



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 953**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4525 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

A61K 31/135 (2006.01)

A61K 31/15 (2006.01)

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03734774 .7**

96 Fecha de presentación : **03.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1478360**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2004**

54 Título: **Agentes que interaccionan con un transportador de serotonina para el tratamiento del cáncer.**

30 Prioridad: **01.02.2002 GB 0202337**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.07.2009

73 Titular/es: **Celentyx Limited**
Birmingham Research Park, Vincent Drive
Birmingham B15 25Q, GB

72 Inventor/es: **Gordon, John y**
Barnes, Nicholas, Mark

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 323 953 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes que interaccionan con un transportador de serotonina para el tratamiento del cáncer.

5 El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo desarrollado. La enfermedad adopta muchas formas y afecta a casi todos los tipos de células. Los tratamientos del cáncer son muchos y variados, y con frecuencia resultan desagradables y pueden presentar efectos secundarios graves.

10 El linfoma de Burkitt (LB) es un cáncer endémico en las zonas de la malaria de África ecuatorial, noreste del Brasil y Papúa Nueva Guinea, pero cuya incidencia está aumentando drásticamente fuera de estas regiones endémicas debido a su asociación con la infección por VIH. Entre los norteamericanos existe un aumento de miles de veces en la incidencia del LB entre los individuos con SIDA, y esta tendencia es probable que continúe ya que estos pacientes viven más por la provisión de mejores regímenes de tratamiento para manejar su inmunodeficiencia.

15 El linfoma de Burkitt es una enfermedad maligna muy agresiva, pero no obstante se caracteriza porque presenta una predisposición a un alto grado de apoptosis que puede observarse por su histología clásica de “cielo estrellado”. Esto es debido al origen de la malignidad en células con centro germinal (CG) que no expresan la proteína Bcl-2 de pro-supervivencia y por consiguiente son propensas a la apoptosis espontánea, que se realiza en las células tumorales del LB.

20 El linfoma de Burkitt se trata actualmente mediante una combinación agresiva de quimioterapia, normalmente durante un periodo de 6 meses y que requiere frecuentes hospitalizaciones. Aunque existe una tasa de supervivencia sin recaída de 3 años de aproximadamente el 80% para pacientes con enfermedad local, los pacientes con tumor diseminado responden peor a la quimioterapia y presentan tasas de supervivencia pequeñas. Los recursos médicos limitados en las regiones donde el LB es endémico limitan también la supervivencia. En los individuos con SIDA, los linfomas no de Hodgkin tienden a ser agresivos y avanzados en el diagnóstico. La supervivencia media de pacientes positivos al VIH con linfomas no de Hodgkin es de 6 meses: el linfoma de Burkitt comprende aproximadamente el 20% de dichos linfomas y se diagnostica en un 2% de pacientes de SIDA. La quimioterapia intensiva no es evidentemente el curso más deseable de tratamiento para los individuos inmunodeprimidos.

30 La patente US nº 6.162.417 se refiere a compuestos que unen selectivamente el transportador de serotonina principalmente para diagnóstico por la imagen PET o SPECT en cuyo caso los compuestos contendrán por lo menos un isótopo radioactivo. Se hace referencia también a la utilización de los compuestos para el tratamiento con la excepción de que dichos tratamientos sean la depresión, la ansiedad, etc. que están normalmente asociados con la función SERT. Asimismo se hace referencia a isótopos radioactivos de los compuestos para el tratamiento de varios cánceres incluyendo el cáncer cerebral, el cáncer de mama y las leucemias.

35 La patente EP 0 727 206 da a conocer la utilización de sertralina para el tratamiento de una larga lista de cánceres. No se proporciona ninguna base para el modo de actuación ni se proporciona ningún dato de soporte.

40 Serafeim *et al.* (“Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Can Stop Burkitt’s Lymphoma Cells From Committing Suicide”. *Immunology*, Vol.101, suplemento 1, Diciembre 2000, página 65) dan a conocer que 5-HT provoca la muerte celular en las células de linfoma de Burkitt pero que este efecto está bloqueado por las SSRI.

45 Xia *et al.* (“The Antidepressants Imipramine, Clomipramine, and Citalopram Induce Apoptosis in Human Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells via Caspase-3 Activation.” *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 1999, Vol. 13, Núm. 6, páginas 338 hasta 347) dan a conocer los efectos antineoplásicos de los compuestos del título en células HL-60 humanas de leucemia mieloide aguda. Los mismos autores informan que la apoptosis se provoca en linfocitos normales a concentraciones mayores que son eficaces para las células HL-60 (Xia *et al.* *J. Biochemical Toxicology*, 1996, Vol.11, Núm. 4, páginas 203-204).

50 Tsuruo *et al.* (Potentiation of Vincristine and Adriamycin Effects in Human Hemopoietic Tumor Cells Lines by Calcium Antagonists and Calmodium Inhibitors, Cancer Research, American Association for Cancer Research, Baltimore, Vol.43, Núm.5, Mayo 1983, páginas 2267-2272) se refieren a la clomipramina como inhibidor de calmodulina para la potenciación de vincristina en determinadas estirpes de células tumorales. Se indica específicamente que, a las concentraciones utilizadas, los inhibidores de calmodulina no provocan citotoxicidad en las células tumorales.

55 La serotonina (5-HT) es un neurotransmisor del sistema nervioso central muy conocido que ha estado también implicado en diversos aspectos de la inmunorregulación. Fuera del sistema nervioso central (SNC) 5-HT es producido principalmente por las células de enterocromafina de los intestinos y es absorbido mediante un mecanismo de transporte activo en numerosos tipos de células.

60 Es sabido que la acción de 5-HT, tanto en las células neuronales como en otras, puede ser mediada por muchos subtipos de receptor diferentes al encontrarse en la superficie de las células diana o por un mecanismo de absorción activo que se basa en el SERT (Mossner, R. Lesch, K.P., *Brain Behav. Immun.* (1998) 12: 249-271. Schorr, E.C. Amason, G.W. *Brain Behav. Immun.* (1999) 13: 271-278. Barnes, N.M. Sharp, T. *Neuropharmacology*. (1999) 38: 1083-1152).

El SERT se expresa en las células fuera del SNC aunque el alcance de su distribución en la periferia no se ha demostrado completamente. Las plaquetas son claramente las células mejor estudiadas por las características del SERT periférica pero otras células hemopoyéticas, particularmente las del sistema inmunitario también llevan el SERT. Éstas incluyen los linfocitos B, los linfocitos T y los macrófagos. La base para que estas células transporten el SERT funcional no es conocida.

Se ha sugerido que la actividad de absorción de 5-HT del SERT en el SNC, si bien es un procedimiento normal y necesario, puede estar implicada en la muerte de las células neuronales, particularmente en el contexto de las afecciones patológicas referentes a la neurodegeneración, aunque los mecanismos por los cuales ocurre esto no se entienden totalmente.

Los inventores han demostrado actualmente, que otros tipos de células tales como las células de LB están sometidas a apoptosis mediada por 5-HT a través del SERT.

Según la invención, un compuesto seleccionado de entre fluoxetina, paroxetina, citalopram, fluvoxamina y un inhibidor de reabsorción de serotonina no selectivo, es para su utilización en el tratamiento de la neoplasia de linfocitos B. El compuesto puede utilizarse en la preparación de un medicamento para tratar la neoplasia de linfocitos B.

En una forma de realización preferida, el objeto de los tratamientos es también experimentar el tratamiento por administración simultánea o sucesiva de un agente para aumentar la sensibilidad de los linfocitos B a la apoptosis, en la que dicho agente es el paclitaxel irinotecán, fludarabina, ciclofosfamida, docetaxel, gemtuzumab ozogamicina, arabinósido de citosina, dexametasona o un agente complementario dirigido a Bcl-2.

Debe sobreentenderse que aunque el mecanismo de acción propuesto es a través del SERT, la invención no debería considerarse limitada al mismo, y es posible que la acción de los agentes pueda ser independiente del SERT.

En individuos normales la cantidad de 5-HT circulante libre está regulada, por lo menos en parte, por el SERT. En los individuos deprimidos, la cantidad de 5-HT circulante libre es demasiado baja. Los fármacos que bloquean la absorción de 5-HT a través del SERT selectivamente (conocidos como inhibidores de reabsorción de serotonina selectivos (SSRI)) o ayudan de manera no selectiva a mantener un nivel adecuado de 5-HT circulante libre y son muy utilizados en el tratamiento de la depresión clínica. Como es de esperar, la administración de dichos fármacos a las dosis utilizadas para prevenir la absorción de 5-HT en las células neoplásicas que de este modo experimentarían apoptosis en presencia de 5-HT, impide o reduce dicha apoptosis.

Aún más sorprendentemente, los inventores han descubierto que a concentraciones más altas, es decir, a concentraciones superiores a las realizadas para el alivio de los síntomas de la depresión, los inhibidores de reabsorción de 5-HT pueden realmente conducir a la apoptosis en las células que expresan al SERT.

La presente invención es particularmente aplicable a células neoplásicas con una sensibilidad relativamente alta a la apoptosis. Dicha sensibilidad puede ser debida a la expresión relativamente baja de genes de la supervivencia celular, tal como Bcl-2. Las células de este tipo incluyen las células de linfoma de Burkitt.

Alternativamente, dicha célula puede ser inducida para que tenga una sensibilidad relativamente alta a la apoptosis, por consiguiente el segundo aspecto de la invención.

Aumentado la sensibilidad de la célula neoplásica a la apoptosis puede conseguirse interfiriendo con la replicación de por lo menos un gen de supervivencia celular, interfiriendo con la expresión (por ejemplo, durante la transcripción o traducción) de por lo menos un gen de supervivencia celular y/o anulando o reduciendo la función de supervivencia de por lo menos un gen expresado de supervivencia celular.

Es sabido que bloqueando la producción del producto del gen Bcl-2 puede conducir, por lo menos *in vitro* a un aumento de la eficacia de numerosas terapias anticancerosas tales como la quimioterapia, la radiación y la inmunoterapia. Los fármacos en los que se ha demostrado la eliminación de la producción de Bcl-2 que tienen efecto beneficioso incluyen: Paclitaxel (Taxol®), Irinotecán (Camptosar®), Fludarabina (Fludara®), Ciclofosfamida (Cytosan®), Docetaxel (Taxotere®), Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®), arabinósido de citosina y dexametasona. Preferentemente, dicho agente para aumentar la sensibilidad de dicha célula neoplásica a la apoptosis es un fármaco complementario dirigido a Bcl-2 cuyo ejemplo es Genasense (marca registrada, Genta Inc.)

La administración (de dicho agente farmacéuticamente activo y/o de dicho agente para aumentar la sensibilidad de dichas células neoplásicas a la apoptosis cuando está presente) puede ser generalizada o local por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por vía oral, subcutánea, intravenosa o por administración directa (inyección u otra forma) en la zona neoplásica. En general, dicho tratamiento comprenderá preferentemente múltiples administraciones de este modo para mantener una concentración eficaz del fármaco de las células neoplásicas.

Dicho agente (o agentes) puede administrarse en forma líquida, en forma de comprimido o cápsula, en forma de suspensión o en solución. En cada caso, dicho(s) agente(s) puede mezclarse con excipientes, aglutinantes, modificadores de sabor y ajustadores de pH convencionales según proceda.

ES 2 323 953 T3

5 Debe sobreentenderse que dicho agente para aumentar la sensibilidad a la apoptosis de dicha célula neoplásica puede administrarse simultáneamente con dicho agente activo (ya sea combinado en un solo medicamento o por administración conjunta de medicamentos por separado) o antes de la administración de dicho agente activo. Cuando se administran medicamentos por separado (simultáneamente o por separado) las vías de administración pueden ser diferentes.

10 Para el tratamiento de la ansiedad o la depresión, se administran generalmente las SSRI por vía oral a una dosis de 20 a 100 mg/día, a cuyas dosis se obtiene una concentración en la sangre en estado estacionario de SSRI de aproximadamente $1\text{ }\mu\text{M}$ después de un periodo inicial. Preferentemente, cuando dicho agente es un SSRI, y particularmente cuando dicha administración es generalizada, se administrará a una concentración para obtener una concentración en la sangre en estado estacionario superior a aproximadamente $1\text{ }\mu\text{M}$, más preferentemente superior a aproximadamente $5\text{ }\mu\text{M}$ y aún más preferentemente superior a aproximadamente $10\text{ }\mu\text{M}$. Debe sobreentenderse que el experto podrá fácilmente calcular la dosificación requerida para conseguir dichas concentraciones en estado estacionario. Cuando dicha administración no es generalizada, se administrará preferentemente suficiente agente para conseguir una concentración en el tejido neoplásico de $5\text{ }\mu\text{M}$ o más, más preferentemente de aproximadamente $10\text{ }\mu\text{M}$ o más, y aun más preferentemente de $25\text{ }\mu\text{M}$ o más.

Es de esperar que niveles de dosificación similares resulten asimismo efectivos para la d-fenfluramina.

