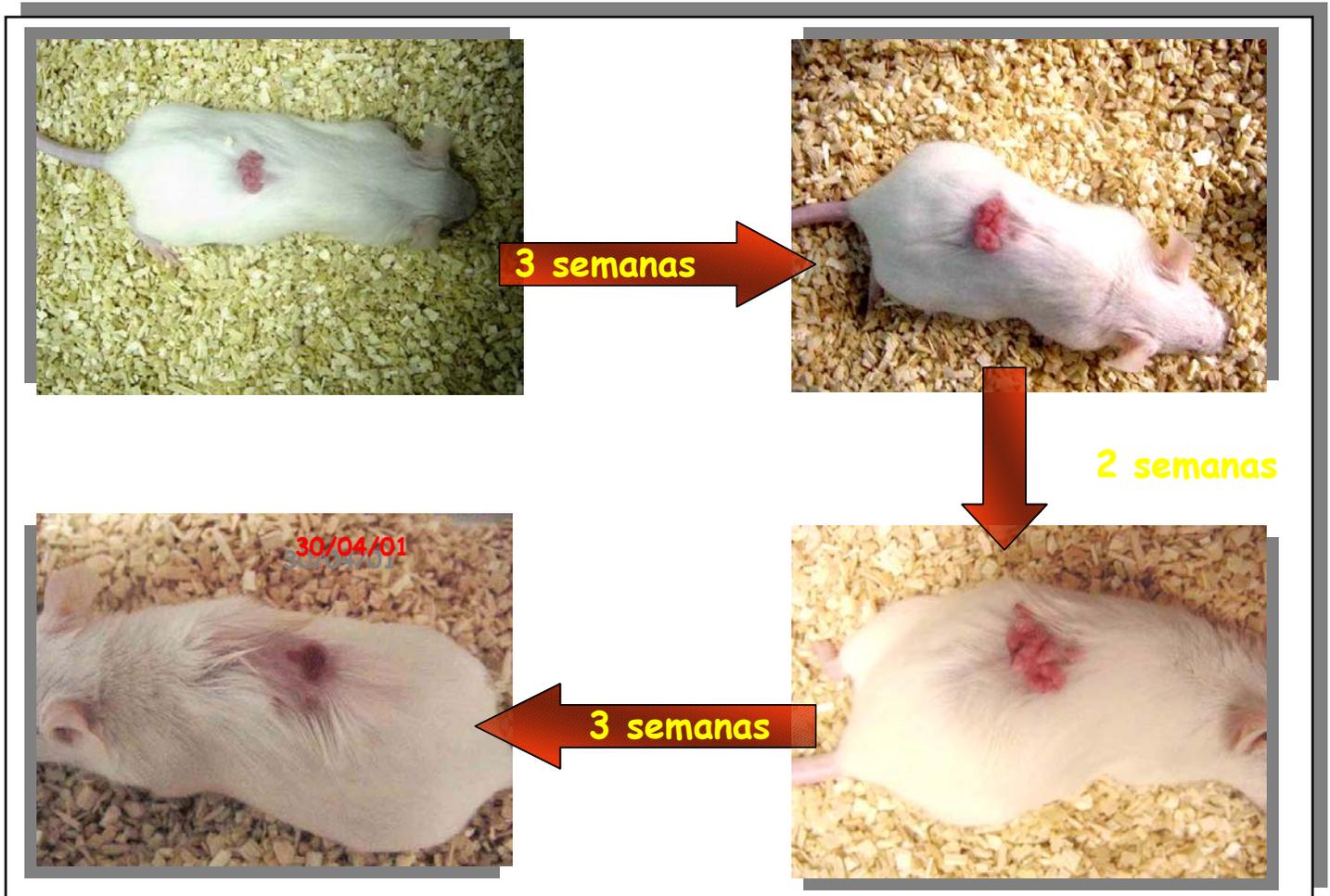
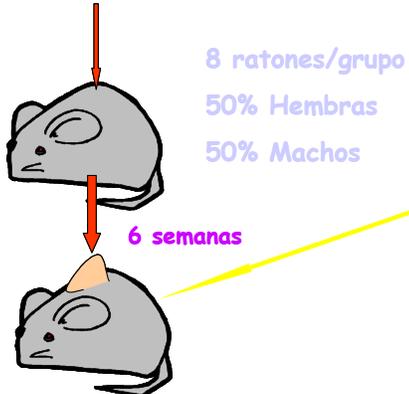


Figura 23. Evolución del tumor tras aplicación de 500 µg de LG (3 veces / semana)

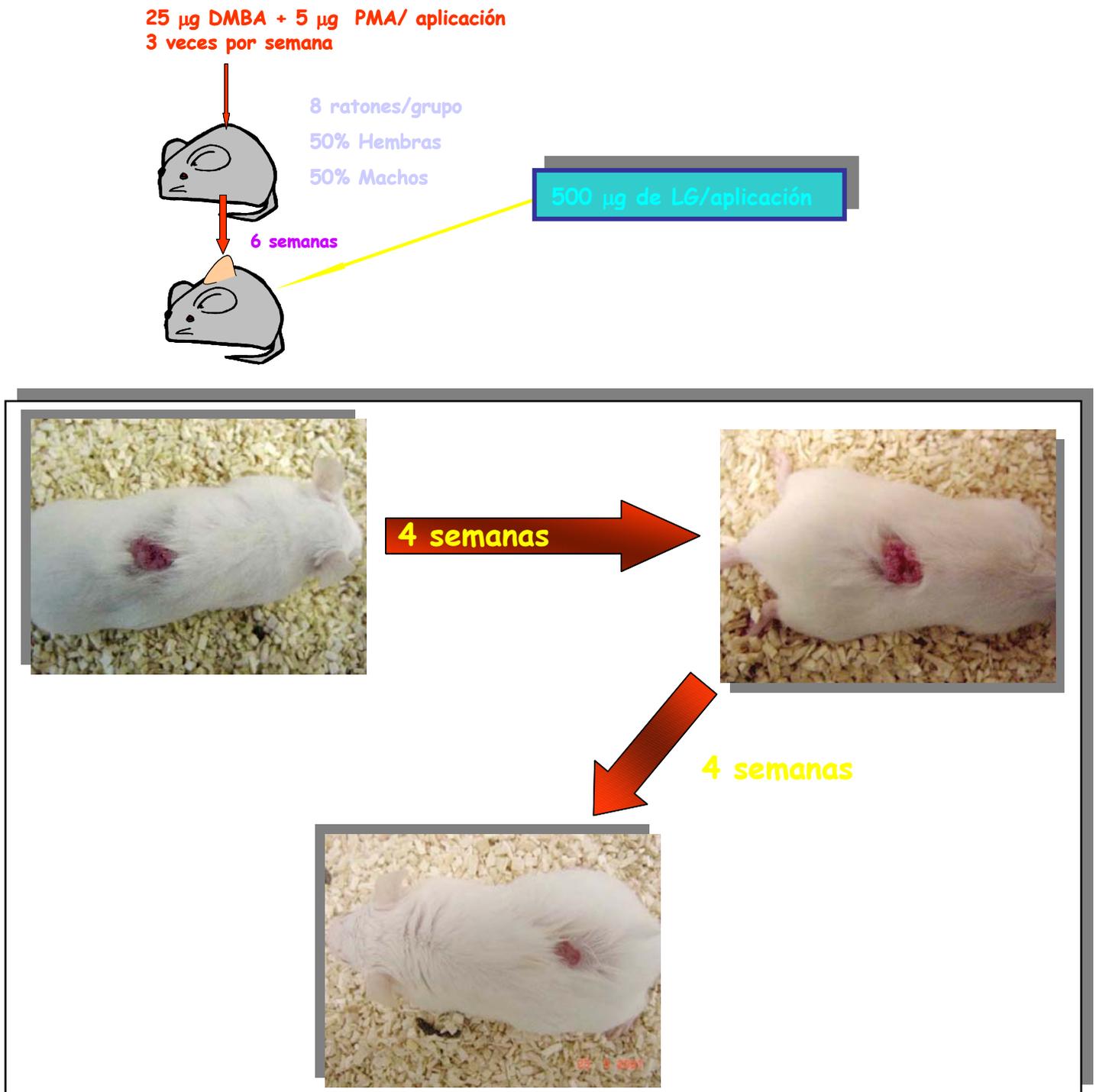
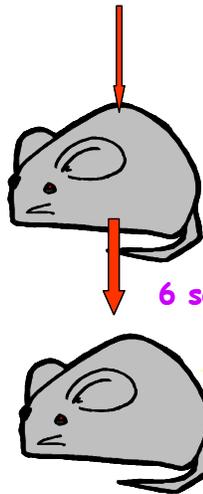


Figura 24. Control tras aplicación de 500 µg de LG (3 veces / semana)

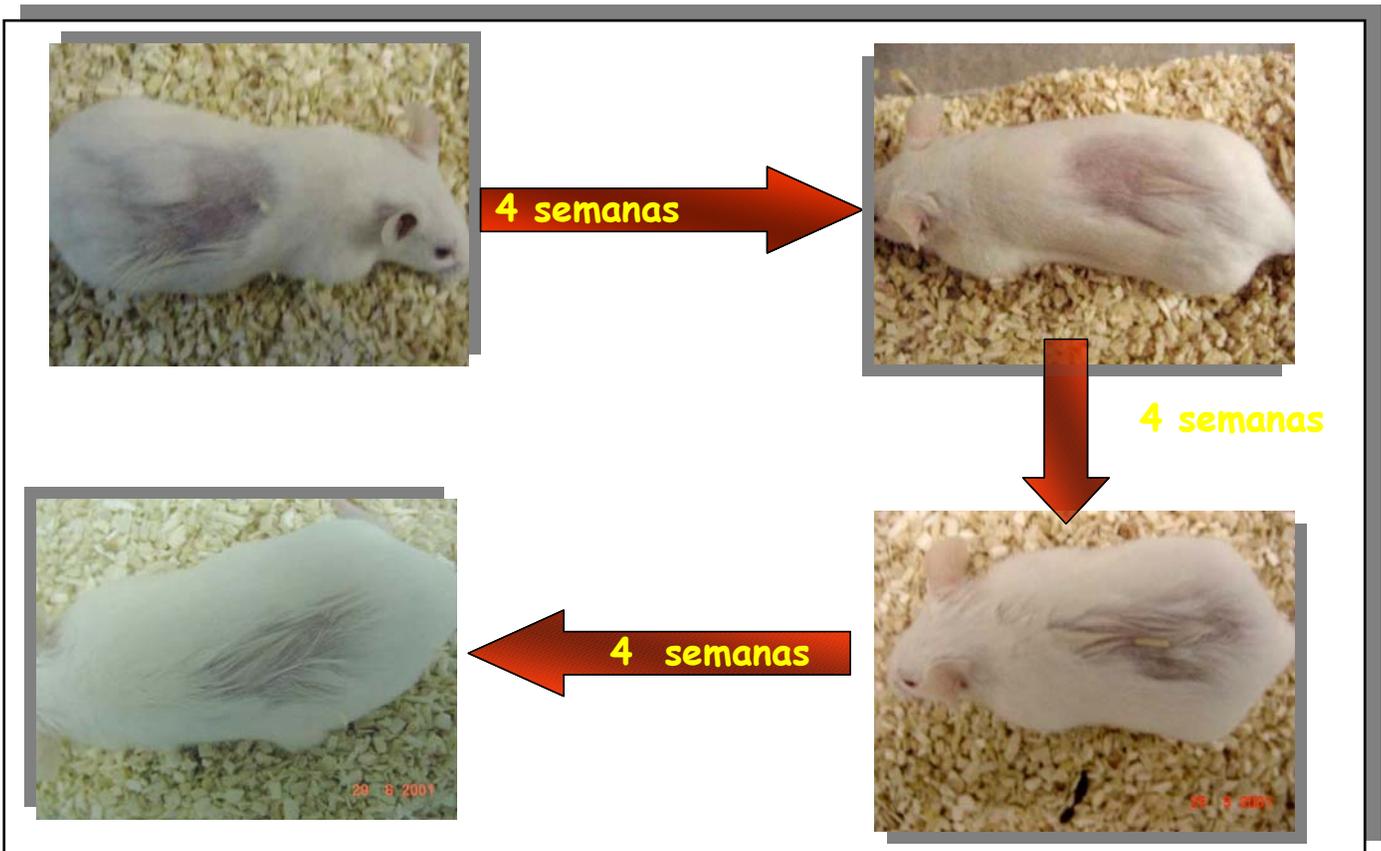
25 µg DMBA + 5 µg PMA/ aplicación  
3 veces por semana



8 ratones/grupo  
50% Hembras  
50% Machos

500 µg de LG/aplicación

6 semanas



4.5.5. Estudios anatómo-patológicos de tumores inducidos químicamente con DMBA + PMA en DMSO/Glicerol.

Para los estudios anatómo-patológicos se sacrificaron 4 ratones: 1 ratón sano (**figura 25.A**), 1 ratón con tumor tratado con LG y curado (**figura 25.B**); 1 ratón control (tumor sin tratar) (**figura 25.C**); 1 ratón tratado y no curado (**figura 25.D**).

Los resultados fueron los siguientes:

**Piel sana:** Sin alteraciones significativas

**Lesión tratada con LG y curada:** Piel con úlcera profunda que penetra más allá de la capa muscular y muestra una base constituida por un tejido de granulación. Presenta hiperplasia reactiva en la epidermis de los bordes de la úlcera.

**Piel control:** Piel que muestra una tumoración escamosa, exofítica con un tallo central. Penetra una superficie con hiperqueratosis ortoqueratósica que engloba cúmulos de hematíes y de neutrófilos. El tumor infiltra superficialmente la dermis mostrando marcadas atipias nucleares y frecuentes mitosis.

**Piel tratada y no curada:** Presenta las características anteriores con células en apoptosis (señaladas con flechas).

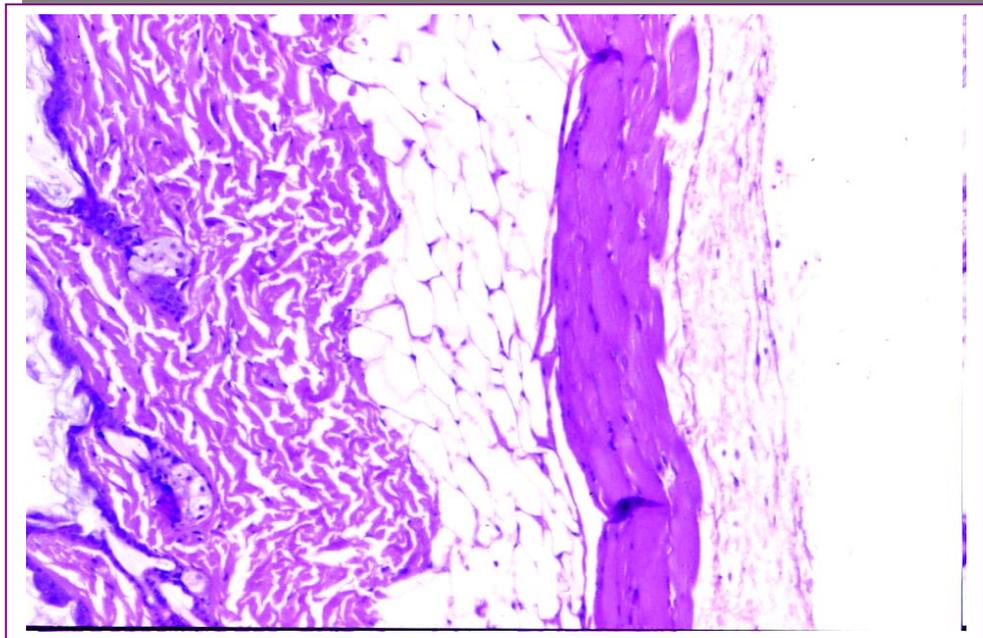
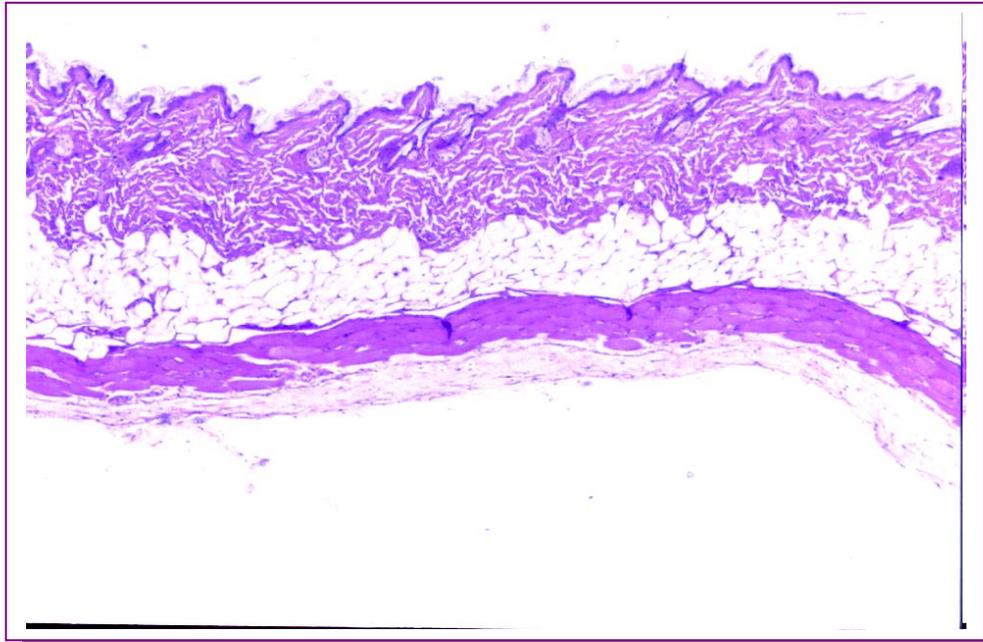
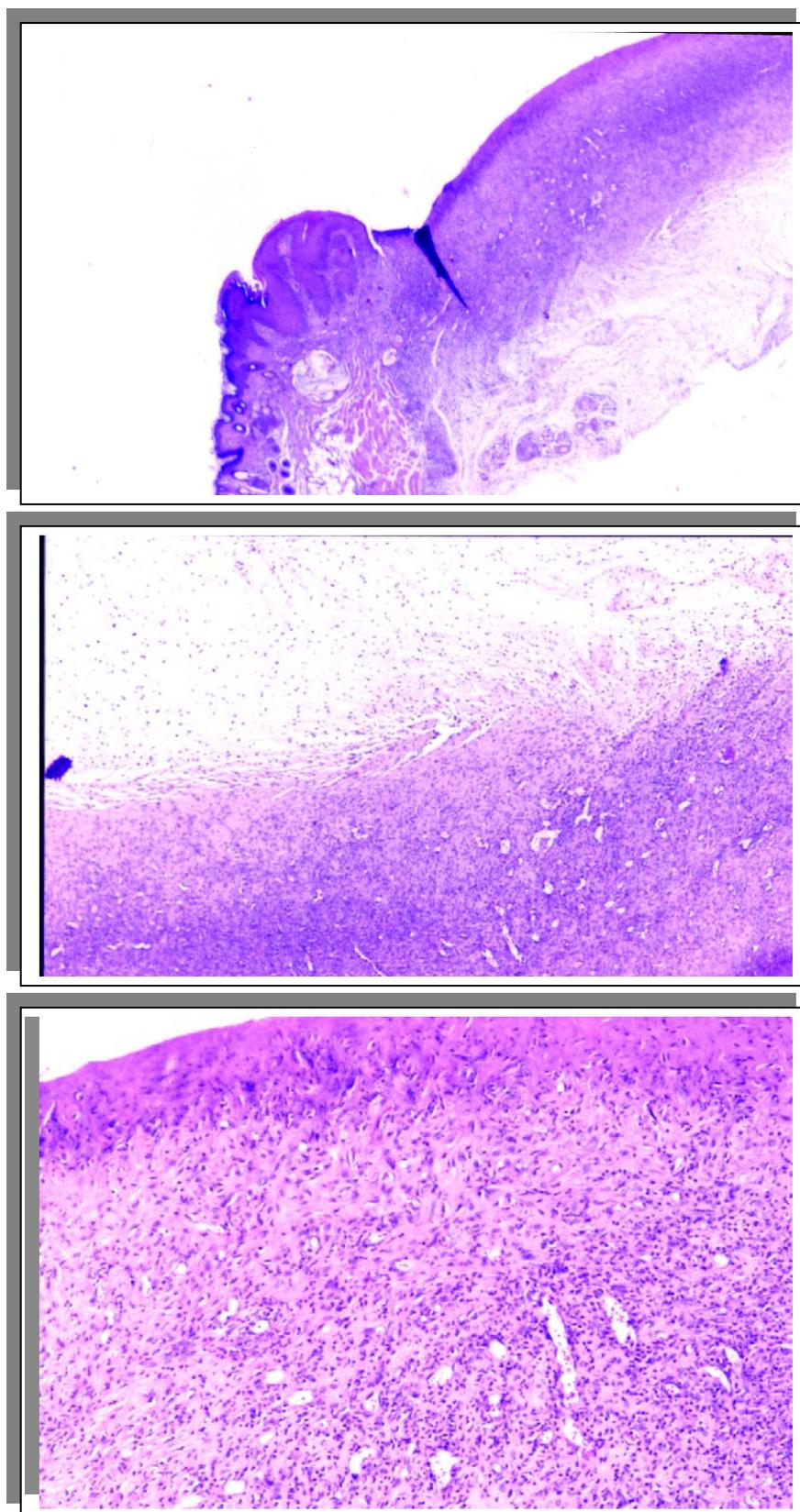


Figura 25.A. Cortes de piel sana a distintos aumentos



**Figura 25.B. Cortes a distintos aumentos de un tumor tratado con LG y posterior desaparición**

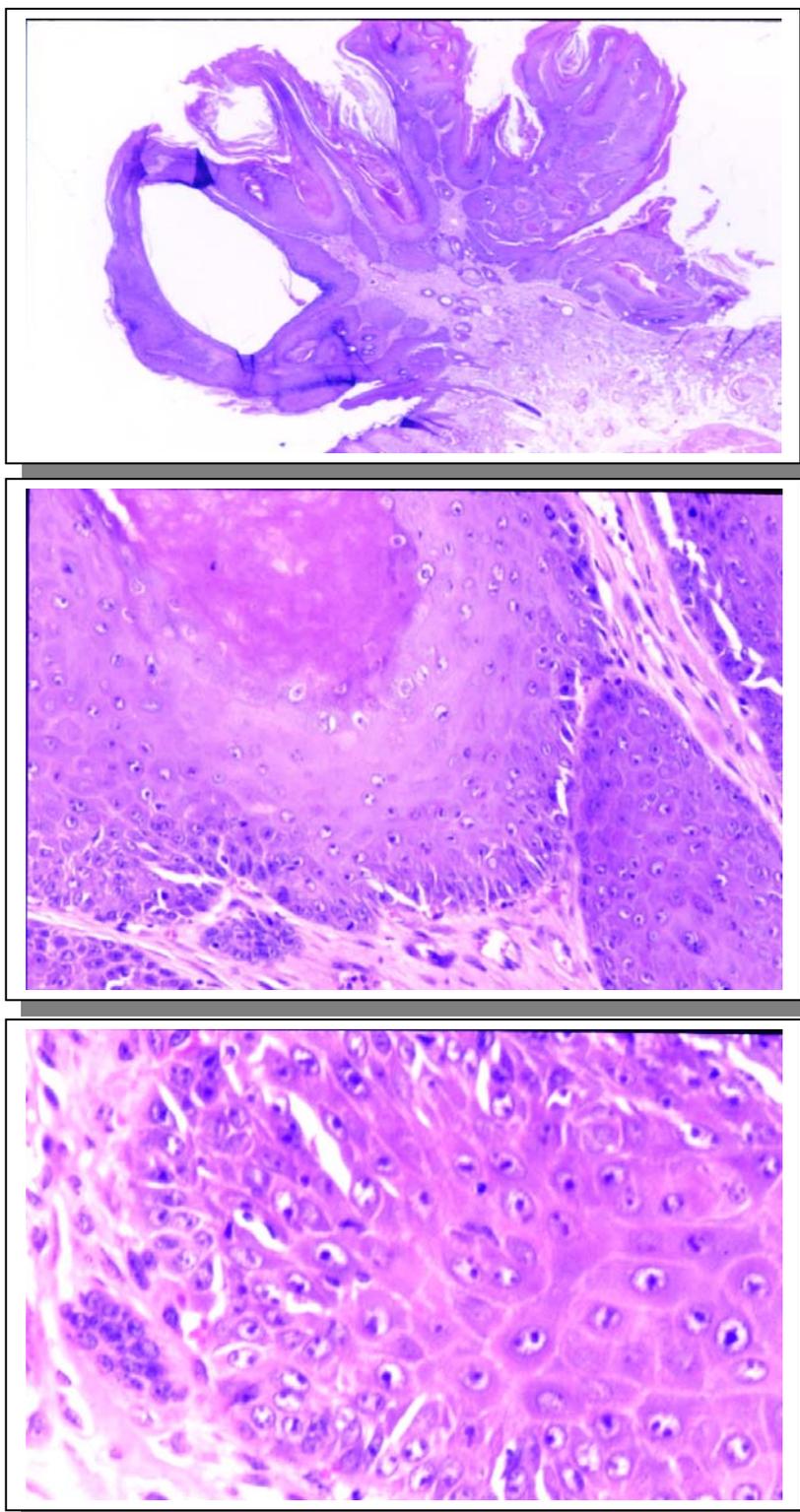
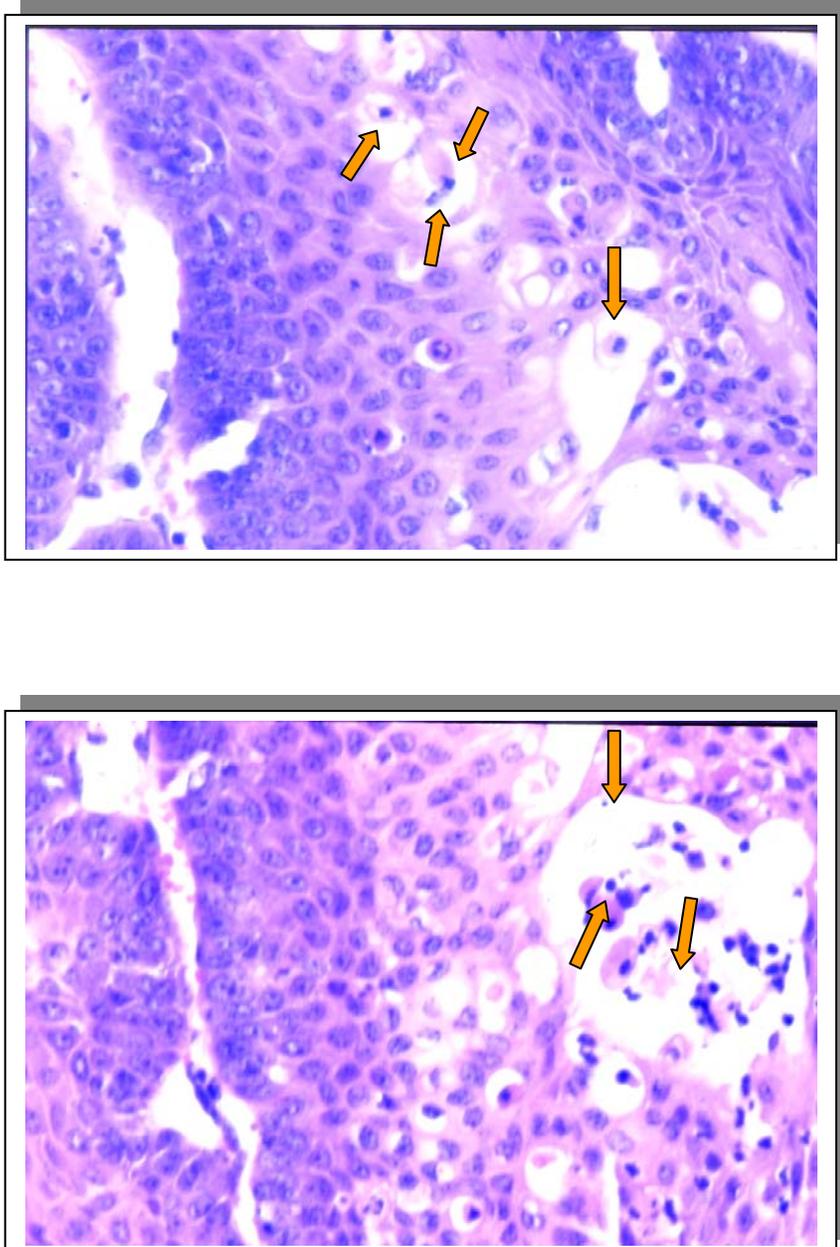


Figura 25.C. Piel de ratón control (sin tratar con LG) a distintos aumentos



**Figura 25.D.** Tumor tratado con LG sin desaparición del mismo. Las flechas muestran la presencia de células en apoptosis.