20 Las formas de realización de la invención se describirán a continuación, a título de ejemplo, haciendo referencia a los diagramas adjuntos en los que:

25 la figura 1 presenta el efecto de la concentración de 5-HT en la síntesis de ADN en las células L3055 LB,

la figura 2 presenta la correlación entre la densidad en la preparación en placa y la sensibilidad de 5-HT para las células L3055,

30 la figura 3 presenta el efecto de la síntesis del ADN en varias estirpes celulares de la adición de 5-HT $125\text{ }\mu\text{M}$,

la figura 4 presenta el efecto del tratamiento con 5-HT sobre el estado de ciclo celular en las células L3055,

la figura 5 presenta el efecto del aumento de la dosis de 5-HT sobre el porcentaje de células muertas en una población de células L3055,

35 la figura 6 presenta la variación en función de la dosis en el número de células L3055 viables en una población en respuesta al aumento de las concentraciones de 5-HT,

40 la figura 7 presenta la representación gráfica del análisis por FACS de las células L3055 tratadas con 5-HT que presenta aumento de la actividad de caspasa,

la figura 8 presenta la incapacidad de varios antagonistas de 5-HT para impedir que 5-HT inhiba la síntesis de ADN en células L3055,

45 la figura 9 presenta el efecto de bajas dosis de SSRI en la prevención de 5-HT que produce la inhibición de la síntesis de ADN en las células L3055,

la figura 10 presenta la incapacidad de pargilina para impedir la inhibición de la síntesis de ADN por 5-HT,

50 la figura 11 presenta el mismo experimento que la figura 10 sustituyendo la pargilina por clorgilina o deprenilo,

la figura 12 presenta el nivel de ADN dañado oxidativamente en células L3055 durante el tratamiento con 5-HT o con H_2O_2 ,

55 la figura 13 presenta el análisis por inmunotransferencia Western para varias estirpes celulares de LB,

la figura 14 demuestra que las células L3055 llevan un SERT con propiedades similares a las descritas anteriormente para el SERT neuronal completo,

60 las figuras 15 a 17 presentan el efecto inhibitor dependiente de la dosis de fluoxetina, paroxetina y citalopram, respectivamente en la síntesis de ADN en células L3055,

la figura 18 presenta el efecto en células de sangre normales de las dosis de fluoxetina que producen la destrucción de la célula tumoral,

65 la figura 19 presenta el efecto inhibitor en función de la dosis de imipramina sobre la síntesis de ADN en células L3055,

la figura 20 presenta el efecto sobre el índice de supervivencia de las células de linfoma a concentraciones crecientes de fluoxetina,

la figura 21 presenta el efecto del tratamiento con fluoxetina sobre el estado de ciclo celular en células de linfoma,

la figura 22 presenta la activación de la cascada apoptótica en respuesta al tratamiento con varias SSRI,

la figura 23 presenta un aumento en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular libre en respuesta al tratamiento de las células L3055 con fluoxetina,

la figura 24 presenta el efecto de las SSRI sobre la destrucción celular en una estirpe de células de LB con el gen Bcl-2 prosupervivencia,

la figura 25 presenta la activación de la cascada apoptótica en respuesta al tratamiento con imipramina, y

la figura 26 presenta el efecto de imipramina sobre la destrucción de las células en una estirpe de células de LB transfectada con el gen BCL-2 prosupervivencia de la figura 24.

Ejemplo 1

Serotonina (5-HT)

1. Actuación de 5-HT en el funcionamiento de la apoptosis en las células de linfoma de Burkitt

Se ha informado de que las monoaminas, incluyendo la 5-HT, provocan apoptosis en las células neuronales cultivadas, con neuronas del gránulo cerebeloso que son particularmente sensibles, es más, la muerte celular neuronal provocada por la serotonina ha sido implicada como posible causa de trastornos neurodegenerativos y neuropsiquiátricos.

Los inventores han demostrado que la 5-HT es un activador rápido de la muerte celular programada (apoptosis) en las estirpes de LB que permanecen fieles al fenotipo de biopsia original. Esta actuación de 5-HT esta mediada por un mecanismo activo de absorción de serotonina. El transportador de serotonina representa por lo tanto una nueva diana terapéutica en el linfoma de Burkitt.

1.1. Materiales y procedimientos

1.1.1. Estirpes celulares

Las estirpes celulares L3055 (EBV^{neg}), BL2(EBV^{neg}), Elijah (EBV^{pos}) y MUTU I (EBV^{pos}) de linfoma de Burkitt grupo I se mantuvieron en atenuación precoz como se describió anteriormente (Baker MP, Eliopoulos E, Young SL, Armitage RJ, Gregory CD, Gordon J. *Blood* (1998); 92:2830-2843). La estirpe MUTU III (EBV^{pos}) de LB del grupo III de atenuación tardía se utilizó también con todas las células cultivadas en medio RPMI 1640 enriquecido con Serum Supreme al 10% (BioWhittaker, Wokingham, RU.), glutamina 2 mM, 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Los transfectados estables *bcl-2* y *bcl-x_L* de las células L3055, junto con los que llevan el vector de expresión de mamífero pEF-MC1 neopA sólo como referencias, se generaron y se caracterizaron con detalle en otro lugar (Gordon J, *et al. Cell Death. Diff.* (2000); 7:785-794) Una estirpe estable de células HEK 293 que lleva SERT humano completo se ha descrito anteriormente (Qian Y., Galli A., Ramamoorthy S, Risso S., DeFelice LJ., Blakely RD. *J. Neurosci.* (1997); 17:45-57).

1.1.2. Reactivos

5-HT, fluoxetina (Prozac®), pargilina, clorgilina y deprenilo se adquirieron en Sigma (Dorset, RU.). Los antagonistas SDZ205-557 del receptor 5-HT y metisergida se adquirieron en Sandoz (Basilea, Suiza) y se obtuvo granisetron de Smith-Kline Beecham (Harlow, Essex, RU.), 5-HT binoxalato [1,2-³H(N),] se adquirió en NEN (Zaventem, Bélgica), paroxetina (Paxil®) y citalopram (Celexa®) se adquirieron en Smith-Kline Beecham y Lundbeck (Copenhague, Dinamarca), respectivamente. El Ab SERT anti-humano monoclonal de ratón se adquirió en Mab technologies (Stone Mountain, US.) el fragmento de anticuerpo F(ab')₂ de cabra purificado por afinidad contra IgM humana se adquirió en ICN (Ohio, US.). El colorante catiónico JC-1 (yoduro de 5,5',6,6'-tetraclorol, 1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianina) se adquirió en Molecular Probes (Leiden, Holanda). El reactivo de superseñal de quimioluminiscencia y el anticuerpo anti-ratón de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se adquirieron en Pierce (Chester, RU). La síntesis del cebador y el secuenciado del ADN fueron realizados por MWG Biotech (Milton Keynes, RU). La transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV) y DNasa I (calidad ampliación) se adquirieron en Gibco (Paisley, RU.). Los DNTP y Taq polimerasa se adquirieron en Promega (Southampton, RU.). ARNgard y oligogalacturonano d(T)₁₂₋₁₈ se adquirieron en APBiotech (Bucks., RU.). El reactivo ARNzol se adquirió en Biogenesis (Poole, RU). Syto 16 se obtuvo de Molecular Probes Europe (Leidec, Países Bajos). La totalidad de los otros productos químicos se obtuvo de Sigma (Poole, RU) y eran de la mejor calidad disponible.

1.1.3. Evaluación de la síntesis del ADN

La síntesis del ADN se determinó midiendo la incorporación de ^3H -timidina ($[^3\text{H}]\text{Tdr}$, Amersham, RU.) en el ADN celular. Se cultivaron las células en 200 μl de medio enriquecido a las densidades y durante los periodos indicados a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos, de fondo plano (Becton Dickinson, Oxford, RU.) a continuación se pulsaron durante las 4 h finales con 50 μl de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]\text{Tdr}$ antes de la recogida en un recogedor de células Skatron (Helis Bio Ltd., Newmarket, RU.)

1.1.4. Ensayos de viabilidad

Los cambios de viabilidad de las células cultivadas en las condiciones indicadas a continuación se cuantificaron por evaluación de la dispersión de la luz delantera y a 90° (lateral) de las células según se describió anteriormente (Dive C., *et al. Biochimica Biophysica Acta* (1992); 1133:275-285) usando un citómetro de flujo EPICS XL-MCL (Beckman Coulter, Miami, FL, US.). Antes del análisis, se recogieron las células en tubos de polietileno FACS y se fijaron a 4°C en 400 μl de tampón FACS [PBS con NGS al 5% y formaldehído al 2%] (BDH/MERCK). Las células se clasificaron en dos poblaciones (viables y muertas) según su dispersión de la luz hacia adelante y lateral. La viabilidad se expresó en porcentaje del número total de células que residen en las clasificaciones viable y no viable. Se analizaron también las células según Schuurhuis *et al.* (Schuurhuis GJ., *et al. Exp. Haematol.* (1997); 25: 754-759) con objeto de evaluar los porcentajes con las poblaciones tratadas de las que eran viables, apoptóticas o necróticas. Syto, 16 se añadió a una concentración de 250 nM en PBS a 500.000 células y se incubaron a T.A. durante 30 min, en cuyo momento se añadieron 5 $\mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio (PI). Se analizaron a continuación las muestras inmediatamente por FACS y se generó una representación 2D de fluorescencia syto 16 frente a la fluorescencia de PI: syto 16 es absorbido solamente por las células viables mientras que PI se introduce exclusivamente en las células necróticas - las células syto 16^{-ve}/PI^{-ve} se consideran apoptóticas.

1.1.5. Análisis del ciclo celular

Se recogieron las células cultivadas en las condiciones indicadas a continuación en 100 μl de 1xPBS seguido de 400 μl de tampón de ciclo celular que contiene Triton X-100 y yoduro de propidio y se dejaron incubar a 4°C durante 1 h para permitir la tinción del ADN. El grado de fluorescencia emitida por el PI unido es directamente proporcional a la cantidad de ADN en cada célula y se midió por citometría de flujo como se describió anteriormente (MacDonald I., *et al Blood* (1996); 87:1147-1154). Los resultados se expresan en porcentaje de células viables que residen en cada fase del ciclo.

1.1.6. Mediciones de apoptosis

Se evaluó la apoptosis tiñendo las células con naranja de acridina y observando la morfología nuclear exactamente como se describió anteriormente (Gordon J., *et al Cell Death. Diff.* (2000); 7:785-794). Las células viables presentan un modelo de tinción con cromatina, mientras que las células apoptóticas presentan de manera característica cromatina condensada y fragmentada. Se evaluó la despolarización mitocondrial utilizando el colorante catiónico JC-1. Se incubaron las células con 10 μM de JC-1 durante 30 minutos antes de observarlas en un microscopio confocal LSM 510 (Zeiss, Alemania). JC-1 presenta acumulación dependiente del potencial en los mitocondrias acompañada por un desplazamiento en la emisión de fluorescencia desde 525 nm (verde) hasta 590 nm (roja). La despolarización mitocondrial está indicada por una disminución en la relación de fluorescencia roja/verde.

1.1.7. Detección de la actividad de caspasa

La actividad de caspasa se detectó utilizando el kit CaspaTag Caspase Activity (Intergen, Oxford, RU.). Las células cultivadas en las condiciones indicadas a continuación se recogieron en 300 μl de medio de cultivo a una densidad celular de 10^6 células/ml, seguido de la adición de 5 μl de una solución de 30 x solución de trabajo de FAM-VAD-FMK (inhibidor de caspasa activado por carboxi fluorescente) (Intergen Co., US.). Se incubaron a continuación las células durante 1 h a 37°C en CO_2 al 5% protegiendo simultáneamente los tubos de la luz. Al final de la incubación, se lavaron dos veces en 2 ml de 1 x tampón de lavado seguido de adición de 2 μl de PI para distinguir las células muertas de las vivas, a continuación se analizaron en un citómetro de flujo EPICS XL-MCL o por microscopia confocal. Para ésta última, se recogieron las células tratadas en 300 μl de medio de cultivo que contiene 10 μl de FAM-VAD-FMK antes de incubación durante 1 h en las condiciones descritas anteriormente. A continuación se añadieron 1,5 μl de la cepa 33342 de Hoechst durante 5 min., y se lavaron las células dos veces en 2 ml de 1 x tampón de lavado después de la adición de 1 μl de PI.

1.1.8. Detección del daño oxidativo al ADN

Se cuantificó el daño oxidativo al ADN utilizando el ensayo OxyDNA (Biotrin, Dublín, Irlanda). Después del cultivo de las células en las condiciones indicadas a continuación, se lavaron en primer lugar en 1 x PBS y a continuación en solución de lavado seguido de adición de 100 μl de solución de bloqueo con 1 h de incubación a 37°C . En el lavado dos veces en solución de trabajo, las células se incubaron a continuación con 100 μl de conjugado de FIT durante 1 h en la oscuridad a T.A. antes de lavar dos veces en solución de lavado y una vez en PBS. Por ultimo, se volvieron a poner en suspensión las células en tampón FACS y se analizaron en un citómetro de flujo EPICS-XL-MCL.