#### 4.6. Síntesis del lauril galato radiactivo (LG-<sup>14</sup>C)

Puesto que en los apartados anteriores hemos demostrado que el LG era capaz de inducir apoptosis en distintos tipos de líneas celulares y en tumores experimentales, el siguiente paso que se propuso fue intentar explicar de qué manera este compuesto era capaz de entrar a la célula y si era metabolizado o no. Puesto que no existe comercialmente el LG radiactivo se planteó la síntesis en el laboratorio. Aunque la síntesis química del lauril galato estaba descrita en la bibliografía desde el año 1947 por *Ault et al*, cuando se intentó la síntesis en el laboratorio (Figura 26) siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía no se pudo obtener el compuesto marcado. Uno de los problemas principales era que el ácido gálico en nuestra reacción era el reactivo en exceso, puesto que el limitante era aquel que estaba marcado, es decir, el lauril alcohol. Sin embargo en el protocolo descrito el lauril alcohol era el reactivo en exceso, y en las condiciones en las que se llevaba a cabo la reacción, éste se encontraba en estado líquido favoreciendo así la síntesis.

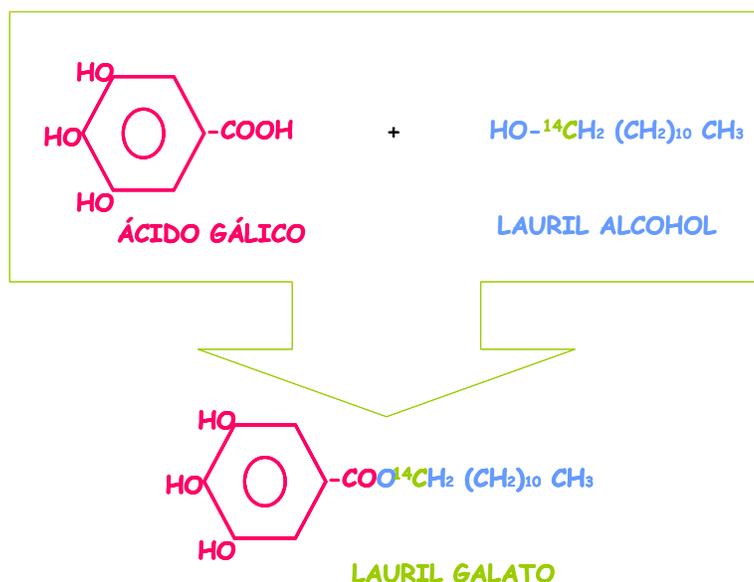


Figura 26: Síntesis química del lauril galato

También se estudió un sistema de transesterificación utilizando para ello una batería de lipasas y esterases, sin embargo ninguno de estos enzimas fue capaz de llevar a cabo satisfactoriamente la reacción de síntesis de LG (datos no mostrados).

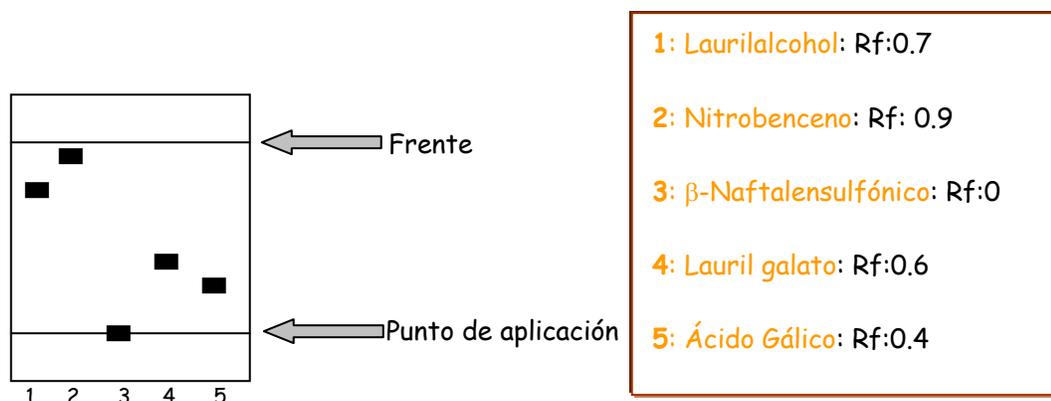
#### 4.6.1. Separación de los reactivos

Debido a que el lauril alcohol ( $[LOH]= 0.1 \text{ mCi/ml}$ ;  $A_{es}=55 \text{ mCi/mmol}$ ) se suministra en etanol, se eliminó el etanol presente para evitar que hubiera productos secundarios en la reacción. Se introdujeron  $500 \mu\text{l}$  de  $LOH-^{14}\text{C}$  ( $50 \mu\text{Ci}$ ) en una ampolla y se evaporó el etanol utilizando una corriente de  $\text{N}_2$ . Se pesaron  $17 \text{ mg}$  de ácido gálico,  $1 \text{ mg}$  de  $\beta$ - Naftalén sulfónico y  $10 \mu\text{l}$  de nitrobenzeno, se disolvieron en  $200 \mu\text{l}$  de dioxano y se mezclaron con el LOH contenido en ampolla cerrando posteriormente ésta.

La elección de dioxano como disolvente de la reacción surgió tras probar distintos compuestos tales como tolueno, benceno, xileno y mezclas de tolueno / benceno, etc. Ninguno de estos disolventes mejoró el rendimiento del dioxano por lo que se eligió éste como disolvente de la reacción. En él eran solubles el ácido gálico y el lauril alcohol así como el NB y  $\beta$ -NFS.

Era de interés saber si estos compuestos se podrían distinguir en una HPTLC para su posterior purificación. Para ello, la siguiente búsqueda fue la elección de los disolventes para llevar a cabo una cromatografía en capa fina (**figura 27**). La mezcla de disolventes

de mayor poder de resolución fue hexano/acetona/ácido acético (50/50/0.625).



**Figura 27. Separación de los reactivos de la síntesis.** Los distintos reactivos se separaron por cromatografía en capa fina.

La detección de los reactivos se llevó a cabo por distintos métodos. El ácido gálico y el lauril galato eran visibles, el  $\beta$ -NFS y el NB se detectaron por iluminación con luz UV. Por último el lauril alcohol se pudo detectar utilizando vapores de yodo.

Tras la detección se calcularon los  $R_f$ s. Cada compuesto mostró un  $R_f$  distinto, con lo que este sistema podía ser utilizado para separar los reactivos en posteriores purificaciones.

#### 4.6.2. Condiciones óptimas de la síntesis

La ampolla que contenía los reactivos fue cerrada y se sometió la mezcla de reacción a una temperatura de  $120^\circ C$  a tiempos variables. A medida que se aumentó el número de días mejoró el

rendimiento de la reacción. A los 4 días el rendimiento era aproximadamente de un 95% obteniendo prácticamente la conversión total del lauril alcohol en lauril galato.

Las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes:

$$[\text{LOH}] = 0.5 \text{ mM}$$

$$[\text{Ac. Gal}] = 500 \text{ mM}$$

$$[\text{NB}] = 500 \text{ mM}$$

$$[\beta\text{-NFS}] = 24 \text{ mM}$$

La concentración de ácido gálico era 1000 veces mayor que la del lauril alcohol siendo por tanto en esta síntesis este compuesto el reactivo limitante.

#### 4.6.3. Purificación

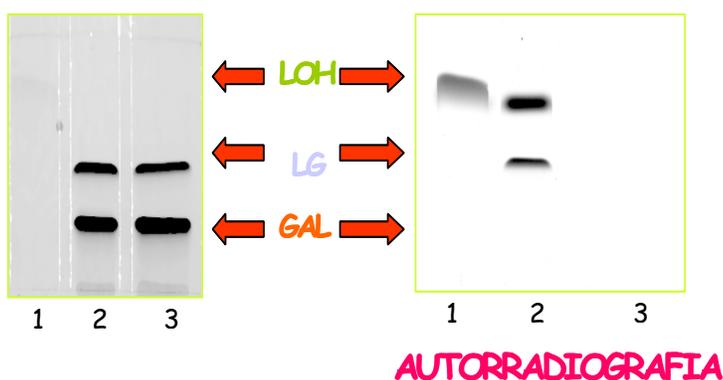
Aprovechando el sistema de cromatografía en capa fina que se puso a punto para separar los reactivos, se separaron los distintos compuestos de síntesis. La mezcla de reacción se aplicó en placa de gel de sílice, y los compuestos se separaron utilizando la mezcla de disolventes hexano/acetona/acético (50/50/0.625). Se utilizó como control LG comercial. El producto obtenido se localizó en la placa mediante autorradiografía, se rascó la banda de sílice que contenía el compuesto y el LG\* se extrajo con etanol.

#### 4.6.4. Caracterización del producto sintetizado

Para comprobar si el producto obtenido correspondía al compuesto buscado se realizaron distintos tipos de pruebas: HPTLC, espectroscopía de absorción, y por último espectrometría de masas.

##### 4.6.4.1. HPTLC

Se aplicaron 10  $\mu$ l del producto de síntesis sobre una placa de HPTLC gel de sílice siguiendo las condiciones descritas en el apartado 3.2.20. Como controles se utilizaron tanto el LOH-<sup>14</sup>C de partida como LG, Ácido Gálico y LOH comerciales. Como se puede apreciar en el carril 2 (mezcla de síntesis) de la **figura 28** los compuestos que se separan presentan el mismo R<sub>F</sub> que los marcadores LOH-<sup>14</sup>C (carril 1) y de la mezcla de LG/Ac. Gálico comerciales (10 mg/ml) (carril 2). Se puede observar que el compuesto obtenido en la síntesis corresponde con la movilidad del LG comercial.

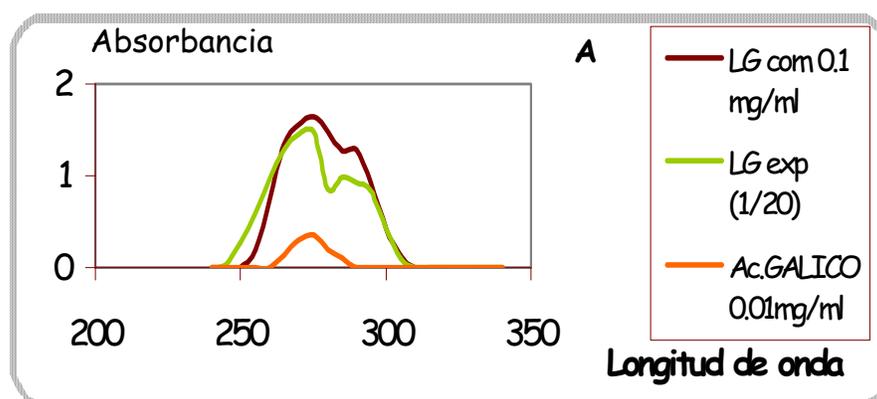


**Figura 28.** Cromatografía en capa fina y autorradiografía de la mezcla de reacción tras 24 h de síntesis del compuesto. Carril 1: LOH-<sup>14</sup>C comercial; Carril 2: Mezcla de síntesis; Carril 3: Mezcla de LG/GAL comerciales a 10mg/ml (10 $\mu$ l por aplicación)

4.6.4.2. Espectro de absorción

Aunque el HPTLC indicaba que el producto que se había obtenido en la síntesis parecía corresponder con LG, para asegurar que se trataba de este compuesto se realizó una nueva síntesis, en las mismas condiciones, pero con los reactivos sin marcar radiactivamente. Se purificó siguiendo el método descrito anteriormente (ver apartado 3.2.20. de materiales y métodos) y se disolvió en etanol.

La **figura 29** muestra los espectros de absorción del lauril galato comercial, de síntesis, y del ácido gálico. Tanto el LG, como el ácido gálico, presentaban un pico de absorción a 275 nm, sin embargo el lauril galato presentaba un hombro de absorción a 295 nm que era característico de este compuesto (**figura 29 A**)



**Figura 29. (A)** Espectro de absorción de LG y ácido gálico.

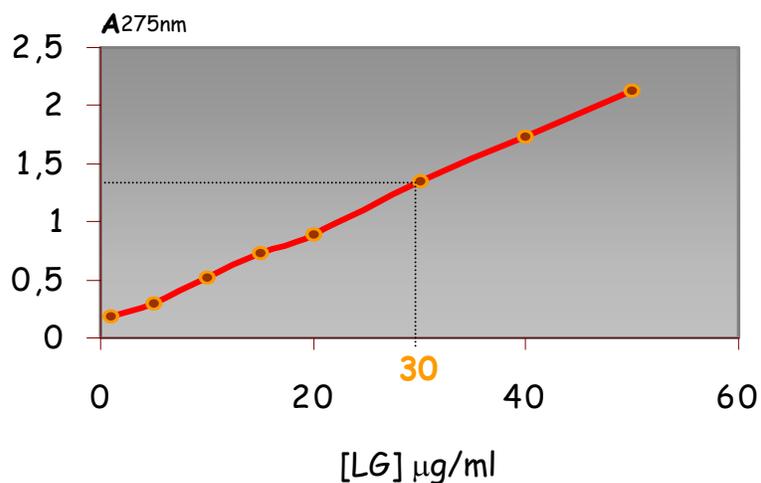


Figura 29(B) Recta de calibrado para el cálculo de concentración de LG.

De la recta de calibrado (figura 29.B) se pudo obtener la concentración del compuesto de síntesis no radiactivo siendo ésta de 3 mg/ml.

#### 4.6.4.3. Espectro de masas

Al compuesto obtenido de la síntesis no radiactiva se le sometió a espectrometría de masas y se obtuvo el espectro que se muestra en la figura 30 (Realizado por el Dr. Jesús Sanz del Centro Nacional de Química Orgánica. CSIC).





Se observó que ambos espectros de masas coincidían, con lo que el producto obtenido en la síntesis correspondía a LG.

#### 4.6.5. Estudio de las características hidrofóbicas/ hidrofílicas del compuesto en un sistema de reparto.

Anteriormente se había estudiado cómo el ácido gálico, el lauril alcohol y el lauril galato tenían distinta movilidad dentro de una placa de gel de sílice. Este ensayo servía para separar los distintos compuestos tras la síntesis del mismo. Sin embargo, cuando se trabajaba con células o proteínas este sistema no era de gran utilidad debido a que las proteínas precipitaban en la placa de sílice reteniendo a los distintos compuestos, y éstos no se separaban adecuadamente. Para poder valorar los reactivos dentro de un sistema celular o bien unido a proteínas se puso a punto un sistema de reparto aprovechando sus características de solubilidad. Para ello se utilizó hexano como fase orgánica y distintas fases acuosas (HCl 0.1 N; NaOH 0.1 N; Agua) en las que era soluble el ácido gálico, pero no el LOH o el LG. Una de las hipótesis era que el LOH se encontrara en la fase orgánica y el LG en la interfase, como muestra la **figura 31**.

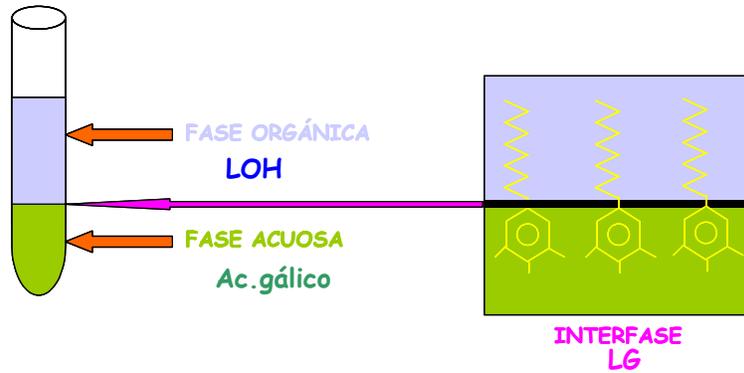


Figura 31. Sistema de reparto para separar LG de LOH.

Se ensayaron por tanto las 3 fases acuosas junto con la fase orgánica de hexano. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la **figura 32**, observándose que las fases que mejor extraían ambos compuestos eran las de hexano como fase orgánica y HCl 0.1 N como fase acuosa.

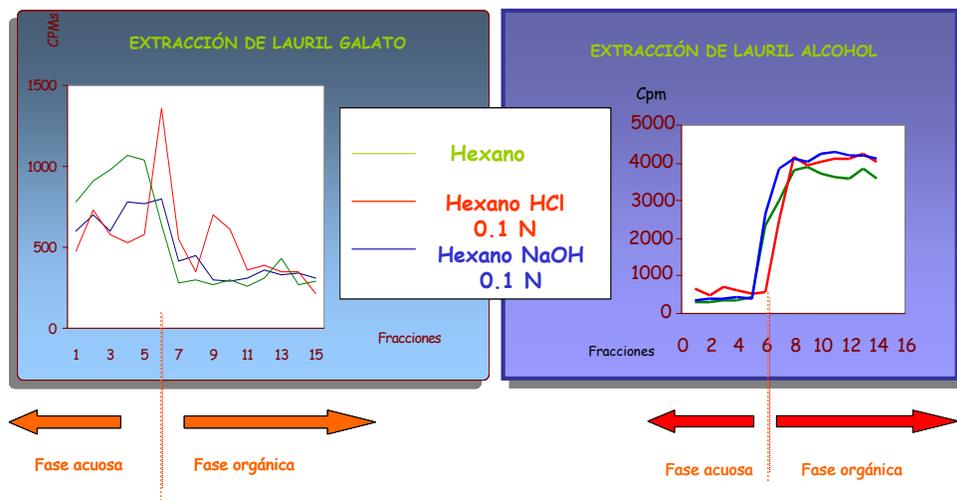
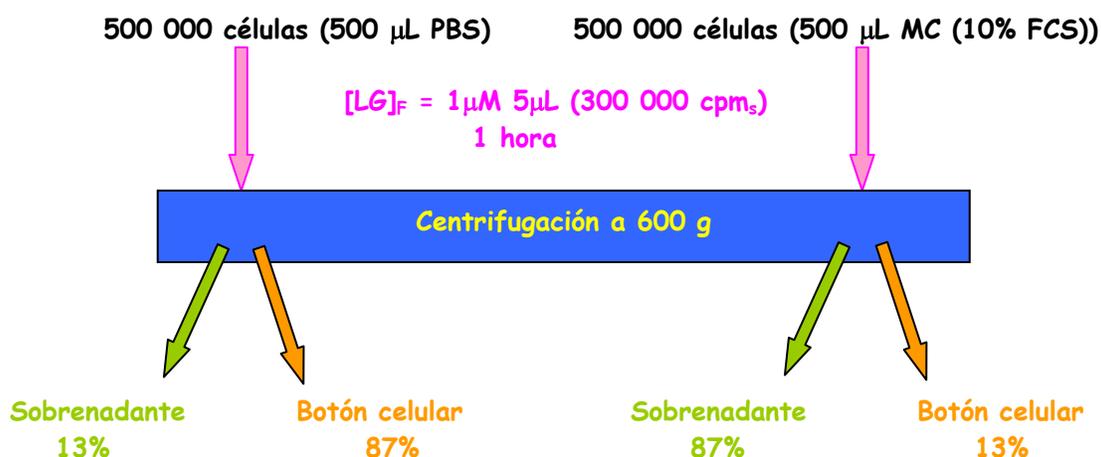


Figura 32. Extracción de LG y LOH mediante un sistema de reparto con distintos disolventes.

4.6.6. Captación de LG por células Wehi-231 en tampón fosfato y medio de cultivo completo.

Debido al desfase temporal que se hacía presente en la inhibición de la fosforilación de proteínas en tirosina por parte del LG cuando se estudiaba en estas células en PBS o bien en medio de cultivo completo (suplementado con 10% FCS), el siguiente paso fue ver el comportamiento del compuesto en estos dos medios. El protocolo que se siguió fue el que indica la **figura 33**. Se observaba que existía una captación del compuesto 6 veces mayor en las células en PBS con respecto a aquellas que se encontraban en medio completo. En este último sistema la mayor parte del compuesto permanece en el medio de cultivo lo que hacía pensar en una posible unión del compuesto a las proteínas séricas presentes en este medio como se estudiará en el apartado 4.6.7.



**Figura 33.** Captación de LG por células Wehi-231 en distintos medios. Los resultados son media de triplicados

#### 4.6.7. Unión a proteínas plasmáticas.

Hemos visto anteriormente que la captación del LG por parte de las células Wehi 231 era 6 veces menor en aquellas células que se encontraban en medio de cultivo completo. Una de las hipótesis que se planteó fue la posibilidad de la unión del LG a las proteínas presentes en el FCS. Este retraso podría implicar también una cesión del compuesto por parte de la albúmina a las células como se estudiará posteriormente (apartado 4.6.9) (es sabido que la albúmina actúa como transportador de muchas sustancias). Para ello se incubaron 100  $\mu\text{l}$  de 20% de FCS en PBS con LG a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ . Esta muestra se sometió a FPLC (figura 34) y se pudo comprobar que la mayoría de la radiactividad estaba presente en el pico de la albúmina, es decir la mayoría del compuesto se unía a la albúmina presente en el FCS.

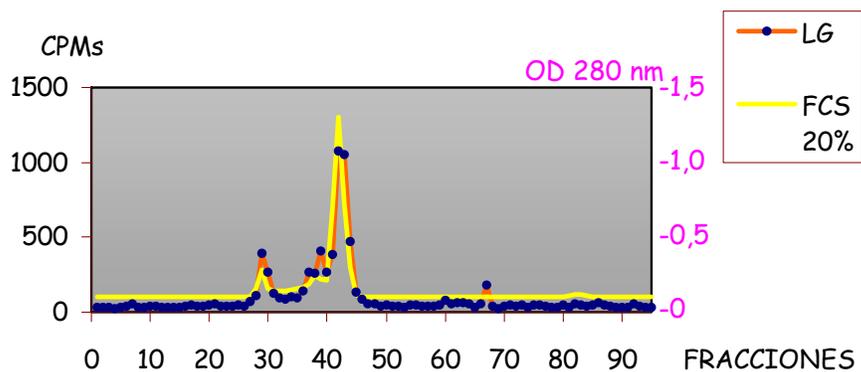
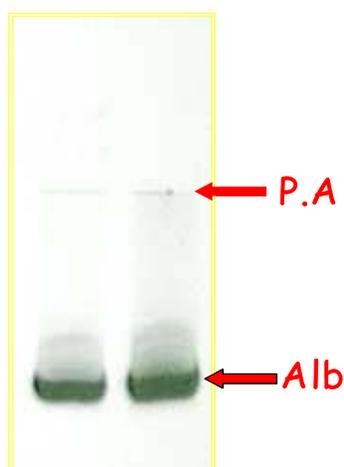


Figura 34. FPLC (Superdex®200) de LG unido a proteínas plasmáticas presentes en 20% FCS.

También se estudió la posible unión de LG a la albúmina mediante IEF y posterior autorradiografía. Como se puede observar en la **figura 35** la mayoría del compuesto se encontraba unido a la albúmina presente en el FCS.



**Figura 35.** Autorradiografía del IEF de la unión de lauril galato a proteínas plasmáticas. P.A: punto de aplicación. Alb: albúmina

#### 4.6.8. Estabilidad y efecto de esterasas.

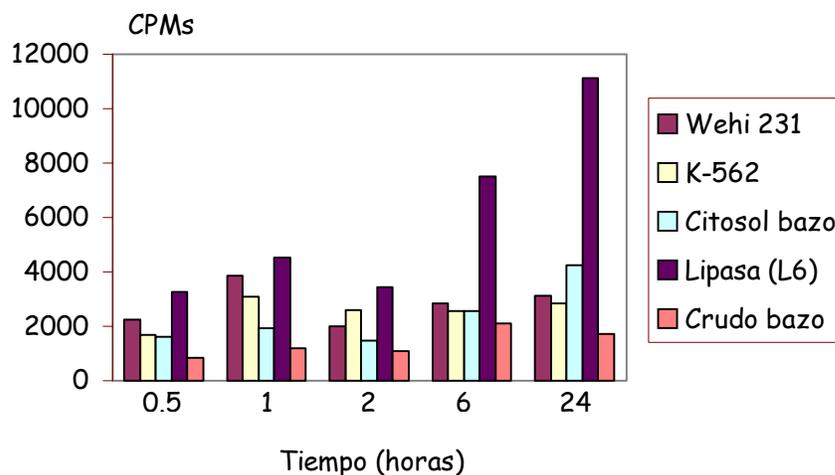
Cuando se estudió el efecto del LG sobre distintas líneas celulares, se observó que en algunas líneas el LG presentaban mayor  $I_{50}$  para inhibir la proliferación que en otras. Una de las hipótesis que se barajó fue la posibilidad de que en estos sistemas celulares existieran esterasas específicas para este compuesto que lo hidrolizaran para dar LOH y ácido gálico. Como se vio

anteriormente se requería una concentración 100 veces más alta de ácido gálico que de lauril galato para ejercer el mismo efecto (apartado 4.4 ).

Distintos autores han descrito que el LG presenta una gran estabilidad a la hidrólisis cuando se le compara con otros ésteres de cadena corta (Van der Heijden *et al* 1986).

Para estudiar la posible presencia de sistemas enzimáticos que hidrolizaran el compuesto, se eligieron como líneas celulares la Wehi-231 y la línea K-562 a una concentración de  $10^6$  células/ml y extractos crudos y citosólicos de bazo además de una serie de esteras (kit de BOEHRINGER) ensayadas a concentraciones finales de 1-5 mg/ml de las cuales, solamente una lipasa (L6) mostraba actividad (resultados no mostrados). La elección de estas líneas fue en base a la diferencia en concentración del compuesto que se requería para inhibir la proliferación de estas células. Mientras que la línea Wehi-231 solamente requería  $0.8 \mu\text{M}$  para inhibir la proliferación en un 50%, la línea K-562 necesitaba una concentración de  $19.5 \mu\text{M}$  para sufrir el mismo efecto. Se incubaron las dos líneas celulares, el citosol y el crudo de bazo y la lipasa 6 con medio de cultivo sin 10% de FCS, ya que a este medio se le añadió  $\text{LG-}^{14}\text{C}$  unido a albúmina siguiendo el protocolo del apartado 3.2.23. de materiales y métodos. Se midió la producción de LOH en un contador de centelleo tras la separación de las dos fases como se indica en el apartado 3.2.22. La **figura 36** muestra que solamente el control positivo (L6) era capaz de hidrolizar al LG. Este resultado estaba en concordancia con la estabilidad

descrita para este compuesto, y que, por tanto, era el LG y no sus productos de hidrólisis el causante de los efectos vistos anteriormente.



**Figura 36. Estudio de esterazas/lipasas presentes en distintos sistemas.** Tras la incubación con LG en los tiempos que se muestran, se analizó la cantidad de LOH producida por los distintos sistemas.

#### 4.6.9. Unión del lauril galato a células Wehi 231 y K-562

Puesto que hemos observado que el LG se une principalmente a albúmina, se intentó demostrar si la albúmina era capaz de ceder este compuesto a las células. Para ello se incubaron dos líneas celulares (Wehi 231 y K-562) a distintos tiempos en presencia de lauril galato unido a albúmina bovina. El medio de cultivo no estaba suplementado con FCS sino con el complejo albúmina-LG\* (apartado

3.2.23. de materiales y métodos) de manera que se estudió si la albúmina era capaz de ceder el compuesto a las células y si se localizaba principalmente en la fracción citosólica o en la particulada. Tras centrifugación, se separaron las dos fracciones y siguiendo el protocolo del apartado 3.2.22. se obtuvieron las dos fases, cuantificándose la fase acuosa mediante contador de centelleo. El resultado que se obtuvo se refleja en la **figura 37** en donde se observó que mayoritariamente el compuesto se encontraba en la fracción particulada..

Además también se pudo demostrar que la albúmina actuaba como un transportador del compuesto y ésta era capaz de cederlo a las células incluso a la media hora de incubación.



**Figura 37. Distribución del LG en la célula. (A) Células Wehi-231; (B) Células K-562**

## DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Inhibición de PTK por LG en extractos crudos de células Wehi-231.

En trabajos anteriores en el laboratorio se había detectado que el ácido gálico y sus ésteres se comportaban como buenos inhibidores de PTKs presentes tanto en citosol como en fracción particulada de bazo humano (Lázaro *et al* 1995). A medida que en estos compuestos aumentaba el número de átomos de carbono de la cadena alifática su poder inhibitorio aumentaba. Dado que el LG era el que mostraba mayor inhibición sobre estas enzimas se ha ensayado en este trabajo el efecto que el LG tiene sobre las PTKs de extractos crudos de células Wehi-231, así como en células en cultivo.

Como ya se ha comentado anteriormente (apartado 1.2) en la introducción, los distintos tipos de inhibidores de PTKs se encuentran clasificados en función de la capacidad que presentan para impedir la unión del ATP, del sustrato, o bien disminuyendo la actividad catalítica del enzima por otros mecanismos (Terrence 1992). Entre los inhibidores más estudiados se encuentran la Herbimicina A y la Genisteína, por ello han sido incluidos en el estudio comparativo con LG como se muestra en la figura 1. Como se puede observar tanto la Herbimicina A como la Genisteína se comportan como pobres inhibidores de actividad PTK total presente en extractos crudos de células Wehi-231 produciendo una ligera inhibición (10%) a concentraciones altas (100

$\mu\text{M}$ ) en comparación con el LG que presenta una  $I_{50}$  de 10  $\mu\text{M}$ . Una posible explicación de la baja inhibición que muestran estos compuestos puede ser debida a que su mecanismo de acción está basado en la competición con el sitio de unión a ATP en las PTKs, en el caso de la Genisteína (Akiyama *et al* 1987), o la unión covalente al sitio SH-sensible modificando la afinidad por el ATP en el caso de la Herbimicina (Fukazawa *et al* 1994). Por esta razón, la Herbimicina A y la Genisteína son buenos inhibidores cuando se utilizan en ensayos radiactivos de fosforilación en los cuales el ATP se utiliza a concentraciones muy bajas (no fisiológicas, entre 1-5  $\mu\text{M}$ ). Puesto que las concentraciones de ATP dentro de la célula son mucho más altas (milimolar), y que en los ensayos de inhibición de fosforilación realizados en el laboratorio la concentración a la que se utiliza el ATP (300  $\mu\text{M}$ ) se acerca más a las concentraciones fisiológicas, es razonable pensar que el LG será un mejor inhibidor que los anteriores cuando se ensaye no sólo en extractos crudos de células, sino también en estudios de células en cultivo.