1.1.9. Inmunotransferencia Western

Los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en 100 μ l de tampón de lisis (Tris 25 mM, pH 7,6; NaCl 150 mM; 1 μ g/ml de aprotinina; 10 μ g/ml de leupeptina; PMSF 1 mM; ortovanadato sódico 1 mM; EDTA 1 mM y Triton X-100 al 1%). Se incubaron las muestras durante 1 h a 4°C, se sedimentaron a alta velocidad durante 10 minutos a 4°C y se sometieron 100 μ g de proteína por muestra a SDS/PAGE al 10%. Las células HEK transfectadas con SERT se utilizaron como referencia positiva. Después de la ejecución, los geles se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 25 mM, pH 8,3; glicina 150 mM; metanol al 20% (v/v) y las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. Las inmunotransferencias se bloquearon en tampón (Tris 10 mM, pH 7,5; NaCl 10 mM; Tween 20 al 0,1%) que contiene leche al 5% (p/v) y se sondaron durante la noche a 4°C con una dilución 1/5000 de anticuerpo anti-SERT monoclonal de ratón. Las inmunotransferencias se desarrollaron con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP y se observaron utilizando un procedimiento de quimioluminiscencia mejorado.

1.1.10. Ensayo de absorción de 5-HT

Se llevaron a cabo ensayos de transporte incubando 2×10^7 células con 100 nM de 5-HT más 400 nM de 3 H-5-HT durante 0 a 60 minutos a 37°C en HBSS que contiene BSA al 1% y HEPES 10 mM (pH 7,2). El análisis se interrumpió por dilución al quintuple en PBS enfriado en hielo. Los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en fluido de centelleo, y se determinaron los recuentos totales por sedimento. Se ensayó la absorción no específica en paralelo a 4°C en las mismas condiciones. Los datos para la absorción no específica se sustrajeron de los valores de absorción total para dar la absorción específica.

1.2. Resultados

1.2.1. 5-HT inhibe la síntesis de ADN en las estirpes de LB del grupo I

La estirpe L3055 negativa a EBV mantenida en atenuación precoz se ha caracterizado extensamente y se ha utilizado ampliamente como modelo *in vitro* para el comportamiento de las células de LB biopsioides. En los experimentos iniciales, las células L3055 se trataron con concentraciones de 5-HT comprendidas entre 1 y 150 μ M y su capacidad proliferativa se evaluó por incorporación de [3 H]-timidina a las 24, 48 y 72 horas. Los efectos máximos se observaron después de 24 h y estos datos se presentan en la figura 1. Puede observarse que 5-HT produjo una reducción en la síntesis de ADN en función de la concentración como se demostró disminuyendo la incorporación [3 H]-timidina con concentraciones crecientes de 5-HT.

Se apreció que la sensibilidad a 5-HT se correlaciona con el número de células en la placa: por lo tanto, mientras que 5-HT > 50 μ M se requería para conseguir una inhibición del 50% de síntesis de ADN cuando se cultivaban las células a la densidad en la placa relativamente alta de 10^5 por ml (2×10^4 /pocillo), cuando se colocan en placas a razón de $2,5 \times 10^4$ por ml (5×10^3 por pocillo), se consiguió el 50% de inhibición con alrededor de 5-HT 5 μ M. Asimismo, la figura 2 demuestra que una concentración de 5-HT fija de 50 μ M (indicada por la flecha A), una inhibición aproximada del 35%, 70% y > 90% de la síntesis de ADN se consiguió para las células colocadas en placas a razón de 2×10^4 , 10^4 y 5×10^3 por pocillo, respectivamente. Como cabría esperar, concentraciones menores produjeron menor inhibición (flecha C, 5 μ M) y concentraciones mayores produjeron mayor inhibición (flecha B, 150 μ M). Particularmente en la atenuación muy precoz, incluso 5-HT 1 μ M pudo efectuar una reducción significativa en el nivel de síntesis de ADN que si no se produce en las células L3055 a cifras menores (datos no mostrados). Esto sugiere que dosis relativamente bajas podrían ser mas eficaces si la carga tumoral puede reducirse, por ejemplo, en combinación con terapias alternativas.

Otras 3 estirpes de células de LB del grupo I se investigaron también, a saber: Mutu I, Elijah y BL2. La figura 3 demuestra que cuando éstas se trataban con una alta concentración (125 μ M) de 5-HT durante 24 h de cultivo, se notaba de nuevo una sustancial disminución en la síntesis de ADN medida por la incorporación de [3 H]-timidina. En cambio, Mutu III, estirpe de células de LB (grupo III) resistente a la apoptosis presentaba sólo marginalmente una disminución de la síntesis de ADN en respuesta a 5-HT. La estirpe de linfocitos T de leucemia no relacionada, Jurkat, se observó que era insensible a las acciones de 5-HT (no representado).

Está muy documentado que la suspensión de la síntesis de ADN puede conseguirse en células LB del grupo I por el compromiso de BCR (receptores de linfocitos B) que está acompañado por la detención del crecimiento en el compartimento G_0/G_1 del ciclo celular y la posterior entrada en la muerte programada. Los inventores han demostrado 5-HT estimuló igualmente la detención en una fase distinta del ciclo celular. La figura 4 compara el estado del ciclo celular de las células L3055 después de 24 h de tratamiento con 5-HT o anticuerpo con cadena anti- μ - un anticuerpo para BCR (para ligar la BCR) (columnas A - referencia, columnas B - 5-HT 150 μ M, columnas C - 10 μ g/ml de anticuerpo con cadena anti- μ): cada una se utilizó a su máxima concentración para inhibir la síntesis de ADN y provocar la muerte celular. Aunque la ligadura de BCR ejercía una influencia algo mayor sobre el perfil de ciclo celular, ambos tratamientos dieron como resultado una acumulación de detención de las células en el compartimento G_0/G_1 con una desaparición correspondiente de ambas fases S y G_2/M del ciclo en comparación con los cultivos de referencia.

1.2.2. *La inhibición estimulada por 5-HT de la síntesis de ADN en las estirpes de LB del grupo I está acompañada por la muerte celular*

Con el fin de determinar si la suspensión de la síntesis de ADN estimulada por 5-HT estaba acompañada de la muerte celular, se trataron de nuevo las células L3055 con 1 a 1150 μM de 5-HT, cultivado durante 24 h pero a continuación al final de las incubaciones analizadas para el perfil de dispersión delantera frente a lateral por FACS. Las células se clasificaron en dos poblaciones basadas en diferentes propiedades de dispersión de la luz: células vivas grandes y células muertas reducidas. Como se aprecia en la figura 5, el tratamiento con 5-HT produjo un aumento drástico dependiente de la concentración en el número de células L3055 que adquieren características de dispersión de la luz de las células muertas (indicadas por la flecha A) sobre las células vivas (indicadas por la flecha B), representando los porcentajes en la figura el porcentaje de células vivas. La presencia en el fondo de 20 a 25% de células muertas es típica de las estirpes de LB de atenuación precoz que mantienen rasgos de biopsia (véase panel de control). En un conjunto análogo de experimentos (en células de atenuación algo precoces), las células tratadas con 5-HT fueron teñidas dos veces con syto 16 y yoduro de propidio (PI): syto 16 se absorbe solamente en células viables mientras que PI solamente se introduce en células cuyas membranas se han vuelto impermeables. En la figura 6 puede apreciarse que el número de células viables (indicadas por la flecha A) (syto 16⁺/PI⁻) disminuyó en función de la concentración en respuesta a la serotonina con una tendencia similar a la evaluada en los cambios en las propiedades descritas anteriormente. Al final de una exposición de 24 h a 5-HT aproximadamente números iguales de células han asumido características de la necrosis (indicadas por la flecha B) (syto 16⁻/PI⁺) frente a la apoptosis (indicada por la flecha C) (syto 16⁻/PI⁻).

1.2.3. *Características de la apoptosis favorecida por 5-HT en estirpes de LB del grupo I*

La tinción de las células L3055 tratadas con 5-HT con la sonda JC-1 que forma el cristal líquido carbocianina puso de relieve una pérdida de potencial de la membrana mitocondrial que acompaña a la apoptosis provocada por 5-HT en las células LB del grupo I. Por lo tanto, después de la exposición a 5-HT existe una desaparición completa de la emisión roja intensa de los agregados de JC-1 que en forma de células de referencia dentro de mitocondria manteniendo su integridad potencial de la membrana. En lugar de esto, las células tratadas con 5-HT desarrollan una emisión verde difusa que procede de la distribución diseminada de monómeros JC-1 relativamente desconcentrados (no mostrados).

Otra huella de la muerte celular programada es la activación de la caspasa, aunque para algunos subconjuntos de linfocitos B, se han descrito las vías independientes de la caspasa a la apoptosis. Para evaluar si la cascada de caspasa era activada por 5-HT en las células L3055 se utilizó la sonda carboxifluorescente FAM-VAD-FMK. Esta sonda se une de manera irreversible a las caspasas en su configuración activa. La activación aumentada de las caspasas sobre los niveles de fondo en células LB del grupo I L3055 se demuestra en 6 h de tratamiento con 5-HT. La figura 7 ilustra este aumento por análisis basados en FACS. El panel A demuestra el porcentaje relativo de células positivas al tinte (pico II) y negativo (pico I) para la actividad de la caspasa antes del tratamiento con 5-HT. El panel B presenta los mismos datos después de 6 h con 5-HT. La figura presenta un aumento en el porcentaje de células que presentan actividad de caspasa desde un nivel de fondo de 29% hasta 59% después de 6 h de tratamiento con 5-HT.

1.2.4. *Los inhibidores de reabsorción de serotonina selectivos inhiben las acciones de 5-HT en células LB del grupo I a niveles relativamente bajos*

Las acciones de 5-HT, tanto en las células neuronales como en los linfocitos, pueden ser mediadas por muchos subtipos diferentes de receptor que se encuentran en la superficie de las células diana o por un mecanismo de absorción activo que se basa en el transportador de serotonina (SERT). Para explorar cuál de estas series de reacciones era responsable con respecto a los efectos de 5-HT en estirpes de LB del grupo I, se pretrataron las células L3055 con una gama de antagonistas del receptor 5-HT e inhibidores de reabsorción de serotonina selectivos (SSRI). Se probaron tres antagonistas del receptor: SDZ205-557, antagonista receptor de 5-HT₄, granisetron, antagonista receptor de 5-HT₃ muy selectivo; metisergida que antagoniza los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT₆ y 5-HT₇. La figura 8 demuestra que los tres antagonistas del receptor (columna A - referencia (sin antagonista del receptor), columna B - SDZ, columna C - metisergida, columna D - granisetron, columna E - combinados) a concentraciones considerablemente superiores a sus afinidades para los subtipos de receptor 5-HT respectivos, y aún cuando están combinados, no pudieron influir en la capacidad de 5-HT para inhibir la síntesis de ADN en las células L3055 (comparar las columnas de referencia (sin 5-HT) con las columnas 5-HT. Por contraste, la figura 9 demuestra que tres SSRI estructuralmente distintos, fluoxetina (columnas A), citalopram (columnas B) y paroxetina (columnas C) cada uno sustancialmente invirtió, en función de la concentración, la suspensión dependiente de 5-HT de la síntesis de ADN que fue provocada de otro modo (columna I). El orden en la fila y las potencias relativas para cada uno de los SSRI que inhiben la suspensión favorecida por 5-HT de la síntesis de ADN en las células L3055 estaban bien correlacionados con sus valores de IC₅₀ para bloquear la absorción de 5-HT por el SERT neuronal: fluoxetina = 6,8 nM, citalopram = 1,8 nM, paroxetina = 0,29 nM.

Las acciones de los SSRI sobre la inhibición de la síntesis del ADN dependiente de 5-HT se reflejaron en su capacidad para invertir tanto la muerte celular dependiente de 5-HT como la actuación de la caspasa en las células L3055. Como se observa en la Tabla 1, las concentraciones óptimas de cada una de las 3 SSRI fueron capaces de

bloquear sustancialmente la pérdida de viabilidad que aparece en una exposición de 24 h a 5-HT interpretada por los cambios en las propiedades de difusión delantera frente a lateral de las células. Asimismo, la activación de la caspasa provocada por 5-HT a las 6 h fue casi completamente eliminada por el pretratamiento de las células con cada una de los SSRI estudiados.

TABLA 1

Inversión de las acciones de 5-HT por SSRI

Tratamientos ^a	% de células viables ^b (24 h)	% de activación de caspasa ^c (6 h)
Referencia	69,3 ± 1,20	27,3 ± 1,20
5-HT	21,3 ± 8,65	58,3 ± 2,03
Fluoxetina + 5-HT	54,7 ± 0,88	30,3 ± 2,91
Paroxetina + 5-HT	58,0 ± 3,06	29,3 ± 4,98
Citalopram + 5-HT	55,3 ± 4,98	29,3 ± 1,33

^aSe cultivaron células L3055 con o sin 5-HT (150 µM) como se indicó y SSRI: fluoxetina (5 µM), paroxetina (2 µM); citalopram (10 µM).

^bAl final de un periodo de 24 h con los tratamientos mostrados, las células fueron analizadas por FACS para las propiedades de difusión de la luz delantera frente a lateral tal como en la figura 5. El % de células viables restantes se expresan como medias ± S.E.M. de 3 experimentos.

^cDespués de 6 h de tratamiento, se tiñeron las células L3055 con FAM-VAD-FMK y se analizaron las caspasas activas como en la figura 7. Los resultados se expresan en % de células activas a caspasa positiva y se representan como medias ± S.E.M. de 3 experimentos.