## **5.2. Efecto del LG sobre las PTKs de células Wehi 231 en cultivo.**

El estudio del efecto que el LG ejerce sobre la fosforilación de proteínas en tirosina ha sido estudiado bajo dos tipos de condiciones. Los estudios se llevaron a cabo no sólo en células Wehi-231 en PBS estimuladas con pervanadato y con anti-IgM, inductor específico de estas células (Cuende *et al* 1993), en períodos cortos de tiempo (1 hora), sino también en células Wehi-231 cultivadas a concentraciones

crecientes de LG a períodos de tiempo máximos de 24 horas y posteriormente estimuladas con pervanadato. En ambos casos se ha demostrado que el LG es capaz de inhibir a las PTKs presentes en estas células. Cuando las células se estudiaron a periodos cortos de tiempo y en PBS a una concentración fija de LG de 10  $\mu\text{M}$  este efecto es claramente visible a los 15 minutos de la incubación con LG y es total al cabo de 60 minutos (figura 2.A). Cuando se comparan los efectos del LG con la Herbimicina A o con la Genisteína en las condiciones anteriores, se reproduce de nuevo el efecto que se había observado con los extractos celulares, es decir, la fuerte inhibición producida por LG a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  frente a la prácticamente nula inhibición por parte de la Herbimicina A y la Genisteína (figura 2.B). Mientras que la activación de la fosforilación en tirosina de proteínas por pervanadato (debida a la inhibición de las fosfatas celulares) es inespecífica, la estimulación con anti-IgM es exclusiva de este tipo de células e induce la fosforilación de un menor número de proteínas en tirosina (figura 2.C.). También en este caso la fosforilación se encuentra inhibida por LG desde los primeros minutos de incubación con este compuesto. Cuando se realizan los experimentos en células en cultivo (suplementado con 10% FCS) a 24 horas, también se observa una clara relación dosis respuesta con respecto a la fosforilación de proteínas en tirosina. Para concentraciones de LG superiores a 2.5  $\mu\text{M}$  el efecto es claramente detectable (figura 3). Estos datos no son contradictorios debido a que los ensayos se llevan a cabo bajo distintas condiciones de experimentación (principalmente la presencia de FCS en el medio de cultivo). Sin embargo, ambos hacen evidente la capacidad que muestra el

LG para inhibir la acción de las PTKs en este tipo de células a concentraciones inferiores a las que requieren otros inhibidores clásicos para ejercer el mismo efecto.

### **5.3. Efecto de los derivados del ácido gálico sobre la proliferación celular en líneas tumorales y linfocitos humanos.**

El efecto del ácido gálico y sus derivados se ha estudiado sobre la proliferación en distintas líneas celulares. En la línea Wehi-231 (figura 4) se observa una clara relación estructura-función entre la inhibición de la proliferación y la longitud de la cadena alifática en los distintos derivados ( $I_{50}$  de 40, 25, 12, 1.5 y 1  $\mu\text{M}$  para el ácido gálico, metil galato, propil galato, octil galato y lauril galato respectivamente). El tanino (polímero del ácido gálico) también exhibió un alto poder antiproliferativo con una  $I_{50}$  de 9  $\mu\text{M}$ . El efecto de estos compuestos también se estudió sobre la línea L929 (fibroblastos murinos) (figura 5), una vez más la relación estructura-función se hizo aún más evidente presentando  $I_{50}$  de 250, 30-40, 1 y 1 $\mu\text{M}$  para el ácido gálico, metil galato, propil galato, octil galato y lauril galato respectivamente. En este caso también el tanino mostraba un efecto antiproliferativo con una  $I_{50}$  de alrededor de 40  $\mu\text{M}$ . Los resultados del estudio del efecto de estos compuestos sobre linfocitos de sangre periférica muestran unas peculiaridades interesantes. Mientras que éstos inducían un efecto antiproliferativo cuando se ensayaban con PBLs en cultivo estimulados con PHA (figura 6) presentando unas  $I_{50}$  similares a los de los otros

tipos de líneas celulares estudiadas, los PBLs mostraban una resistencia muy superior al efecto del LG en ausencia del mitógeno (figura 7.A) y después del lavado del inhibidor estas células recuperaban su capacidad de proliferación tras la adición de PHA. La selectividad que presenta este compuesto para actuar sobre células activadas abre la posibilidad de utilizarlo como agente antitumoral. Estos resultados están de acuerdo por trabajos publicados por otros autores en los que los taninos (*Gali et al 1991*), el ácido gálico (*Inoue et al 1994*), otros compuestos polifenólicos (catequinas, isoflavonoides) (*Yang et al 2001*) así como compuestos fenólicos simples (hidroxitirosol y tirosol) (*Owen et al 2000*) muestran un efecto protector sobre la carcinogénesis inducida por distintos agentes.

Dado que la hidrofobicidad parece ser muy importante para su acción, una posible explicación puede ser la permeabilidad de estos compuestos a través de la membrana celular o bien una mejor interacción con el/los enzima(s), dado que la capacidad inhibidora del LG *in vitro* es 10 veces mayor que el del ácido gálico sobre PTKs parcialmente purificadas de bazo humano. Puesto que el LG era el que mostraba una mayor actividad antiproliferativa en las líneas anteriores, se estudió el efecto que este compuesto ejercía sobre la proliferación de distintas líneas tumorales a las que teníamos acceso en el laboratorio. Como se observa en la tabla I del apartado 4.3 el LG muestra distintas  $I_{50}$  para las líneas celulares ensayadas. Dos tipos de células (HT-29 y K-562) mostraban mayor resistencia al efecto de este compuesto. Una de las hipótesis planteadas fue la existencia de esterasas que hidrolizaran al LG produciendo ácido gálico y lauril alcohol, ejerciendo el ácido gálico menor poder inhibitorio

que el LG. Esta hipótesis se discutirá con mayor profundidad en el apartado 5.5.6.

#### **5.4. Estudio de los mecanismos sobre los cuales el LG ejerce su acción.**

Puesto que otros inhibidores de proteín tirosín quinasas como la Estaurosporina, o específicas de las PTKs como la Herbimicina A y la Genisteína (Uckun *et al* 1995; Burger *et al* 1995) eran capaces de inducir apoptosis en distintas líneas celulares, intentamos comprobar la hipótesis de que los derivados del ácido gálico, también inhibidores de PTKs, pudieran ejercer el mismo efecto dado la capacidad antiproliferativa mostrada anteriormente. Saeki *et al* (2000) han demostrado que los derivados lipídicos de ácido gálico (farnesil galato deshidrogenado, laurilamida del ácido gálico, epigallocatequín galato) son capaces de inducir apoptosis en la línea celular de leucemia monoblástica humana U937. También Sakaguchi *et al* (1999) ponen de manifiesto la inducción de muerte celular programada a través de estos compuestos. Puesto que el LG era el que mayor efecto antiproliferativo mostraba, se eligió este compuesto para poder estudiar su acción en distintos estadios de este proceso sobre la línea Wehi-231.

#### 5.4.1. Efecto sobre el potencial de la membrana mitocondrial.

El efecto sobre la funcionalidad mitocondrial es de particular importancia desde que se asumió que esta organela era el punto clave de casi todos los modelos de inducción de apoptosis por distintos compuestos. Es conocido que uno de los fenómenos tempranos dentro del proceso de apoptosis es la descarga del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en respuesta a distintos inductores apoptóticos. El consiguiente desacoplamiento de la cadena respiratoria (Zamzami *et al* 1995) y la liberación de los componentes mitocondriales tales como el citocromo c (Liu *et al* 1996) y del AIF (Susin *et al* 1999) son considerados como los ejecutores clave dentro de la fase efectora del proceso de apoptosis. Como se observa en la figura 8 las células Wehi-231 en PBS y cargadas con 10  $\mu$ M LG en un tiempo máximo de 1 hora presentan un rápido decrecimiento en la intensidad de fluorescencia del DIOC<sub>6</sub>(3), compuesto lipofílico utilizado normalmente en análisis de citometría de flujo para estudiar la integridad del potencial de membrana mitocondrial. Resultados similares se han descrito para inhibidores de la cadena respiratoria como la oligomicina y la antimicina (Castedo *et al* 1998). Aunque se puede observar un paralelismo cronológico entre el efecto del LG sobre la fosforilación de proteínas en tirosina y la descarga del potencial de la membrana mitocondrial (figura 8 apartado 4.4.1) no existen datos anteriores que relacionen ambos procesos.

El estudio comparativo con Herbimicina A (figura 9) demostró que el LG y este compuesto no compartían el mismo mecanismo de acción, puesto que la Herbimicina no era capaz de descargar el potencial de la membrana mitocondrial a iguales condiciones de ensayo.

#### 5.4.2. Efecto sobre la expresión de fosfatidilserina en las membranas.

La figura 10 muestra que el LG además de sobre la membrana mitocondrial también ejercía su efecto sobre la expresión de fosfatidilserina al exterior de la membrana celular. Este es un proceso relativamente temprano dentro del proceso de muerte celular programada (**Emoto *et al* 1998**), y en efecto, cuando se incubaba este compuesto con células Wehi-231-neo la expresión de PS en el exterior de la membrana se hacía presente a las 5 horas de incubación y era máximo a las 7 horas. Sin embargo las células Wehi-231-bcl-2 presentaban un retraso en este efecto, mostrando un ligero incremento en la deslocalización de la PS entre las 7 y 9 horas. Esto indica que en aquellas células en las que se sobre-expresa Bcl-2 éste actúa dentro de la célula retrasando este proceso, y por tanto la muerte por apoptosis. También se observa un ligero decrecimiento en la fluorescencia de Anexina V entre las 7 y 9 horas en las células Wehi-231-neo que puede ser interpretado como resultado de la muerte celular y de la agregación.

#### 5.4.3. Efecto sobre la liberación de citocromo-c al citosol.

En este estudio también se ha visto el efecto del LG sobre la liberación del citocromo-c al citosol. La activación de la ruta de caspasas por citocromo-c ha sido descrita como punto clave en el proceso de apoptosis por distintos autores (Liu *et al* 1996). La figura 11 muestra el contenido citosólico de citocromo- c inducido por LG a distintos tiempos, y una vez más el estudio comparativo entre las células Wehi-231-neo y Wehi-231--bcl2 muestra un retraso de 2 horas en este proceso en aquellas células que sobre-expresan Bcl-2.

#### 5.4.4. Activación de caspasas

Otra de las características de la apoptosis es la activación de la cascada de las caspasas (Zhivotovsky *et al* 1997). Estas caspasas son capaces de actuar sobre un selectivo patrón de proteínas dentro de este proceso. Dentro de la gran variedad de caspasas existentes, en este trabajo se ha estudiado el efecto del LG sobre la inducción de caspasa-3. La actividad de este enzima ha sido estudiada sobre dos tipos de sustratos, un sustrato artificial DEVD-AFC y sobre un sustrato natural (PARP). En la figura 12 del apartado 4.4.4 se observa que la activación de la cascada de las caspasas sufre un retraso de 2 horas en aquellas células que sobre-expresan Bcl-2. Sin embargo, la mayor diferencia se observa en la hidrólisis de la PARP. Mientras que en las células

Wehi-231-neo la hidrólisis de este sustrato empieza a ser visible a las 6 horas y es total después de 10 horas, en las células Wehi-231-bcl-2 a las 15 horas sólo se ha hidrolizado un 50%. Una vez más el efecto protector del Bcl-2 se hace evidente (figura 13).

#### 5.4.5. Activación de endonucleasas.

La aparición de bandas oligonucleosomales producto de la acción de endonucleasas activadas por caspasas es uno de los puntos más característicos del proceso apoptótico. Como se observa en la figura 14 la incubación de las células en presencia de concentraciones crecientes de LG induce la activación de endonucleasas con la consecuente aparición de bandas oligonucleosomales. A partir de concentraciones entre 1-2  $\mu\text{M}$  el efecto es claramente visible. A estas concentraciones se observa una relación dosis-efecto entre la aparición de bandas oligonucleosomales y la inhibición de PTKs en las células Wehi-231 (figura 3 apartado 4.4.2.).

#### 5.4.6. Estudio del papel protector del Bcl-2 sobre la inducción de apoptosis por LG.

Desde hace años se conoce el papel protector del Bcl-2 sobre el proceso de apoptosis (Hockenbery *et al* 1993; Hockenbery *et al* 1990). Aunque el mecanismo(s) por el cual ejerce su efecto

antiapoptótico está todavía en estudio, parece que su principal diana de acción es la mitocondria, donde estabiliza el potencial transmembranal (Mazo *et al* 1998), previniendo así la liberación del citocromo c (Reed 1997) y del AIF (Susin *et al* 1999) al citosol. Para estudiar si el Bcl-2 podía proteger a la célula del efecto proapoptótico del LG se han realizado estudios, como se ha visto en apartados anteriores, con dos tipos de células unas Wehi-231-bcl-2 (células Wehi transfectadas con un vector para Bcl-2, sobre-expresando esta molécula) y Wehi-231-neo (transfectadas con un vector para vacío para Bcl-2). La figura 15.A muestra como el LG es capaz de inducir la expresión de RNA mensajero para Bcl-2, ya que en células en reposo es prácticamente indetectable. Cuando se comparan células Wehi-231-neo con Wehi-231-bcl-2 se ha visto un retraso de la liberación del citocromo-c al citosol, de la actividad de la caspasa- 3 y de la expresión de PS en el exterior de la membrana celular (apartados 5.4.2, 5.4.3., 5.4.4.). A parte de estos estudios, se ha podido demostrar que células que sobre-expresan Bcl-2 en presencia de LG presentan integridad de la membrana mitocondrial hasta al menos 12 horas después de la incubación, en comparación con aquellas células Wehi-231-neo que ya a las 7 horas de incubación con el compuesto comienzan a perder esta integridad (figura 15.B). También se ha demostrado que un 85% de las células Wehi-231-Bcl-2 no presentan variaciones del contenido de DNA (hipodiploidía) hasta más de las 8 horas de incubación con LG. Sin embargo un 50% de las células Wehi-231-neo ya presentan hipodiploidía a ese tiempo de

incubación (figura 16). Los resultados anteriores muestran el papel parcialmente protector que ejerce esta molécula.