1.2.5. Pruebas de que la apoptosis provocada por 5-HT no es debida a estrés oxidativo

Cuando 5-HT es transportado dentro de las células puede ser almacenado en vesículas hasta liberarse, o ser convertido en ácido 5-hidroxi-indoleacético (5-HIAA) por la enzima monoamina oxidasa (MAO) mitocondrial. Esta enzima existe en dos formas, MAO-A y MAO-B. Como los catabolitos de 5-HT son muy oxidativos, los inventores han evaluado, si, como se describe para algunas células neuronales, 5-HT está señalizando las células LB del grupo I para experimentar apoptosis provocando estrés oxidativo. En primer lugar, se investigó el efecto de pretratar las células con varias concentraciones (figura 10: columna A - 0, columna B - 10 µM, columna C - 25 µM, columna D - 50 µM, columna E - 100 µM) de pargilina inhibidor de MAO de actuación relativamente amplia antes de añadir 5-HT. Como se muestra en la figura 10, aún la mayor concentración de pargilina 100 µM (columna E) que no presentaba ningún efecto perjudicial por sí mismo ("referencia"), no pudo influir en la suspensión de la síntesis de ADN ("5-HT") provocado por 5-HT. La figura 11 demuestra que se observó el mismo resultado cuando se utiliza clorgilina y deprenilo, que, respectivamente, presentan inhibición muy selectiva para las isoformas MAO-A y MAO-B (columna A - 0, columna B - clorgilina 10 µM, columna C - clorgilina 1 µM, columna D - deprenilo 10 µM, columna E - deprenilo 1 µM, columna F - clorgilina/deprenilo 10 µM, columna G - clorgilina/deprenilo 1 µM).

Aunque los experimentos anteriores dan pruebas de que el estrés oxidativo no fue la causa de la apoptosis provocada por 5-HT en células LB, además se emprendió el examen más directo de la generación de especies de oxígeno con potencial reactivo (ROS) como consecuencia de la absorción de 5-HT. Para esto se utilizó el ensayo OxyDNA, que cuantifica los restos de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) que se generaron como resultado del daño oxidativo al ADN (véase el apartado procedimientos 1.1.8 anterior). Haciendo referencia a la figura 12, puede observarse que no existe ningún aumento en el nivel de ADN oxidativamente dañado en el tratamiento de las células L3055 con concentraciones de 5-HT que de otro modo estimuló la apoptosis eficazmente (panel A, la representación en negrita representa células cultivadas en medio de control durante 6 h, la representación en color pálido representa células cultivadas en medio que contiene 5-HT 150 µM durante 6 h. La referencia al panel A pone de manifiesto que no hubo ningún aumento en el número de células que se conjugan con el anticuerpo fluorescente). Por el contrario, el tratamiento de las células con H₂O₂ 30 µM, que también favorecía eficazmente la apoptosis (datos no mostrados), produjo un gran aumento en la concentración de restos de 8-oxoguanosina generados (panel B, representación en negrita como para el panel A, la representación en color pálido representa células cultivadas en medio que contiene H₂O₂ 30 µM. El panel B presenta un aumento en el número de células fluorescentes, indicando por consiguiente una mayor proporción de células que contienen daño oxidativo).

1.2.6. Las células de linfoma de Burkitt expresan un transportador funcional de serotonina

La inversión de la acción de 5-HT sobre las células de LB del grupo I por los SSRI indica que 5-HT está ejerciendo sus efectos por un mecanismo de transporte activo. Aunque la presencia del SERT se ha descrito tanto para los linfoblastos B transformados con EBV como para los linfocitos de la sangre periférica normales, no ha habido ningún informe previo de su existencia o características sobre las células de linfoma de ninguna descripción.

La figura 13 presenta análisis de inmunotransferencia Western de lisados celulares con un anticuerpo aparecido con una única secuencia en el SERT. Esto puso de manifiesto la presencia de la proteína que migra como una sola banda con un peso molecular aparente aproximado de 70 kDa en todas las estirpes de LB utilizadas en este estudio. Esta banda corre más deprisa que la proteína inmunotransferida procedente de las células HEK293 que había sido transferida con SERT neuronal humano; las células HEK293 naturales fueron negativas para la proteína inmunorreactiva. Se ha sugerido que la modificación alternativa después de la traducción del SERT en diferentes tipos de células totaliza el intervalo de tamaño variable descrito para el transportador. Incluyendo la de una especie destacada de 60 kDa en algunos tejidos. Significativamente, la estirpe Mutu III que es relativamente resistente a las acciones inhibitoras de 5-HT (véase la figura 2) no obstante transportó niveles equivalentes de proteína SERT a su contrapartida del grupo I, y los transfectados bcl-2 de L3055 completamente resistentes también conservaban concentraciones altas de SERT. La figura 13 presenta también esto, mientras que las células Elijah LB del grupo I presentaban de manera coherente una concentración menor de proteína SERT que las demás líneas de LB, una banda inmunorreactiva demostrable estaba siempre presente. Cuando se evalúa la cinética de primer orden de la absorción de 5-HT como se muestra en la figura 14, las células L3055 se demuestra que llevan un transportador con propiedades similares a las descritas anteriormente para el SERT neuronal completo.

Ejemplos 2 a 4

2. Acción de las SSRI en la conducción de apoptosis en células del linfoma de Burkitt

2.1. Resultados

2.1.1. Las SSRI inhiben la síntesis de ADN y provocan muerte celular en estirpes celulares de linfoma de Burkitt del grupo I (L3055)

Las figuras 15 a 17 presentan el efecto inhibitor de fluoxetina dependiente de la dosis (Ejemplo 2), paroxetina (Ejemplo 3) y citalopram (Ejemplo 4) respectivamente sobre la síntesis de ADN en el estirpe celular LB del grupo I (L3055). Los estudios utilizaron una sola dosis de fármaco (dosis indicada en una escala $\log_{10}$) y se evaluó la inhibición de síntesis de ADN, un preludio a la apoptosis, mediante la incorporación de [3 H]-timidina en 24 h.

Las concentraciones de SSRI necesarias para efectuar la destrucción de células de linfoma *in vitro* eran del orden de 10 a 20 veces mayores que las conseguidas actualmente en la circulación de pacientes que se les administra fármacos para terapia antidepressiva.

Los pacientes de SSRI para la depresión conservan sus niveles circulantes durante meses en administraciones repetidas. Asimismo, las concentraciones en circulación se cree que representan una infraestimación grosera de la acumulación de SSRI en los tejidos corporales. Los linfomas son, por definición, tumores de tejidos linfoides (por ejemplo, ganglios linfáticos). La figura 18 presenta el efecto de varias dosis de fluoxetina sobre las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) después del cultivo durante 24 y 48 horas en medio que contiene el fármaco (columna A - 0, columna B - 30 μ M, columna C - 20 μ M, columna D - 10 μ M, Columna E - 5 μ M, columna F - 1 μ M, columna G - 0,5 μ M). Significativamente, esto demuestra que las células de la sangre normales son inmunes a los efectos de la fluoxetina a concentraciones en las que destruye las células tumorales.

La figura 20 presenta un experimento idéntico al presentado en la figura 6, sustituyendo el cultivo en el medio que contiene 5-HT por cultivo en el medio que contiene fluoxetina. La figura demuestra que aumentando la dosis de fluoxetina SSRI que se administró a poblaciones de células L3055 directamente condujo a las células de linfoma a morir y de nuevo, que después de 24 h cifras similares de células habían entrado en apoptosis y necrosis (células vivas del cuadrante A, células del cuadrante B que entran en necrosis, células del cuadrante C que entran en apoptosis). Después de 24 horas una dosis de 10 a 15 μ M de fluoxetina produjo aproximadamente el 40% de células de linfoma que entran en apoptosis.

2.1.2. Cambios en el perfil del ciclo celular en respuesta a la adición de SSRI

La figura 21 compara el estado del ciclo celular de las células L3055 después de 24 h de tratamiento con la fluoxetina SSRI o anticuerpo con cadena anti- μ (para ligar la PCR) (columna A - referencia, columna B - fluoxetina 10 μ M, columna C - 10 μ g/ml de anticuerpo con cadena anti- μ): cada uno se utilizó en su máxima concentración para inhibir la síntesis de ADN y provocar la muerte celular. Como en el mismo experimento realizado utilizando 5-HT, la ligadura de BCR ejerció una influencia algo mayor sobre el perfil del ciclo celular, pero ambos tratamientos produjeron una acumulación de la detención de células en el compartimento G_0/G_1 con una desaparición correspondiente tanto de las fases S como G_2/M del ciclo celular en comparación con los cultivos de referencia. Estos cambios son comparables con los asociados a la suspensión de la síntesis de ADN y la entrada en apoptosis.

2.1.3. Acción de las SSRI en la provocación de actividad de caspasa y potencial destrucción de la membrana mitocondrial

La figura 22 demuestra por análisis basado en FACS utilizando tinción con FAM-VAD-FMK que el tratamiento de las células con los SSRI (una sola dosis durante 24 horas) desencadena la activación de la caspasa (pico I - número de células con tinción negativa para la actividad de la caspasa, pico II - número de células con tinción positiva para la actividad de la caspasa) uno de los componentes clave de la cascada apoptótica siendo el panel A una referencia, panel B - tratamiento con fluoxetina (10 μ M), panel C - paroxetina (10 μ M) y panel D - citalopram (100 μ M). En la figura 22, se puede apreciar que todos los fármacos tienen un efecto significativo sobre el número de células que presenta actividad de caspasa.

Un sustrato corriente abajo mayor de la serie de reacciones de la caspasa, poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), experimenta una escisión en las células LB biopsioides como resultado de la acción de la fluoxetina. Mientras que PARP-1 intacta era la forma casi exclusiva en las células de referencia, fluoxetina 20 μ M favoreció la escisión extensa de PARP-1.

La Anexina V que se une a la fosfatidilserina expuesta en el prospecto exterior de las células a la señal para la fagocitosis es otra medida comúnmente utilizada de muerte programada aunque debería ponerse cuidado cuando se utiliza como un único indicador para evaluar la apoptosis en linfocitos B. Se describió que aunque las células L3055 no tratadas presentaban bajo nivel de Anexina V que se une a aproximadamente la mitad de las células, la mayoría de las células desarrollaron un nivel mayor de fijación después de su cultivo con fluoxetina (Tabla 2).

TABLA 2

Influencia de fluoxetina en la exposición de fosfatidilserina y roturas de la cadena de ADN en las células L3055 de LB

Tratamiento ^a	Fijación de Anexina V ^b		% positivo por TUNEL ^c
	% positivo	MFI	
Referencia	52,3 $\pm$ 1,8	3,9 $\pm$ 0,2	17,8 $\pm$ 3,7
Fluoxetina	81,1 $\pm$ 3,9	26,1 $\pm$ 8,4	35,7 $\pm$ 7,6

^aSe cultivaron células L3055 a 10⁶/ml durante 17 h en medio de referencia y con fluoxetina a 20 μ M.

^bMuestras analizadas por FACS para generar % de células positivas en la Anexina V⁺PI⁻ "apoptótica" controlan junto con la intensidad media fluorescente (MFI) de la tinción. Los resultados se expresan como medias $\pm$ SE de 3 experimentos por separado.

^cMuestras analizadas por FACS para generar % de células no subdiploides (evaluadas por tinción con PI) positivas por TUNEL (etiquetado final con el sobrenombre de dUTP-biotina mediada por desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)). Los resultados se expresan como medias $\pm$ SE de 3 experimentos por separado.

Ni las células de LB ni sus equivalentes de linfocitos B con centro germinal normal tendían a producir los "escalones de ADN" extensos que pueden observarse como resultado de la fragmentación del ADN cuando otras células (por ejemplo, timocitos) experimentan apoptosis. No obstante, se determinó si la fluoxetina podría ser que provoque el tipo de rupturas de ADN asociadas a la apoptosis utilizando un procedimiento basado en TUNEL en el que las células se trataron en primer lugar con ADN ligada antes de evaluar la incorporación por TdT de un nucleótido fluorescente marcado de ADN con rupturas de cadena que tienen los extremos truncados o salientes con una sola base. Los resultados presentaban un aumento discernible en el número de células L3055 con dichas rupturas después de su tratamiento con fluoxetina (Tabla 2).

Significativamente, las células mononucleares normales de la sangre periférica (PBMC) permanecieron viables en exposición a SSRI. La viabilidad de las células expuestas durante 24 h a fluoxetina 5 μ M y a fluoxetina 10 μ M fue registrada como 97,3 $\pm$ 0,88% y 97,3 $\pm$ 0,33% respectivamente en comparación con 98,0 $\pm$ 0,58% en los cultivos de referencia. Incluso con fluoxetina 20 μ M, la viabilidad permaneció a 83,7 $\pm$ 1,20%. Un resultado casi idéntico se observó con los linfocitos B normales en reposo aislados de amígdalas en las que las viabilidades después de 24 h de cultivo con medio de referencia o fluoxetina a 5, 10 ó 20 μ M eran de 97,4 $\pm$ 0,53%, 97,0 $\pm$ 0,41%, 96,5 $\pm$ 0,88% y 85,9 $\pm$ 1,07% respectivamente. Para evaluar la posibilidad de que SSRI pudiera dirigir selectivamente los linfocitos B cuando se cicla activamente, los linfocitos B de las amígdalas se expusieron durante la noche a fluoxetina después de 2 días de estimulación con *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC) (sola o combinada con CD40L) o con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (sólo o combinado con ionomicina). Una pequeña inhibición de la síntesis de ADN se produjo

en alguna de las poblaciones con ciclo activo incluso con fluoxetina presente a 20 μ M. Asimismo, el efecto inhibitor claro de la fluoxetina de la síntesis de ADN en las estirpes de LB biopsiodes tales como L3055 no fue evidente cuando se evaluó en 5 estirpes no de LB sin ninguna reducción o solamente reducciones menores, en el nivel de incorporación de ^3H -timidina observada en Nalm-6 ("pre-B"), RPMI 8226 ("plasmacitoide") o en las tres estirpes de linfocitos T: Jurkat, J10, y CEM (datos no mostrados).