### **5.5. Efecto del lauril galato sobre la inducción y regresión de tumores por agentes químicos sobre ratones IRC.**

Puesto que el LG y otros derivados del ácido gálico son mucho más activos sobre células tumorales que sobre linfocitos normales en cultivo, es posible pensar que estos compuestos puedan ser utilizados como agentes antitumorales *in vivo*. Para estudiar el efecto *in vivo* se indujeron químicamente con DMBA como inductor y con PMA como mitógeno tumores de piel sobre ratones IRC. Primeramente se ensayó el LG como inhibidor de la formación de tumores. La administración tópica conjunta del mitógeno junto con el inhibidor a distintas concentraciones mostró una relación dosis-efecto en la inhibición de la aparición del tumor. El 75% de los ratones con la mayor dosis del fármaco (150  $\mu$ g semanales) no presentaron formación de tumor. Sin embargo no estaba claro si esta inhibición pudiese ser producto de la desigual relación de cantidades entre el PHA/LG de 5/50, impidiendo el LG la entrada del mitógeno a la epidermis del animal. Sin embargo, el estudio sobre la regresión de tumores siguió también un patrón lineal. A medida que se aumentaba la dosis del compuesto la regresión de los tumores era mayor. Este ensayo tuvo que sufrir modificaciones en el método de inducción química de tumores, puesto que el disolvente que se utilizaba, la acetona, producía deslipidización con la consiguiente formación de escaras en la

piel de los animales. La modificación del protocolo implicó el cambio de disolvente pasando de la utilización de la acetona a una mezcla de DMSO-Glicerol (1:1). Se pudo comprobar que el LG, en efecto, inhibía la formación de estos tumores de piel, ya que en estudios posteriores sobre la regresión de este tipo de tumores se observó que también existía una relación dosis-efecto, y que los animales no sólo perdían el tumor (principalmente los de mayor dosis en el tratamiento) sino que se recuperaban totalmente, e incluso desarrollaban de nuevo el pelo en la zona de aplicación del producto. La figura 25 muestra los estudios anatomopatológicos de piel sana, tumoración, tumor tratado con LG, y piel después de la desaparición del tumor mostrando células en apoptosis en cortes de los tumores tratados con LG.

Una de las ventajas que presenta la utilización de estos productos con respecto a otros inhibidores de PTKs que se utilizan actualmente como inhibidores tumorales, tales como la Herbimicina A (**Zhao et al 2000**), es la baja toxicidad (**Van Esch 1955**), haber sido utilizados durante muchos años como aditivos alimentarios (lo que implica que una gran parte del trabajo farmacocinético ya ha sido realizado), y que son compuestos aprobados para el consumo humano. Aunque la utilización de taninos y otros derivados del ácido gálico forman parte de la farmacopea tradicional oriental (**Chung et al 1998**), y dado que algunos han sido ensayados para la prevención de la aparición de algunos tumores (**Gali et al 1991**), sólo el epigalocatequín galato, compuesto obtenido del té verde, se halla en la actualidad en estudios de fase preclínica (**Suganuma et al 1999**). Otra ventaja de los derivados del ácido gálico, que hemos venido utilizando, es su bajo coste, entre mil y diez mil veces más

baratos que los inhibidores obtenidos de síntesis químicas (tirfostinas) o purificados de extractos de plantas y hongos.

### 5.6. Síntesis y caracterización del lauril galato radiactivo (LG-C<sup>14</sup>)

La mayor parte de los estudios realizados con inhibidores sobre PTKs presentan una indeterminación importante a la hora de formular un posible mecanismo de acción. Para poder valorar parámetros como permeabilidad celular, concentración intracelular, unión a organelas, catabolismo de compuesto, unión a proteínas, etc., la utilización de la molécula marcada es sin duda la elección más apropiada. La dificultad se presenta cuando la molécula a estudiar no se encuentra en el mercado y hay que sintetizarla en el laboratorio. Se ha sintetizado el compuesto radiactivo mediante la modificación del proceso de síntesis industrial original, descrita desde el año 1947 por **Ault *et al***, en la que utilizaba como disolvente lauril alcohol uno de los reactivos de la reacción. Como en nuestro caso el LOH era el reactivo limitante se tuvo que poner a punto un proceso de síntesis original ensayando distintos disolventes, temperaturas, catalizadores y condiciones generales de la esterificación. Finalmente hemos conseguido sintetizar LG radiactivo utilizando LOH- 1-<sup>14</sup>C, ácido gálico en exceso, 2-4-dinitrobenceno para evitar la formación de polímeros, ácido β-naftalensulfónico como catalizador ácido de la reacción y dioxano como disolvente. El producto sintetizado se separa por HPTLC utilizando hexano/acetona/ácido acético (50/50/0.625) como muestra la figura 27 (Rf para el LOH de 0.7, para el LG de 0.6 y 0.4 para el ácido gálico). Tras 96 horas de reacción en ampolla cerrada a

120° en atmósfera de nitrógeno el rendimiento obtenido es del 95% y la actividad específica de 55 mCi/mmol. Paralelamente se realizó la misma reacción con LOH sin marcar y al producto purificado se le realizó el espectro de masas (Dr. Jesús Sanz. Centro Nacional de Química orgánica) que se muestra en la figura 30.A. **Miketova *et al* (2000)** han caracterizado distintos polifenoles derivados del ácido gálico a través de estudios de espectrometría de masas en tandem. Cuando se compara con el espectro obtenido del LG comercial (figura 30. B) se puede prácticamente superponer observándose en ambos a una masa de 338 el ión molecular y a 170 y 153 los iones de fragmentación principales. Este resultado unido a la comigración del producto radiactivo sintetizado con el producto comercial en capa fina (figura 28) indica que el compuesto sintetizado es realmente LG y que se halla con un grado de pureza superior al 95.

Es de interés averiguar si el LG puede ser degradado en la célula proporcionando sus productos de hidrólisis, de manera que uno de ellos, el ácido gálico, ejerza en menor grado el efecto visto con el LG, explicando así la resistencia mayor al efecto de este compuesto por parte de algunas de las líneas celulares ensayadas.

### **5.7. Estudio de la captación y estabilidad del LG en células Wehi 231.**

Cuando se estudió el efecto inhibitorio del LG sobre la fosforilación en tirosina de proteínas en células Wehi 231 incubadas en PBS o en medio

completo suplementado con FCS al 10% a tiempos máximos de 1 hora, se observó que el efecto era mucho mayor en ausencia de FCS. Una posible explicación a estos resultados podría ser la menor accesibilidad del compuesto a las células en medio completo suplementado debido al secuestro por proteínas séricas. La figura 33 muestra una mayor captación de LG radiactivo (87%) cuando las células se incubaban en PBS mientras que sólo se encontraba un 13% captado por las células cuando se incluía FCS al medio. Estos resultados implicarían una concentración efectiva mucho mayor (6 veces) en aquellas células que se encontraban en PBS y explicaría que los efectos fueran muchos más pronunciados. Para ver si alguna de las proteínas presentes el FCS era capaz de unir al LG se realizaron estudios por FPLC e isoelectroenfoque del FCS incubado con el compuesto. Como se muestra en las figuras 34 y 35 la mayor parte del compuesto copurificaba con la albúmina tanto en filtración sobre gel como por isoelectroenfoque. El hecho de que el LG es una molécula con carga neta 0 hace que el pI del complejo albúmina-LG sea el mismo que el de la albúmina. Una vez visto que el LG era captado mayoritariamente por la albúmina el siguiente paso fue el estudio de la estabilidad del compuesto así como su cesión a las células. La unión de sustancias lipídicas a la albúmina es un hecho conocido desde hace años. **Elmadhoun et al (1998)** han estudiado las características fisicoquímicas de esta unión y la cesión del ácido palmítico a células. La puesta a punto de un complejo albúmina-LG\* ha permitido el estudio de la estabilidad del LG, cesión del compuesto y compartimentación celular.

Se ha podido demostrar que el LG galato es un compuesto estable, como estaba descrito anteriormente en la literatura (**Van der Heyden *et al* 1986**), ya que no se han detectado sus productos de hidrólisis por efecto de esterasas específicas presentes en las líneas celulares Wehi-231 y K-562 (figura 36 del apartado 4.6.8). También se ha observado la presencia mayoritaria de LG\* en la fracción particulada de estas células (figura 37 apartado 4.6.9) lo que indica una cesión del compuesto por parte de la albúmina, explicando así el retraso en la inhibición de la fosforilación en tirosina de proteínas cuando el LG se incuba con células en medio de cultivo completo frente a la incubación del compuesto con células en PBS.

### **5.8. Consideraciones finales**

Aunque el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo no permite el establecimiento de un mecanismo inequívoco mediante el cual el lauril galato y otros derivados del ácido gálico ejercen su acción proapoptótica, sí que proporciona base suficiente para poder realizar las consideraciones siguientes:

Primera, el lauril galato inhibe la fosforilación de proteínas en tirosina tanto en extractos crudos como en células en cultivo. La inhibición observada es prácticamente total en ambos casos, indicando que el compuesto se comporta como un inhibidor de amplio espectro ejerciendo su acción tanto sobre PTKs citosólicas como ancladas en fracción

particulada. Estos resultados corroboran los obtenidos en nuestro laboratorio en extractos de bazo humano (Lázaro *et al* 1995) y PTK c-Src purificada de plaquetas humanas (Palacios *et al en prensa*), donde también se demostró su especificidad por PTK al no resultar inhibidor de serín/treonín quinasas como proteín quinasa A o caseín quinasa II de cerebro de rata. Cuando se compara la potencia inhibidora del lauril galato con la de otros inhibidores clásicos de PTKs como Herbimicina A, Genisteína o tirfostinas, este compuesto resultó ser mucho más activo cuando se ensayaba en presencia de concentraciones de ATP más cercanas a los niveles fisiológicos.

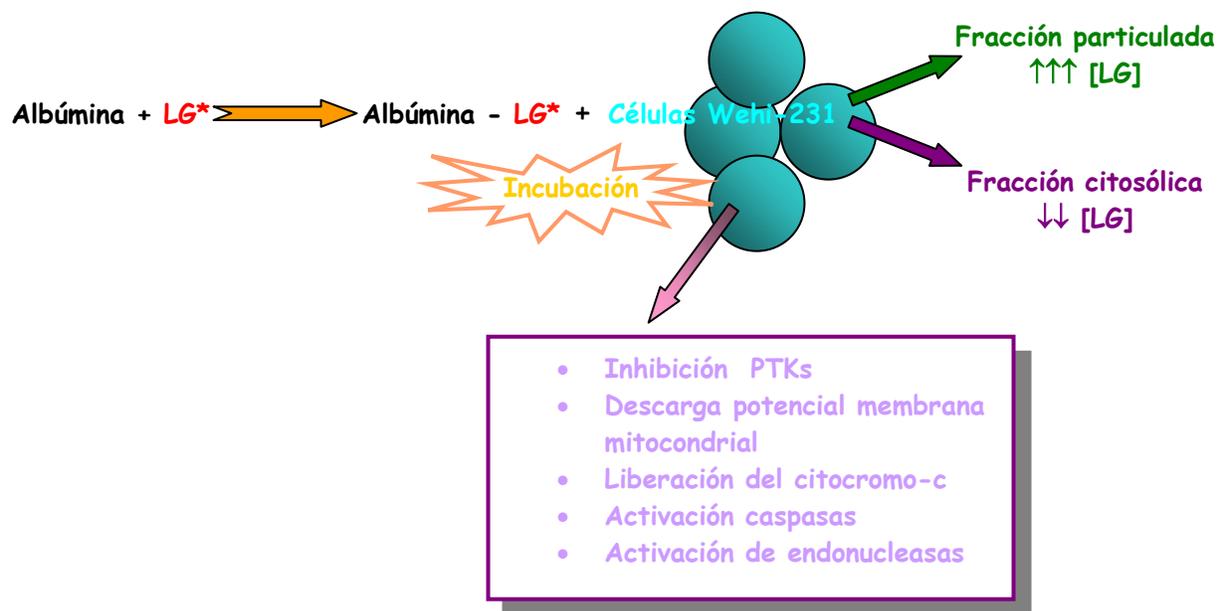
Segunda, cuando las células Wehi-231 se incuban en presencia de lauril galato y ausencia de suero de ternera fetal, se puede detectar en cuestión de minutos, y antes de que las células muestren signos de hipodiploidía, una serie de efectos tempranos entre los que merecen destacar: la inhibición de la fosforilación en tirosina de proteínas, la descarga del potencial transmembrana mitocondrial y la inducción de mRNA para Bcl-2. El efecto sobre la funcionalidad mitocondrial tiene una importancia capital puesto que a esta organela se le ha asignado durante los últimos años un papel central en prácticamente todos los modelos de inducción de apoptosis por distintos agentes. Del paralelismo cronológico observado entre la inhibición de PTKs y la descarga del potencial mitocondrial surge la pregunta de si el efecto proapoptótico del lauril galato se debe a un efecto dual e inconexo sobre la mitocondria y las PTKs o si la inhibición de PTKs está relacionada con la integridad mitocondrial. Hasta la fecha no se ha descrito que las PTKs jueguen un

papel importante en la funcionalidad mitocondrial y no se conocen PTKs mitocondriales, como tampoco bacterianas, aunque no se puede descartar que su implicación en la fosforilación de proteínas que interaccionan con la membrana externa mitocondrial y que dependiendo de su estado de fosforilación/desfosforilación puedan ejercer una acción protectora/nociva sobre la integridad de ésta. La descarga del potencial de membrana mitocondrial ha sido descrita para inhibidores de proteínas quinasas como la Estaurosporina (Susin *et al* 1999). Sin embargo como hemos observado, otros como la Herbimicina A, no producen este efecto, mientras que el lauril galato si lo produce asemejándose más a la Estaurosporina en este aspecto. Un mecanismo especulativo mediante el cual el lauril galato podría afectar a la funcionalidad mitocondrial podría basarse en la estructura de esta molécula, potencialmente capaz de atravesar membranas por sus características lipofílicas y sin carga, que podría intercalarse en la cadena respiratoria donde competiría dada su capacidad para adquirir formas quinoideas y semiquinoideas con las quinonas que representan los componentes móviles de la cadena respiratoria en el sitio II de fosforilación de la misma. Sin duda, el estudio del efecto de este compuesto sobre el consumo de oxígeno acoplado a la síntesis de ATP en mitocondrias aisladas podría proporcionar datos de gran interés, y están previstos para un futuro. Asimismo, la utilización del compuesto radiactivo que se ha llevado a cabo como una parte de este trabajo podrá proporcionar datos sobre su permeabilidad y proteínas con las que puede interaccionar.