2.1.4. Efecto de los SSRI sobre el Ca^{2+} libre intracelular

La figura 23 demuestra que el tratamiento de células L3055 con fluoxetina (indicado en una escala $\mu\text{M log}_{10}$) conduce a un aumento mantenido en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular libre. La fluoxetina, paroxetina y citalopram también favorecieron todos un aumento en el Ca^{2+} basal con una forma y cinética similares (datos no mostrados). Los estudios adicionales con fluoxetina han indicado que: (i) actúa sobre las reservas de Ca^{2+} del retículo endoplásmico sensible a la tapsigargina y; (ii) desencadena el aporte de Ca^{2+} . El aumento en el Ca^{2+} intracelular libre es conocido por ser una etapa importante en la inducción de la apoptosis. Esto apoya mas los datos que sugieren que los fármacos cuyo SERT diana puede provocar apoptosis en las células cancerosas que no expresan genes tumorales con supervivencia.

2.1.5. Efecto del gen Bcl-2 tumoral con supervivencia sobre el efecto apoptótico de los fármacos que interactúan con el SERT

La figura 24 presenta perfiles FACS de exploración delantera frente a lateral que presentan el efecto sobre la supervivencia de transfectar estirpes de las células de LB naturales, que son sensibles a la destrucción por los SSRI (las concentraciones de SSRI son las mismas que las utilizadas en la figura 22, las células se expusieron a los fármacos durante 24 h). En la figura 24, las flechas A indican células muertas, las flechas B indican células vivas, con porcentajes dados con relación a los porcentajes de las células vivas. El panel I presenta datos para la estirpe celular LB natural y el panel II para la estirpe celular transfectada por Bcl-2. Como puede observarse, la destrucción de las células está reducida en gran medida por la presencia del producto génico Bcl-2. Dado que este gen se expresa en la mayoría de las células periféricas será relativamente resistente a la apoptosis provocada por el fármaco que interactúa con el SERT.

Ejemplo 5

Imipramina

3. Acción del inhibidor imipramina de reabsorción no selectiva en la conducción de la apoptosis de células de LB

La figura 19 presenta el efecto dependiente de la dosis de la imipramina en la síntesis de ADN en estirpes de células LB del grupo I (una sola dosis, síntesis de ADN medida después de 24 h). La imipramina aunque no es un SSRI es conocida por interactuar con el SERT con una afinidad similar a la fluoxetina. Esto puede observarse por los valores de EC_{50} similares para la síntesis de ADN de los dos fármacos.

La figura 25 corresponde con la figura 22, y demuestra que la imipramina también presenta un efecto significativo sobre el número de células que presentan actividad de caspasa (pico I: células con tinción negativa, pico II: células con tinción positiva).

Haciendo referencia a la figura 26, puede observarse que, como era el caso de los SSRI (figura 24) la destrucción celular por la imipramina está reducida en gran medida por la estirpe de células LB transfectadas con Bcl-2 (panel II: 91% de supervivencia) sobre la estirpe de células naturales (panel I: 30% de supervivencia).

4. Posible función de *c-myc*

El LB está caracterizado porque presenta las transposiciones de un alelo *c-myc* a uno de los locus de inmunoglobulina y la tasa de crecimiento extraordinariamente alta que caracteriza estos tumores refleja las acciones pro-proliferantes del gen transpuesto. A pesar de su transposición de la marca a los locus de la inmunoglobulina, la expresión constitutiva asociada a LB de *c-myc* continúa siendo dependiente de la fijación del factor Nm23-H2 de transcripción de *c-myc* reconocido a una zona PuF en la secuencia reguladora del gen transpuesto. Utilizando RT-PCR en tiempo real (datos no representados), se descubrió que una exposición a la fluoxetina de 6 h de células de LB biopsioides producía una reducción aproximada del 60% en las concentraciones tanto de nm23-H2 como de *c-myc*. Se observó también que existía una disminución rápida del 75% en la expresión de nm23-H2 cuyo producto ha estado también ligado a la expresión de *c-myc*. En cambio la expresión de la ciclofilina A del gen constitutivo no se alteraba significativamente con las demás concentraciones a 81,8% (SE=8,3%) de los valores de referencia después del tratamiento con fluoxetina (P=0,16).

Recientemente se ha identificado que Nm23-H1 está posiblemente ligada a la expresión de *c-myc*. Por lo tanto, el SSRI parece influir en muchos genes que apoyan la división celular incontrolada asociada normalmente al LB. Además, la expresión elevada de Nm23-H1 se ha correlacionado con las escasas respuestas al tratamiento en los linfomas de alto grado distintos de LB. Estas observaciones pueden por consiguiente tener implicaciones para la explotación clínica de SSRI en el contexto más amplio del linfoma de linfocitos B.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto seleccionado de entre fluoxetina, paroxetina, citalopram, fluvoxamina y un inhibidor de reabsorción de serotonina no selectivo, para su utilización en el tratamiento de la neoplasia de linfocitos B.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de reabsorción no selectivo se selecciona de entre imipramina, desipramina, amitriptilina y clomipramina.

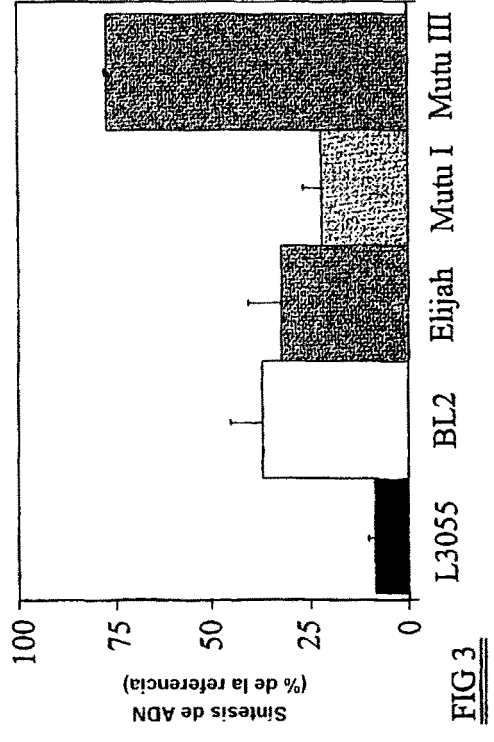
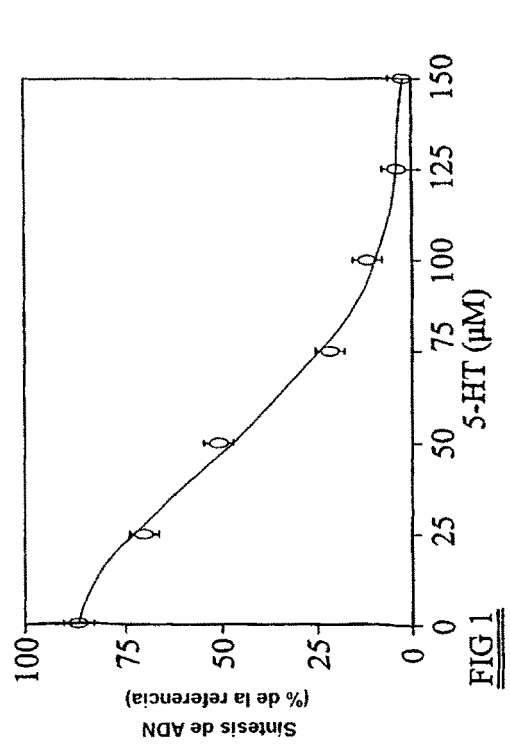
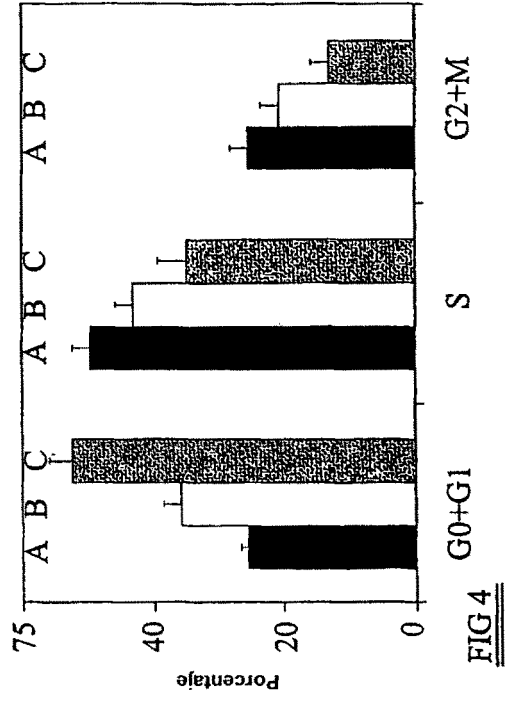
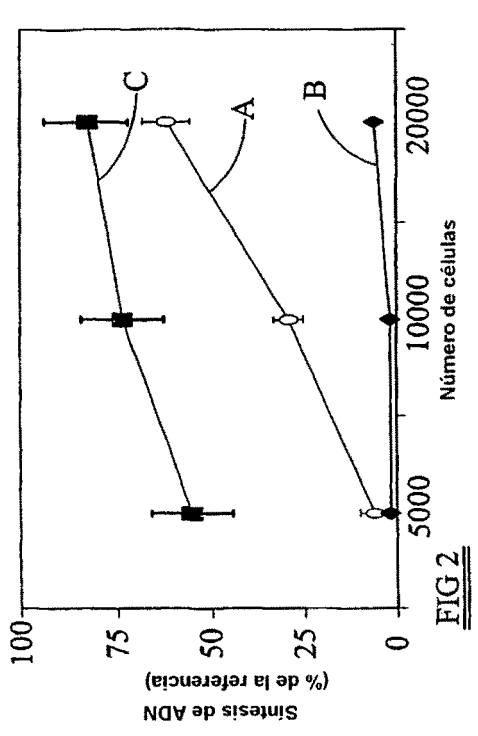
3. Compuesto según la reivindicación 1, que es la fluoxetina.

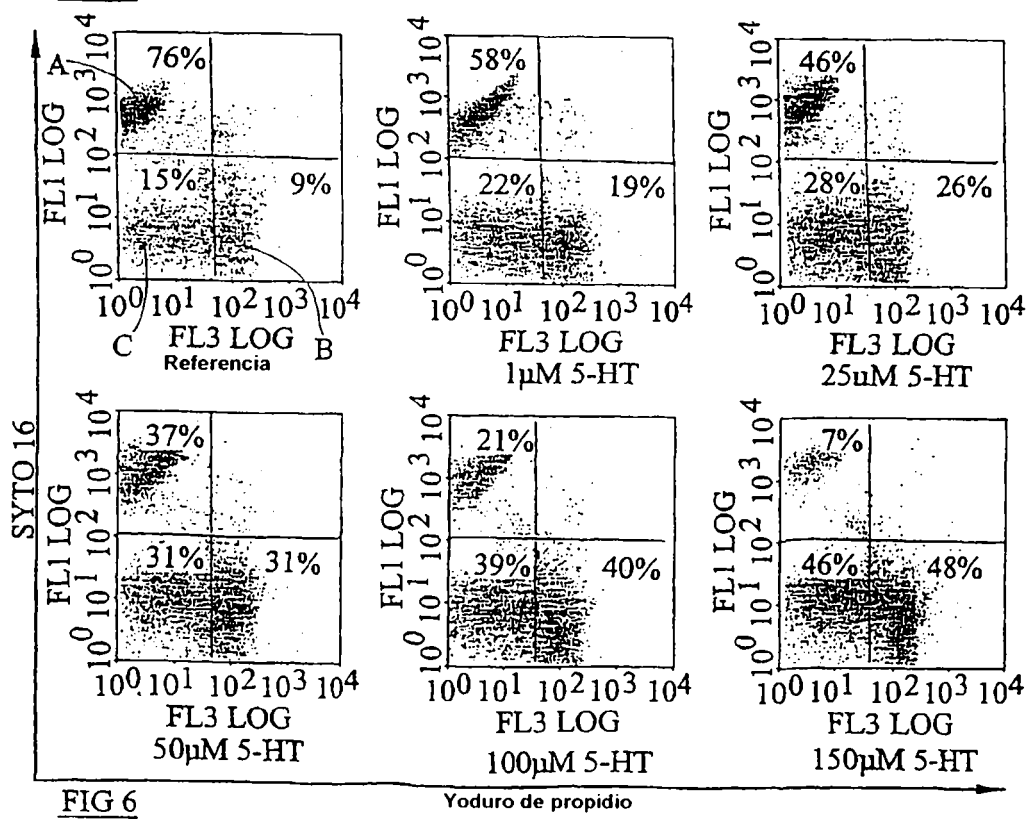
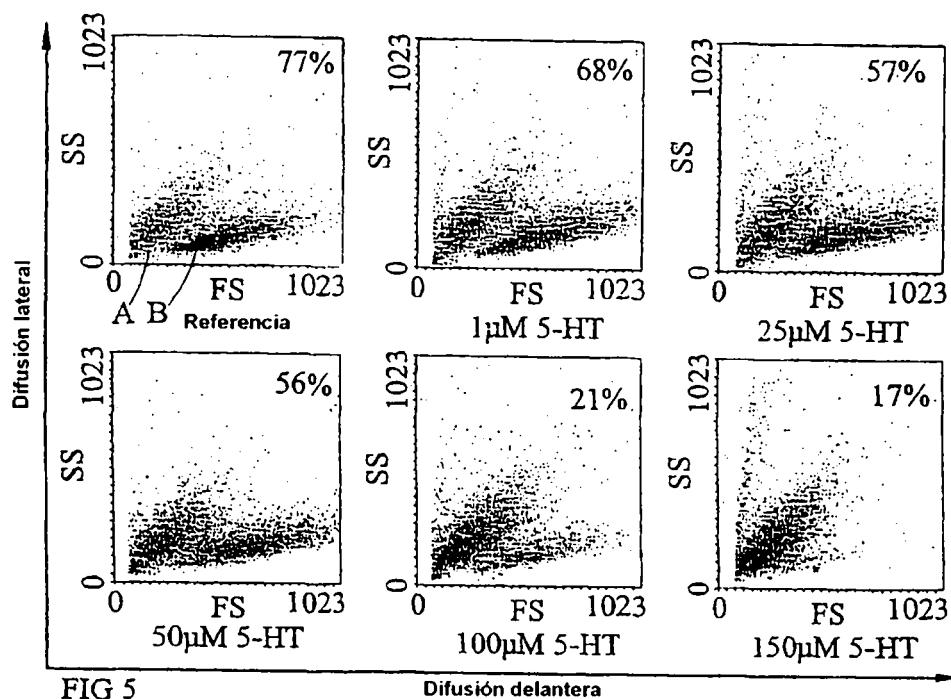
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la neoplasia es el linfoma de Burkitt.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la neoplasia es la leucemia linfocítica crónica.

6. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la neoplasia de linfocitos B.

7. Utilización según la reivindicación 6, en el que el sujeto de tratamiento está asimismo sometido a tratamiento por administración secuencial o concomitante de un agente para aumentar la sensibilidad de los linfocitos B a la apoptosis, en la que dicho agente es paclitaxel, irinotecán, fludarabina, ciclofosfamida, docetaxel, gemtuzumab ozogamicina, arabinósido de citosina, dexametasona o un agente complementario dirigido a Bcl-2.





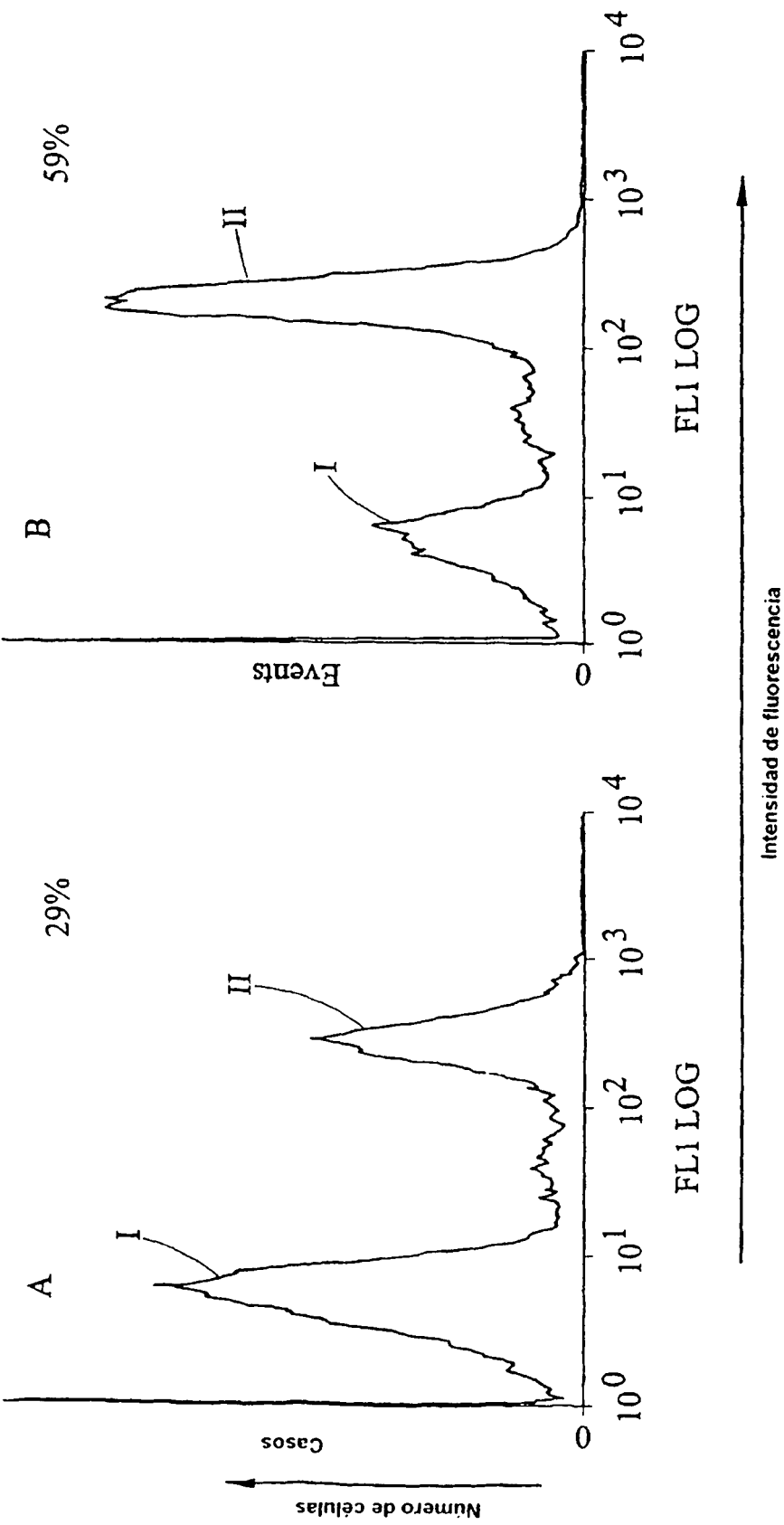


FIG 7

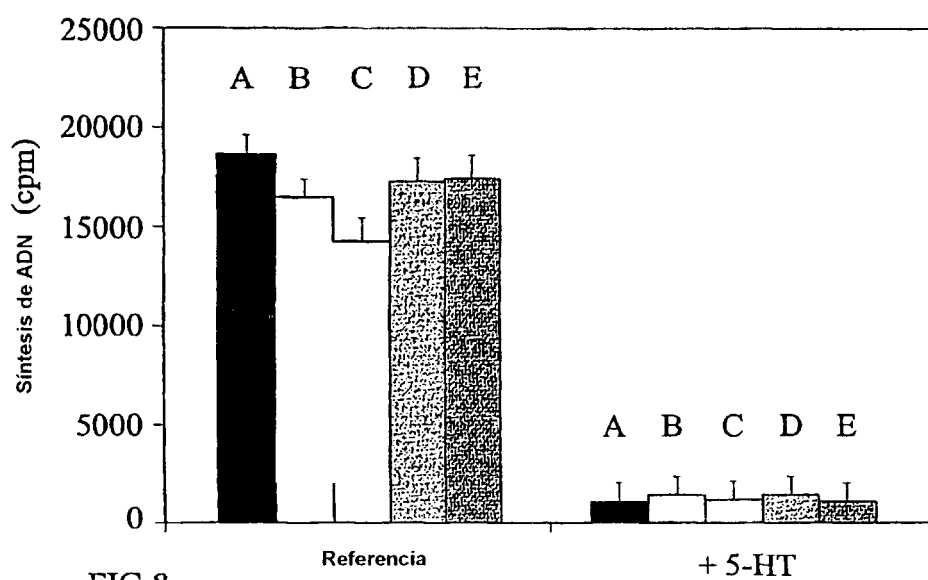


FIG 8

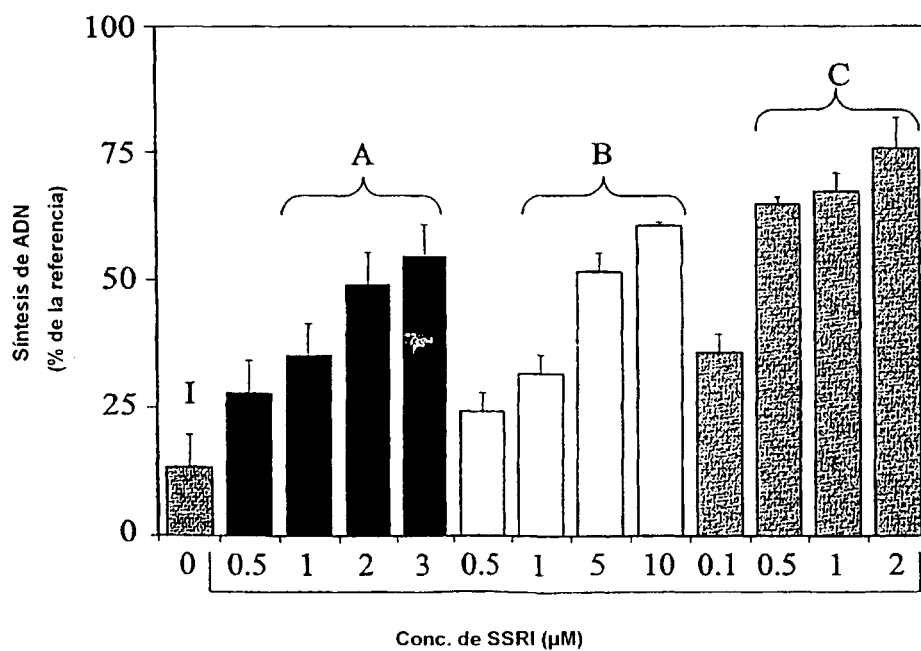


FIG 9

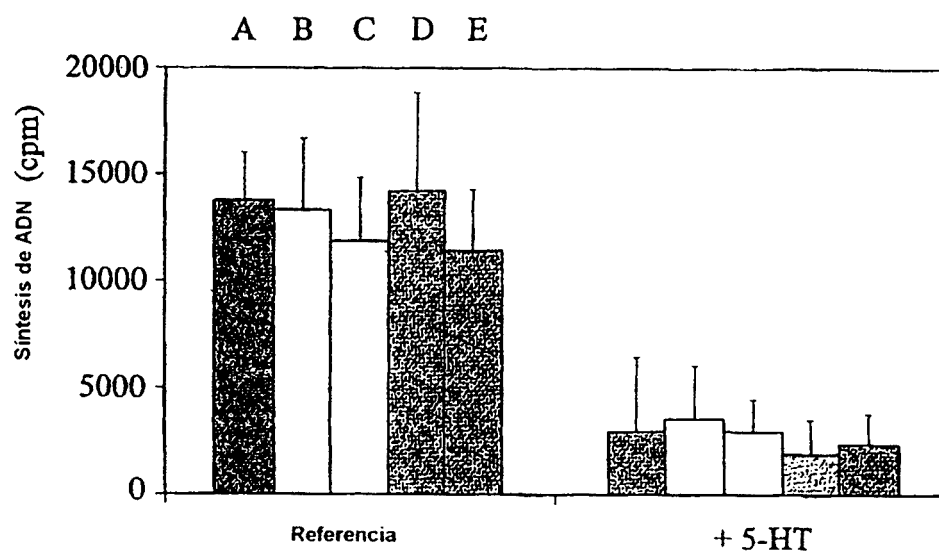


FIG 10

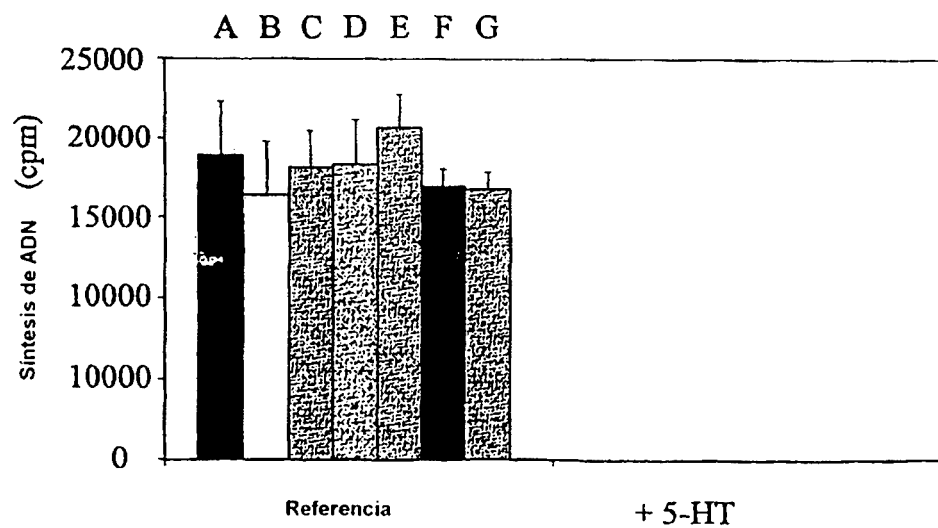


FIG 11

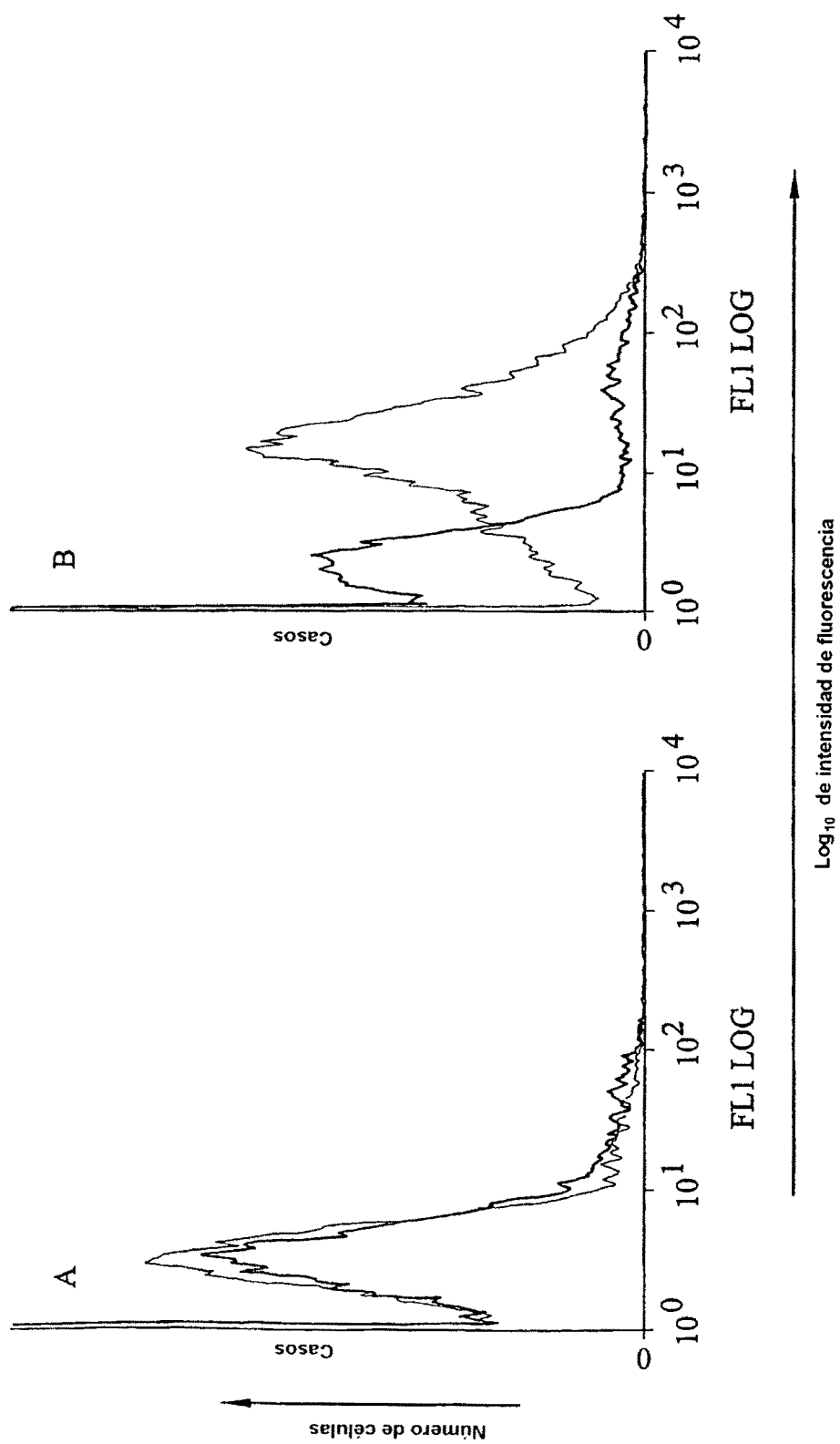


FIG12

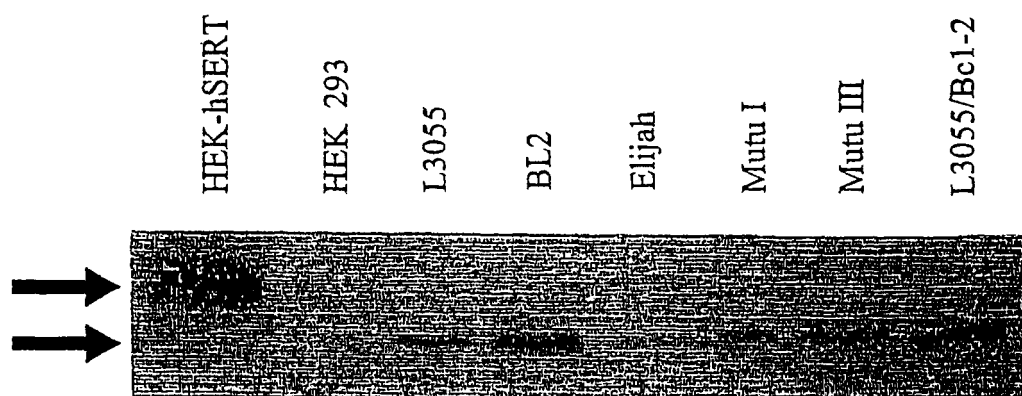


FIG 13

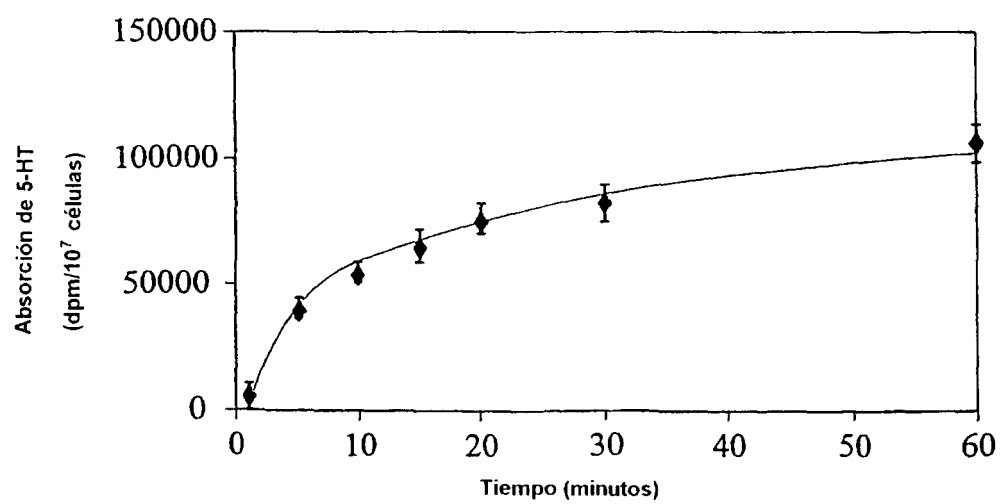
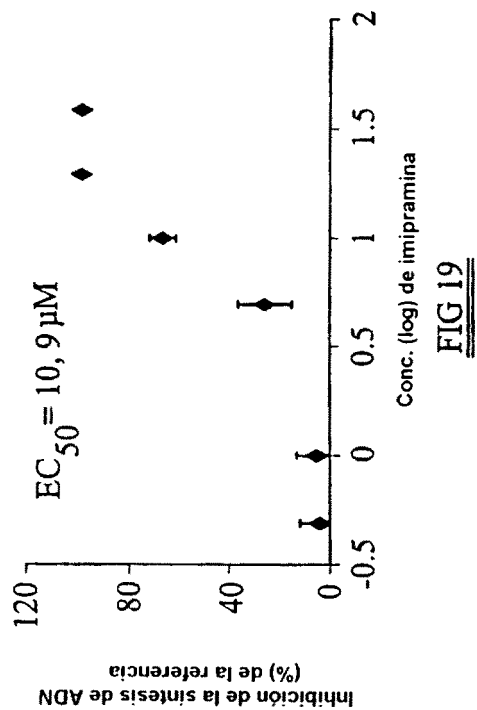
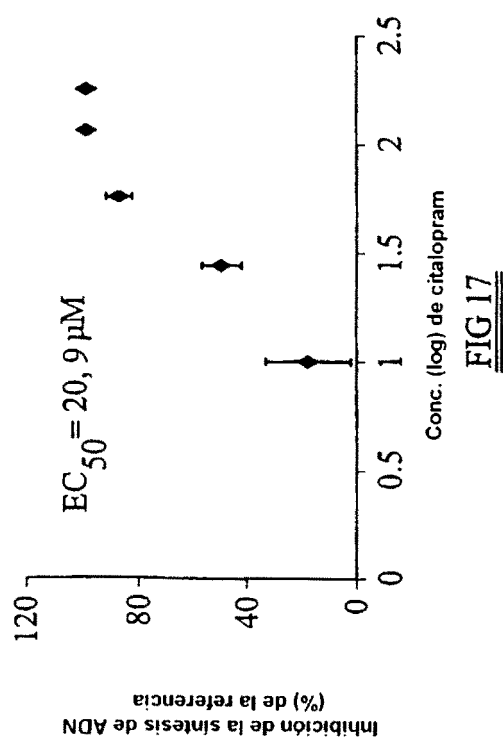
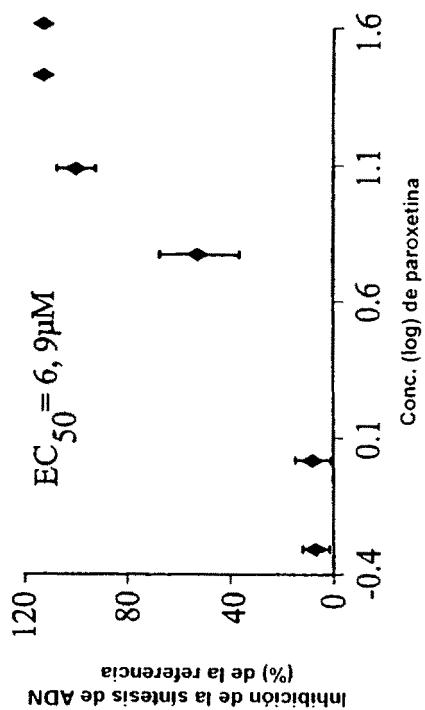
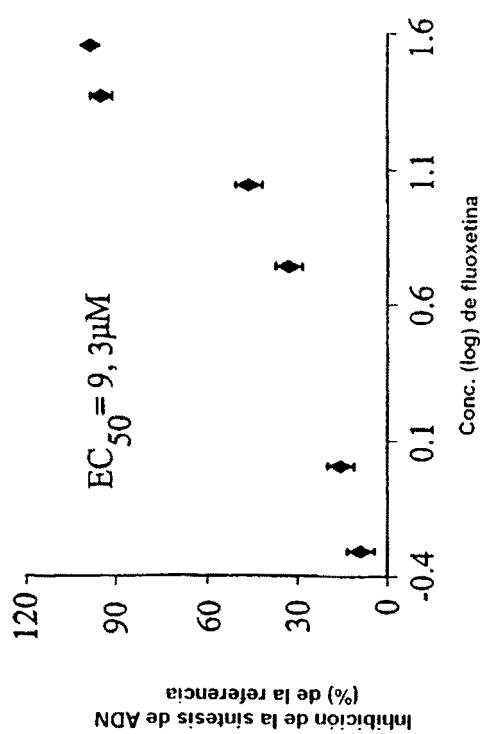