También la inducción de mRNA para Bcl-2 es digno de un análisis más detallado. El hecho de que se produzca en los primeros 10 minutos, indica que la señal inducida por el lauril galato llega al núcleo muy rápidamente activándose los factores de transcripción para Bcl-2 lo que refleja que la célula percibe un daño, activando mecanismos para repararlo como es la síntesis de la proteína Bcl-2 que ejerce un papel protector sobre la integridad mitocondrial impidiendo la liberación del citocromo-c y del AIF al citosol, los cuales activan rutas irreversibles (caspasas y endonucleasas). Cuando se utilizan células Wehi-231 que sobre-expresan Bcl-2 el proceso de apoptosis se retrasa, indicando que existe una protección parcial, pero no suficiente, para reparar el daño inducido por el lauril galato.

Tercera, cuando las células se incuban con lauril galato en presencia de medio completo (suplementado con suero de ternera fetal) se observa un retraso en la aparición de los fenómenos anteriormente descritos. Una posible explicación podría ser que proteínas presentes en el medio unieran este compuesto disminuyendo la concentración real del mismo accesible a las células. Esta hipótesis se ha visto confirmada mediante la utilización de LG radiactivo y análisis por filtración sobre gel e isoelectroenfoque de las proteínas a las que se une. El componente al que se unía mayoritariamente el LG resultó ser la albúmina. Posteriormente el LG transportado por la albúmina puede ser transferido a las células en las que vías de activación del proceso apoptótico se observan claramente aunque en un período de tiempo más dilatado.

En resumen, el efecto del lauril galato sobre el sistema utilizado se podría esquematizar de la siguiente manera:



El efecto proapoptótico del lauril galato se ajustaría a un proceso de inducción de apoptosis clásico.

Cuarta, el estudio del lauril galato sobre tumores de piel inducidos químicamente en ratones se ha abordado desde dos vertientes:

- Inhibición de la formación de los tumores
- Regresión de los tumores

Se ha demostrado que el lauril galato no sólo es capaz de inhibir la formación de tumores de piel en ratones, sino que también es capaz de

ejercer una regresión, con recuperación total de la epidermis del animal, una vez que se han desarrollado los mismos. Estudios anatomopatológicos posteriores han mostrado que tumores tratados con lauril galato presentan células en apoptosis.

Quinto, es ampliamente conocido que el lauril galato es un antioxidante que durante años ha sido utilizado como aditivo alimentario (E-312), debido a su capacidad de secuestrar especies reactivas de oxígeno (ROS) responsables del enranciamiento de grasas, a concentraciones que exceden en varios órdenes de magnitud a la concentración utilizada en el presente trabajo. Por esta razón creemos que el estudio de su actividad proapoptótica pudiera ser de especial interés para el uso de este compuesto como un potente agente antitumoral. En resumen, la disponibilidad de este compuesto en cantidades de gramos a un bajo coste (en comparación con otros inhibidores de PTKs) y debido a que la mayor parte del trabajo farmacocinético ya ha sido realizado, hacen pensar en la posibilidad del uso del lauril galato con fines terapéuticos.

**CONCLUSIONES**

1. El lauril galato es capaz de inhibir la fosforilación de proteínas en tirosina tanto en extractos crudos como en células Wehi-231 en cultivo.
2. El ácido gálico y sus ésteres (metil, propil, octil y lauril galato) son capaces de inhibir la proliferación de distintas líneas celulares y linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina. Su potencia inhibidora está relacionada con la longitud de la cadena alifática y se puede ordenar como sigue: lauril galato  $\geq$  octil galato  $\gg$  propil galato  $\geq$  metil galato  $\geq$  ácido gálico.
3. Los linfocitos humanos tienen distinta sensibilidad al efecto del lauril galato dependiendo de que estén en reposo o activados. Estos resultados sugieren que el compuesto tiene una cierta selectividad por células en proliferación.
4. Cuando las células Wehi-231 se incuban en presencia de lauril galato en PBS, se pueden detectar como efectos más tempranos y antes de que las células muestren signos de hipodiploidía: inhibición de la fosforilación de proteínas en tirosina, inducción de RNA mensajero para Bcl-2 y descarga del potencial de membrana mitocondrial.
5. En cultivos en medio completo y suplementado con suero de ternera fetal, los fenómenos apoptóticos se retrasan. Sin embargo, se pueden observar claramente los signos característicos de la cascada de fenómenos que conducen a la apoptosis celular: descarga del potencial de membrana mitocondrial, eflujo del citocromo c de la mitocondria al citosol, exposición de

fosfatidil serina en la capa externa de la membrana celular, activación de caspasas y aparición de bandas oligonucleosomales.

6. Se ha comparado el efecto que el lauril galato ejerce sobre células que sobre-expresan la proteína Bcl-2 (Wehi-231-bcl-2). Los fenómenos apoptóticos se retrasan alrededor de dos horas con respecto a células Wehi-231 normales (Wehi-231-neo) indicando que sólo se puede obtener una protección parcial por efecto de esta proteína.

7. Se han inducido químicamente tumores de piel en ratones por aplicación tópica de dimetilbenzantraceno (DMBA) y forbolmiristato acetato (PMA) disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerina en una relación de 1:1. Este protocolo evita la formación de escaras que tiene lugar cuando los anteriores compuestos se disuelven en acetona.

8. Cuando se incluye lauril galato en las soluciones de PMA se produce una inhibición de la inducción del tumor proporcional a la concentración de lauril galato en la solución.

9. La aplicación tópica de lauril galato sobre tumores inducidos por DMBA y PMA da lugar a una regresión del tumor con el resultado final de su desaparición, y este fenómeno es proporcional a la concentración de lauril galato en la solución que se aplica. El compuesto no produce efectos sobre piel sana.

10. Se ha sintetizado lauril galato-  $^{14}\text{C}$  a partir de lauril alcohol-1- $^{14}\text{C}$  y ácido gálico mediante un procedimiento original. La caracterización y pureza del producto de síntesis han sido demostradas por sus características cromatográficas en capa fina de gel de sílice y espectrometría de masas.

11. El lauril galato marcado ha permitido demostrar que la albúmina presente en el suero de ternera fetal es la proteína a la que se une preferentemente y que puede ser cedido a las células posteriormente. También se ha podido comprobar que este compuesto tiene gran estabilidad y que, por tanto, es el lauril galato y no sus productos de hidrólisis los que producen el efecto sobre las células.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Abe, I.**, Seki, T., Noguchi, H. 2000. "Potent and selective inhibition of squalene epoxidase by synthetic galloyl esters". *Biochem Biophys Res Commun.* **270**. 137-140

**Abe, I.** Kashiwagi, K., Noguchi, H. 2000. "Antioxidative galloyl esters as enzyme inhibitors of p-hydroxybenzoate hydroxylase" *FEBS Lett.* **483**. 131-134.

**Accili, D.**, Cama, A., Barbetti, F., Kadowaki, H., Kadowaki, T., Taylor, S.I. 1992. "Insulin resistance due to mutations of the insulin receptor gene: an overview". *J Endocrinol Invest.* **15**. 857-864.

**Ahmad, N.**, Mukhart H. 2001. " Cutaneous photochemoprotection by green tea: a brief review". *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* **14**. 69-76.

**Ashman, L.K.** 1999. "The biology of stem cell factor and its receptor C-kit". *Int J Biochem Cell Biol.* **31**. 1037-1051.

**Avraham, H.**, Park, S.Y., Schikmann, K., Avraham, S. 2000. " RAFTK7Pyk2-mediated cellular signalling". *Cell Signal.* **12**. 123-133.

**Ault, W.C.**, Weil, J.K., Nutting, G. C., Cowan, J.C. 1947. " Direct esterification of gallic acid with higher alcohols". *J Am Chem Soc*, **69**. 2003-2005.

**Akiyama, T.**, Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. 1987. "Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases" *J Biol Chem.* **262**, 5592-5595.

**Barnekow, A.** 1983. "Effect of several nucleotides on the phosphorylating activities of the Rous-sarcoma-virus transforming protein pp60 (v-src) and its cellular protein homologue, pp60 (c-src)". *Bioscience Rep*, **3**, 153-162.

**Ben-Bassat, H.**, Klein, B.Y. "Inhibitors of tyrosine kinases in the treatment of psoriasis". *Curr Pharm Des.* **6**. 933-942.

**Billis, W.M.**, White, B.a. 1997. "Effects of the protein tyrosine kinase inhibitor, herbimycin A, on prolactin gene expression in GH3 and 235-1 pituitary tumor cells". *Biochem Biophys Acta.* **1358**. 31-38.

**Bjorge, J.D.**, Jakymiw, A., Fujita, D.J. 2000. "Selected glimpses into the activation and function for src kinase". *Oncogene.* **19**. 5260-5635.

**Blume-Jensen, P.**, Hunter, T. 2001. "Oncogenic kinase signalling" *Nature.* **411**. 355-365.

**Bolen, J.B.** 1995. "Protein tyrosine kinase in the initiation of antigen receptor signaling". *Curr Opin Immunol*, **7**, 306-311.

**Burger, A.M.**, Kaur, G., Alley, M.C., Supko, J.G., Malspeis, L., Grever, M.R., Sausville, E.A. 1995. "Tyrphostin AG17, [(3,5-di-ter-butyl-4-

hydroxybenzylidene)-malonitrile, inhibits cell growth by disrupting mitochondria" *Cancer Res.* **55**. 2794-2799.

**Campbell, M.A.**, and Sefton, B.M. 1992. "Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the Src family of protein tyrosine kinases". *Mol Cell Biol*, **12**, 2315-2321.

**Carbajo Sánchez, A.** 1994. "Compendio de datos toxicológicos y de identidad y pureza de los alimentos" pp. 134-135. Ministerio de Sanidad y Consumo. España.

**Castedo, M.**, Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G. 1996. "Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis". *J Immunol.* **157**. 512-521.

**Chang, C.W.**, Hsu, F. L., Lin, J.Y. 1994. "Inhibitory effects of polyphenolic catechin from chinese green tea on HIV reverse transcriptase activity". *J Biomed Sci.* **1**. 163-166.

**Chung, K.T.**, Wong, T.Y., Wei, C.I., Huang, Y.M., Lin, Y. 1998. Tannins and human health". *Crit Rev Food Sci Nutr.* **38**. 421-464.

**Cuende, E.**, Ales-Martínez, J.E., Ding, L., González-García, M., Martínez, C., Núñez, G. 1993. "Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells". *EMBO J.* **12**, 1555-1560.

**Cumbreño Martínez, J.A.** 1987. "Lista positiva de aditivos alimentarios". Ministerio de Sanidad y Consumo, España. Ed., Vol II, E-310, E-311, E-312.

**Davis, R.J., Czech. M.P.** 1985. "Amiloride directly inhibits growth factor receptor tyrosine kinase activity". *J Biol Chem.* **260.** 2543-2551.

**Deshpande, S.S., Sathe, S.K., Salunkhe D.K.** 1984. "Chemistry and safety of plant polyphenols". *Adv Exp Med Biol.* **177.** 457-495.

**Donella-Dean, A., Monti, E., Pinna, L.A.** 1989. "Inhibition of tyrosine protein kinase by the antineoplastic agent adriamycin". *Biochem Biophys Res Commun.* **160.** 1309-1315.

**Elder, J.T. et al.** 1989. "Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis" *Science,* **243,** 811-814.

**Elmadhoun, B.M., Wang, G.O., Templeton, J.F., Burczynski, F.J.** 1998. "Binding of <sup>3</sup>H-palmitate to BSA". *Am J Physiol.* **275.** G638-644.

**Emoto, K., Toyamasonimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K., Umeda, M.** 1997. "Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells" *Exp Cell Res.* **232.** 430-434.

**Erneux, C.,** Cohen, S., Garbers, D.L. 1983. "The kinetics of tyrosine phosphorylation by the purified epidermal growth factor receptor kinase of A-431 cells". *J Biol Chem*, **258**, 4137-4142.

**Faderl, S.,** Kantarjian, H.M., Talpaz, M., O'Brien, S. 2000. "New treatment approaches for chronic myelogenous leukemia" *Sem Oncology*. **27**. 578-586.

**Falcieri, E.,** Martelli, A.M., Barggi, R., Cataldi, A., Cocco, L. 1993. " The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation" *Bioche Biophys Res Commun*. **193**. 19-25.

**Flockhart, A.,** Corbin J.D. 1982. " Regulatory mechanisms in the control of protein kinases". *Crc. Crit. Rev. Biochem*, **12**, 133-186.

**Fong, T.A.,** Shawver, L.K., Sun, L., Tang, C., App, H., Powell, T.J., Kim, Y.H., Schreck, R., Wang, X., Risau, W., Ullrich, A., Hirth, K.P., McMahon, G. 1999. "SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk1/KDR) than inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types". *Cancer Res*. **59**. 99-106.

**Fukazawa, H.,** Uehara, Y., Murakami, Y., Mizuno, S., Hamada, M. 1994. "Labeling of v-Src and BCR-ABL tyrosine kinases with [14C]herbimycin A and its use in the elucidation of the kinase activation mechanism". *FEBS Lett*. **340**, 155-158.

**Gali, H. U.,** Perchellet, E.M., Perchellet, J.M. 1991. "Inhibition of tumor promoter induced ornithine descarboxilase activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis *in vivo*" *Cancer Res.* **51**, 2820-2825.

**Glaichenhaus, N.,** Shastri, N., Littman, D.R., and Turner, J.M. 1991. "Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells". *Cell*, **64**, 511-520.

**Graziani, Y.,** Erikson, R.L., and Erikson, E. 1983. "Characterization of the Rous Sarcoma virus transforming gene product". *J. Biol. Chem.*, **258**, 6344-6351.

**Hansen, M.B.,** Nielsen, S.E., Berg, K. 1989. "Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill". *J Immunol Methods.* **119**. 203-210.

**Hausen, B.M.,** Beyer, W. 1992. "The sensitizing capacity of the antioxidants propyl, octyl, and dodecyl gallate, some related gallic acid esters" *Contact Dermatitis.* **26**. 253-258.

**Hockenbery, D.M.,** Oltval, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J. 1993. "Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis". *Cell.* **74**. 241-251.

**Hockenbery, D.M.,** Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.J. 1990. "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death". *Nature.* **348**. 334-336.

**Huang, M.T.,** Chang, R.L., Wood, A.W., Newmark, H.L., Sayer, J.M., Yagi, H., Jerina, D.M., Conney, A.H. 1985. "Inhibition of the mutagenicity of bay-region diole-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivates". *Carcinogenesis*. **6**, 237-242.

**Hubbard, S.R.,** Till, J.H. 2000. "Protein tyrosine kinase structure and function". *Annu Rev Biochem*. **69**. 373-398.

**Hunter, T.**1997. "Oncoproteins networks". *Cell*, **88**, 333-346.

**Ihle, J.N.,** Nosaka, T., Thierfelder, W., Quelle, F.W., Shimoda, K. 1997. "Jaks and Stats in cytokine signaling" *Stem Cell*. **15** (suppl. 1). 105-111. discussion, 112.

**Inoue, M.,** Suzuki, R., Koide, T., Sakapuchi, N., Ogihara, Y., Yabu, Y. 1994. "Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells". *Biochem Biophys Res Commun*. **204**, 898-904.

**Jhiang, S.M.** 2000. "The RET proto-oncogene in human cancers". *Oncogene*. **19**. 5590-5597.

**June, C.H.,** Fletcher, M.C., Ledbetter, J.A., and Samelson, L.E. 1990. "Increase in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation". *J Immunol*, **144**, 1591-1599.

**Kaiser, H.E.** 1967. "Cancer-promoting effects of phenols in tea". *Cancer*. **20**. 614-616.

**Kamps, M.P.,** Taylor, S.S., Sefton, B.M. 1984. "Direct evidence that oncogenic tyrosine kinases and cyclic AMP-dependent protein kinase have homologous ATP-binding sites". *Nature*, **310**, 589-592.

**Kelloff, G.J.,** Fay, J.R., Steele, V.E., Lubet, R.A., Boone, C.W., Crowell, J.A., Sigman, C.C. 1996. "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as potential cancer chemopreventives". *Can Epidem Biomark Prev*. **5**. 657-666.

**Khols, W.D.,** Fry, D.W., Kraker, A.J. 1997. "Inhibitors of tyrosin kinase". *Curr Opin Oncol*. **9**. 562-568.

**Kobari, M.,** Kullenger, B., Bjorkman, A., Matsuno, S., Ihse, I., Axelson, J. 1998. "The inhibitory effect of an EGF receptor-specific tyrosine kinase inhibitor on pancreatic cancer cell lines was more potent than inhibitory antibodies against the receptors for EGF and IGF I". *Int J Pancreatol*. **24**. 85-95.

**Kubo, I.,** Xiao, P., Fujita, K. 2001. "Antifungal activity of octyl gallate: structural criteria and mode of actino" *Bioorg Med Chem*. **12**. 347-350.

**Laemli, V.K.** 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*. **227**. 680-685.

Lázaro, I., González M., Roy G., Villar. L. M., González-Porqué, P. 1991. "Description of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of protein tyrosine kinase". *Anal Biochem.* **192**, 257-261.

Lázaro, I., Palacios C., González, M., González-Porqué, P. 1995. " Inhibition of human spleen protein tyrosine kinases by phenolic compounds". *Anal Biochem.* **225**, 180-183.

Letelier, M.E., Rodríguez, E., Wallace A., Lorca, M., Repetto, Y., Morello, A., Aldunate, J. 1990. " Tripanosoma Cruzi: a possible control of transfusión-induced Chagas's disease by phenolic antioxidants". *Exp Parasitol.* **71**. 357-363.

Levitzki, A., Gilon, C. 1991. "Tyrophostins as molecular tools and potential antiproliferative drugs". *Trends Pharmacol Sci*, **12**, 171-174.

Levitzki, A., Gazit, A. 1995. "Tyrosine kinase inhibition: An approach to drug development". *Science.* **267**. 1782-1788.

Liu, X. and Pawson, T. 1994. "Biochemistry of the Src protein-tyrosine kinase: regulation by SH2 and SH3 domains". *Recent Prog Horm Res.* **49**, 149-160.

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. 1996. "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c". *Cell.* **86**. 147-157.

**Lyndon, N.B.,** Mett, H., Mueller, M., Beckker, M., Cozens, R.M., Stover, D., Daniels, D., Taxler, P., Buchdunger, E. 1998. "A potent protein-tyrosine kinase inhibitor which selectively blocks proliferation of epidermal growth factor receptor-expressin tumor cells *in vitro* and *in vivo*". *Int J Cancer*. **76**. 154-163.

**Marzo, I.** Brenner, C., Zamzani, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdizca, R., Remy, R., Xie., Z., Reed, J.C., Kroemer, G. 1998. " The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins". *J Exp Med*. **187**. 1261-1271.

**Miketova, P.,** Scharam, K.H., Whitney, J., Li, M., Huang R., Kerns, e., Vacic, S:, Timmermann B.N., Rourick, R., Klorh, S. 2000. "Tandem mass spectromety studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extrac of green tea". *J Mass Spectrom*. **35**. 860-869.

**Novogrodsky, A.,** Weisspapir, M., Patya, M., Meshorer, A., Vanichkin, A. 1998. "Tyrphostin 4-nitrobenzylidene malononitrile reduces chemotherapy toxicity without impairing efficacy". *Cancer Res*. **58**. 2397-2403.

**Onoda, T.,** Iinuma, H., Sasaki, Y., Hamada, M., Isshiki, K., Naganawa, H., Takeuchi, T. 1989. "Isolation of a novel tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A, from *Streptomyces griseolavendus*". *J Nat Prod*. **52**. 1252-1257.

**Osherov, N.,** Levitzki, A. 1994. " Epidermal-growth-factor-dependent activation of the src-family kinases". *Eur J Biochem*. **225**. 1047-1053.

**Owen, R.W.**, Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. 2000. "The antioxidant/anticancer potencial of phenolic compounds isolated from olive oil". *Eur J Cancer*. **36**, 1235-1247.

**Palacios, C.**, Cespón, C., Martín de la Vega, C., Roy, G., Serrano, A., Salinas, M., González Porqué, P. " Lauryl gallate inhibits the activity of protein tyrosine kinase c-Src purified from human platelets". *J Enzyme Inhibition*. (en prensa)

**Pawson, T.**, Nash, P. 2000. "Protein-protein interactions define specificity in signal transduction". *Genes Dev*. **14**. 1027-1047.

**Penninger, J.M.**, Wallace, V.A., Kishihara, K., and mak, T.W. 1993. "The role of p56lck and p59fyn tyrosine kinases and CD45 protein tyrosine phosphatase in T-cell development and clonal selection". *Immunol Rev*, **135**, 183-214.

**Peterson, T.G.**, Coward, L., Kirk, M., Falany, C.N., Barnes, S. 1996. "The role of metabolism in mammary epithelial cell growth inhibition by the isoflavones genistein and biochanin A". *Carcinogenesis*. **17**. 1861-1869.

**Peyrade, F.**, Taillan, B., Lebrun, C., Baron, V., Dujardin, P. 1998. "Tyrosine kinase: implications in tumor pathology and therapeutic perspectives". *Rev Med Interne*. **19**. 336-372.

**Raccagni, A.A.**, Frattagli, M., Baldari, U., Righini, M.G. 1997. "Lauryl gallate hand dermatitis in cheese counter assistant". *Contact Dermatitis*. **37**. 182.

**Reed, J.C.** 1997. "Cytochrome c: can't live with it-can't live without it". *Cell*. **91**. 559-562.

**Reed, J.C.** 1999. "Dysregulation of apoptosis in cancer". *J Clin Oncol*. **17**. 2941-2953.

**Reinhold, J.G.** 1983. " Total protein albumin and globulin. Standard methods of clinical chemistry". *Ed. Selingron*. New York. Academic Press, **1**. 88.

**Resike, H.R., Zhao, J., Han, D.C., Cooper, L.A., Guan J.L.** 2001. " Analysis of FAK-associated signaling pathways in the regulation of cell cycle progression". *FEBS Lett*. **486**. 275-280.

**Robinson, D.R., Wu, Y.M., Lin, S.F.** 2000. "The protein tyrosine kinase family of the human genome". *Oncogene*. **19**. 5548-5557.

**Ross, R.** 1989. "Platelet-derived growth factor". *Lancet*, **1**, 1179-1182.

**Ross, R.** 1993. "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s". *Nature*, **362**, 801-809

**Ruegg, U.T., and Burgess, G.M.** 1989. "Staurosporine, K-252 and UNC-01: Potent but nonspecific inhibitors of protein kinases". *Trends Pharmacol Sci*, **10**, 218-220.

**Saeki, K., You, A., Isemura, M., Abe, I., Seki, T., Noguchi, H.** 2000. "Apoptosis-inducing activity of lipid derivatives of gallic acid" *Biol Pharma Bull.* **23.** 1391-1394.

**Sakaguchi, N., Inoue, M., Isuzugawa, K., Ogihara, Y., Hasaka, K.** 1999. "Cell death-inducing activity by gallic acid derivatives" *Biol Pharm Bull.* **22.** 471-475.

**Salunkhe, D.K., Jadhav, S.J., Kadam, S.S., Chavan, J.K.** 1982. "Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes". *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* **17.** 277-305.

**Samelson, L.E., Phillips, A.F., Luong, E.T., and Klausner, R.D.** "Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor". 1990. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 4358-4362.

**Sato, K., Miki, S., Tachibana, H., Hayashi, F., Akiyama, T., Fukami, Y.** 1990. "A synthetic peptide corresponding to residues 137 to 157 of p60v-src inhibits tyrosine-specific protein kinase". *Biochem Biophys Res Commun.* **171.** 1152-1159.

**Scalbert, A.** 1991. "Antimicrobial properties of tannins" *Phytochemistry.* **30.** 3875.

**Schlessinger, J., Ullrich, a.** 1992. "Growth factor signaling by receptor tyrosine kinase". *Neuron*, **9.** 383-391.

**Segal, A.,** Van Duuren, B.L., Mate, U., Solomon, J.J., Seidman, I., Smith, A., Melchionne, S. 1978. " Tumor- promoting activity of 2,3-dihydrophorbol myristate acetate and phorbol myristate acetate in mouse skin". *Cancer Res.* **38.** 921-925.

**Shi, Y.F.,** Szalay, M.G., Paskar, L., Sahai, B.M., Boyer, M., Singh, B., Green, D.R. 1990. "Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation". *J Immunol.* **144.** 3326-3333.

**Stavric, V. 1994.** "Quercetine in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen". *Clin Biochem.* **27.** 245-248.

**Stehelin, D.,** Varmus, H.E., Bishop, J.M., Vogt, P.K. 1976. "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA". *Nature.* **260.** 170-173.

**Suganuma, M.,** Okabe, S., Kai, Y., Suekoa, N., Suekoa, E., Fujiki, H. 1999. "Synergistic effect of (–)- epigallocatechin gallate with (–)-epicatechin sundilac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in the human lung cancer cell line PC-9". *Cancer Res.* **59.** 44-47.

**Susin, S.A.,** Lorenzo, H.K., Zamzani, N., Marzo, I., Snow, B.e., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Constantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. 1999. "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor". *Nature.* **397.** 441-446.

**Terrence R. Burke, Jr.** 1992. "Protein-tyrosine kinase inhibitors" *Drugs Future*. **17**. 119-131.

**Tsukada, S.**, Saffran, D.C., Rawlings, D.J., Parolini, O., allen, R.C., Klisak, I., Sparkes, R.S., Kubagawa, H., Mohandas, T., Quang, S., et al. 1993. " Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase in human X-linked agammaglobulinemia". *Cell*, **72**, 279-290.

**Uckun, F.M.**, Evans, W.W., Forsyth, C.J., Waddick, K.G., Ahlgren, L.T., Chelstrom, L.M., Buskhardt, A., Bolen, J., Myers, D.E. 1995. "Biotherapy of B-Cell precursor by targeting genistein to CD19-associated tyrosine kianses" *Science*. **267**, 886-891.

**Uckun, F.M.**, Ek, O., Liu, S.P., Chen, C.L. 1999. "In vivo toxicity an pharmacokinetic features of the Janus kinase 3 inhibitor WHI-P131 [4-(4' hidroxifenil)-amino-6,7-dimethoxyquinazolina]". *Clin Cancer Res*. **5**. 2954-2962.

**Ullrich, A.** y Schelessinger, J. 1990. "Signal transduction byh receptors with tyrosine kinase activity". *Cell*, **61**, 203-212.

**Van Der Hejden, P.J.**, Janssen, C.M., Strik, J.J.T.W.A. 1986. " Toxicology of gallates: a review and evaluation". *Fd Chem Toxic*. **24**. 1067-1070.

**Van Esch G.J.** 1955. "The toxicity of the antioxidants propyl, octyl and dodecyl gallate". *Voeding*. **16**. 683.

**Veillette, A.** Bolen, J.B. 1989. "Src-related protein tyrosine kinases. In: *Oncogenes*". Benz, C., Liu, E. (Eds). Kluwer Academic Publishers: Boston, 121-142.

**Vetrie, D.,** Vorechovsky, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F., Hammarstrom, L., Kinnon, C., Levinsky, R., Bobrow M, et al. 1993. "The gene involved in X-linked agammaglobulinemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases". *Nature*, **361**, 226-233

**Wange, R.L.** and Samelson, L.E. 1996. "Complex complexes: signaling at the TCR". *Immunity*, **5**, 197-205

**Weinstein, S.L.,** Gold, M.R., De Franco, A. L. 1991. "Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages". *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 4148-4152.

**White, M.F.** 1998. "The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action". *Mol Cell Biochem.* **182**. 3-11.

**Wolf, C.M.,** Eastman, A. 1999. "The temporal relationship between protein phosphatase, mitochondrial cytochrome c release, and caspase activation in apoptosis". *Exp Cell Res.* **247**. 505-513.

**Wong, T.W., Goldberg, A.R.** 1984. "Kinetics and mechanism of angiotensin phosphorylation by the transforming gene product of Rous sarcoma virus". *J Biol Chem.* **259.** 3127-3231.

**Yancopoulos, G.D., Klagsbrun, M., Folkman, J.** 1998. "Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border". *Cell.* **93.** 661-664.

**Yang, C.S., Landau, J.M., Huang, M.T., Newmark, H.L.** 2001. "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds". *Annu Rev Nutr.* **21,** 381-406.

**Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, I., Gómez Monterrey, I., Castedo, M., Kroemer, G.** 1996. "Mitochondrial control of nuclear apoptosis". *J Exp Med.* **181.** 1661-1677.

**Zhao, M., Kiyoi, H., Yamamoto, Y., Ito, M., Towatari, M., Omura, S., Kitamura, T., Ueda, R., Saito y Naoe, T.** 2000. " *In vivo* treatment of mutant FLT3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor". *Leukemia.* **14(3).** 374-378.

**Zivotovsky, B., Burgess, D.H., Vanags, D.M., Orrenius, S.** 1997. *Biochem Biophys Res Commun.* **230.** 481-488.