FIG 14



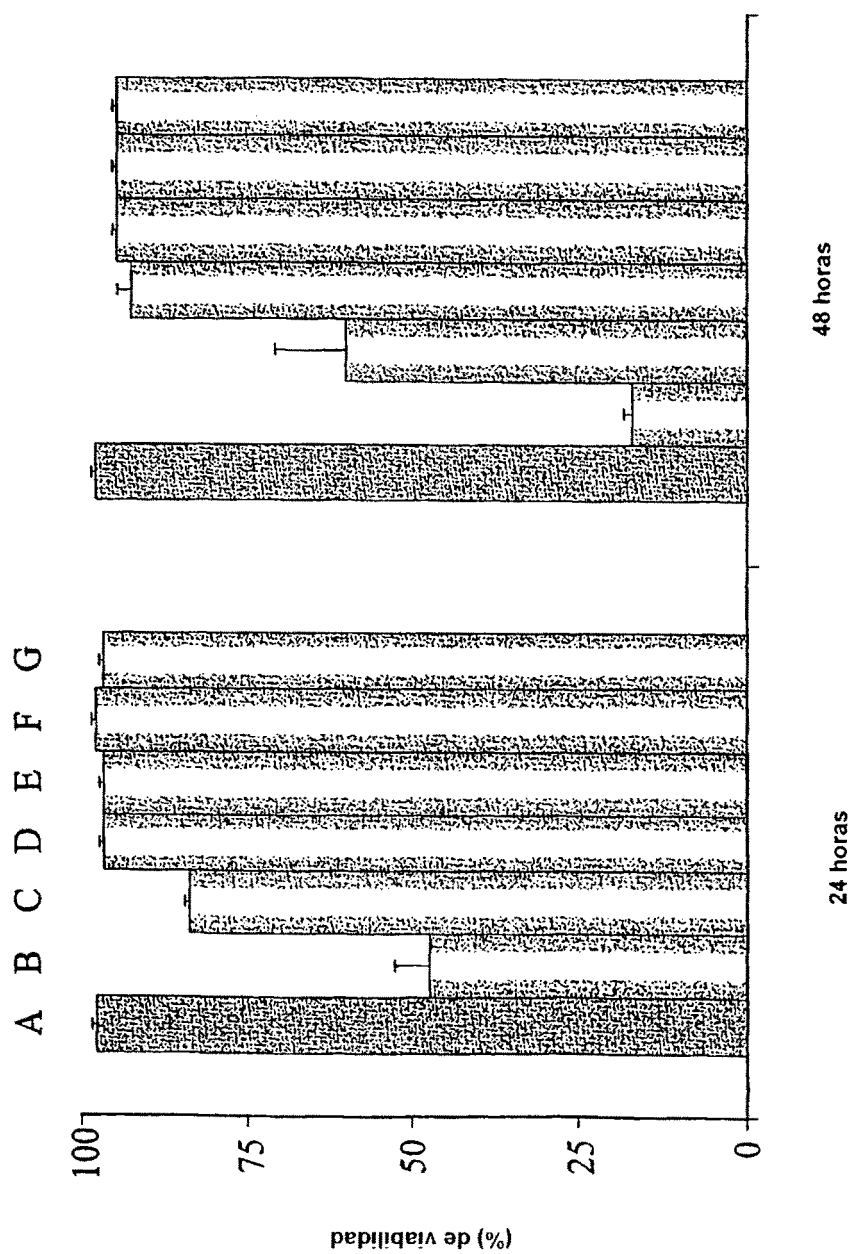
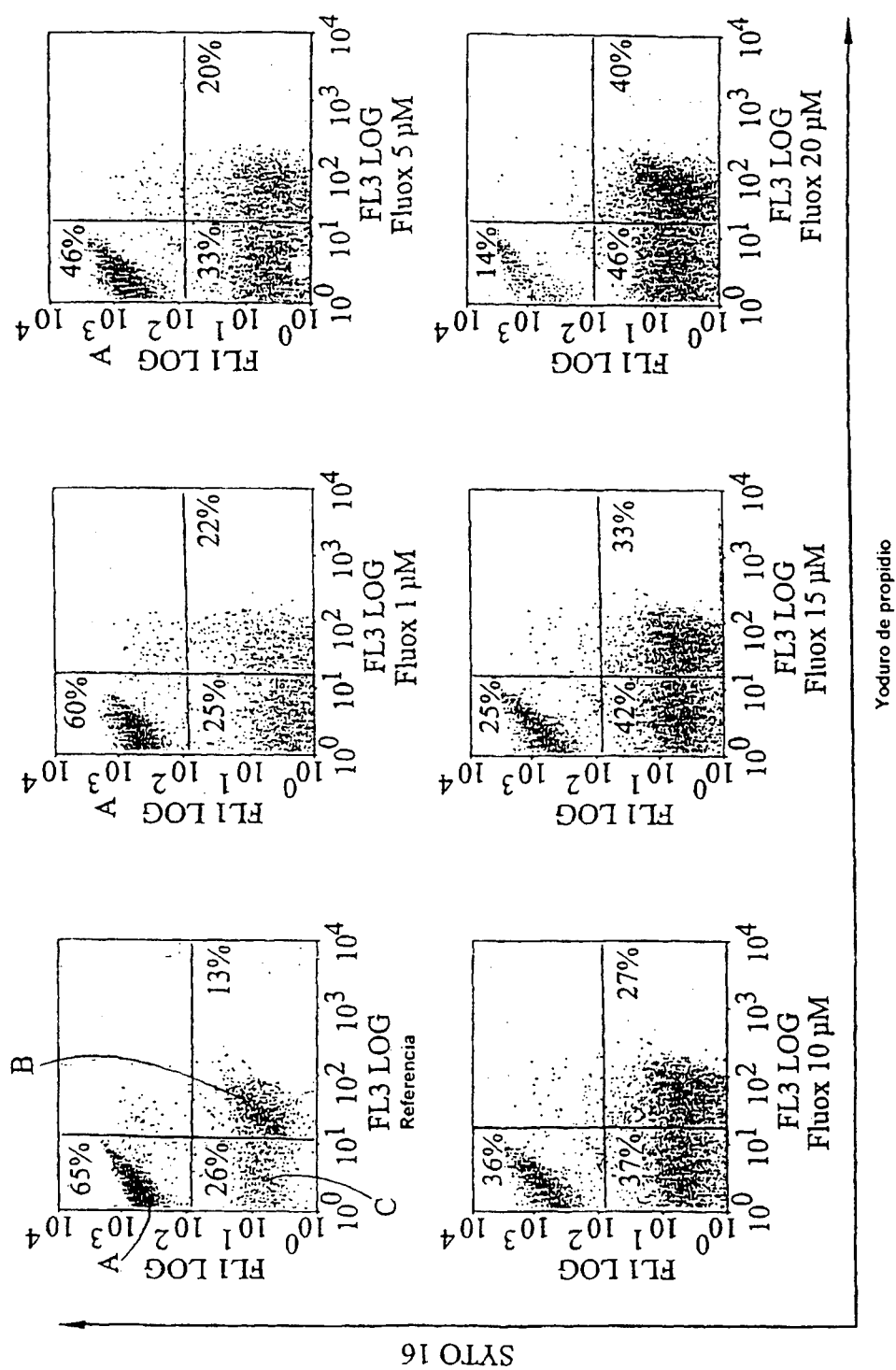


FIG 18



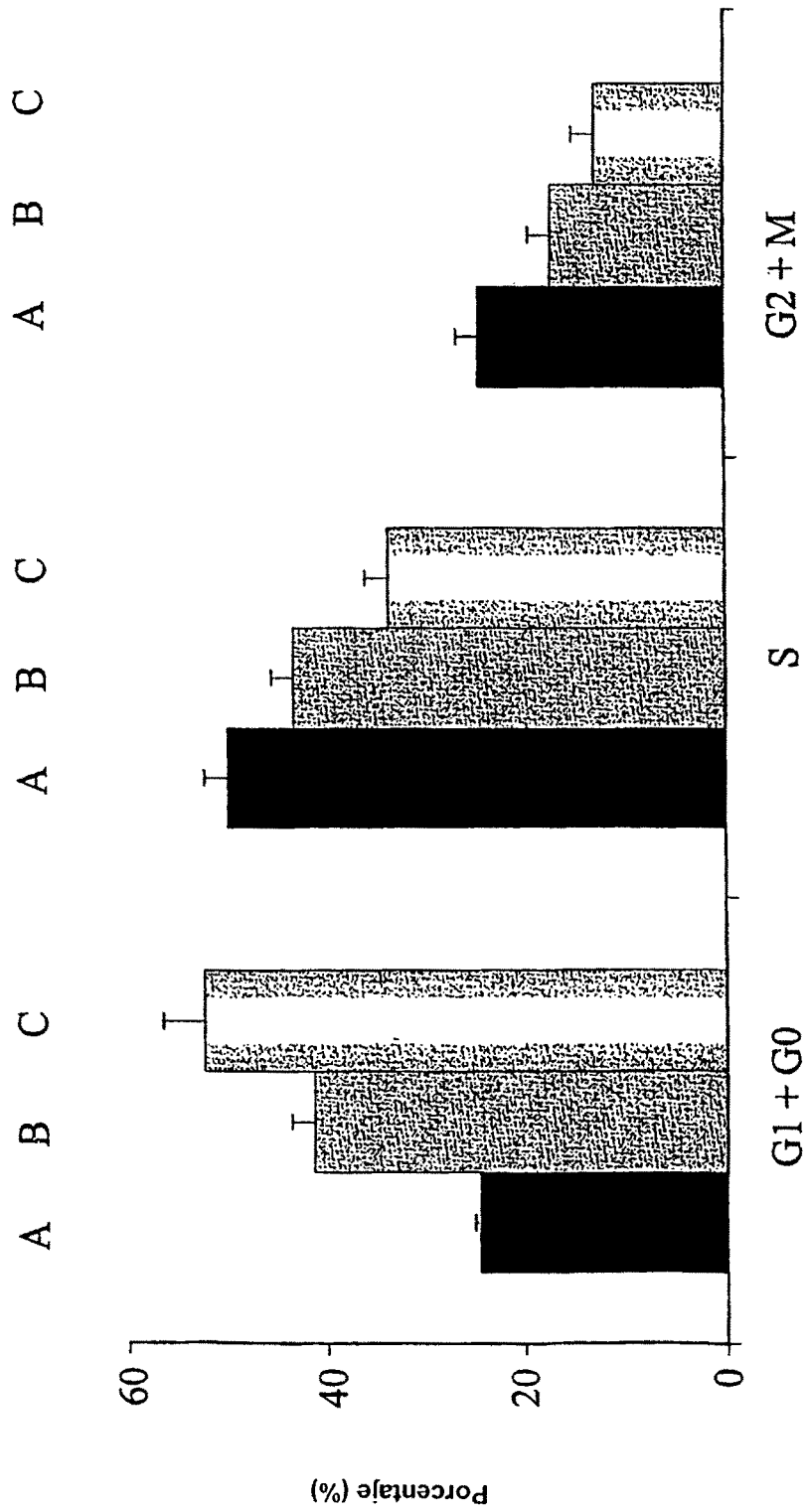
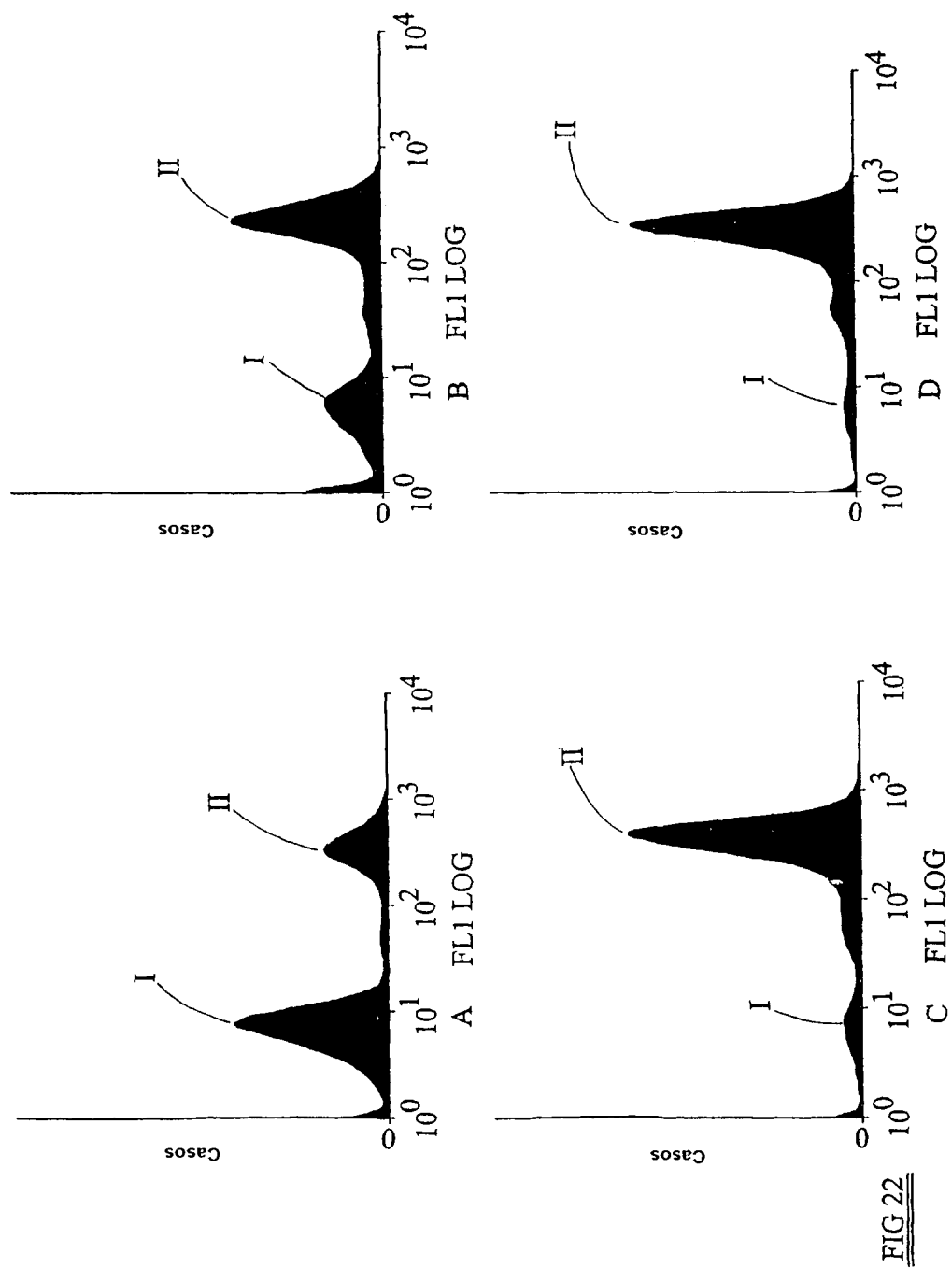


FIG 21



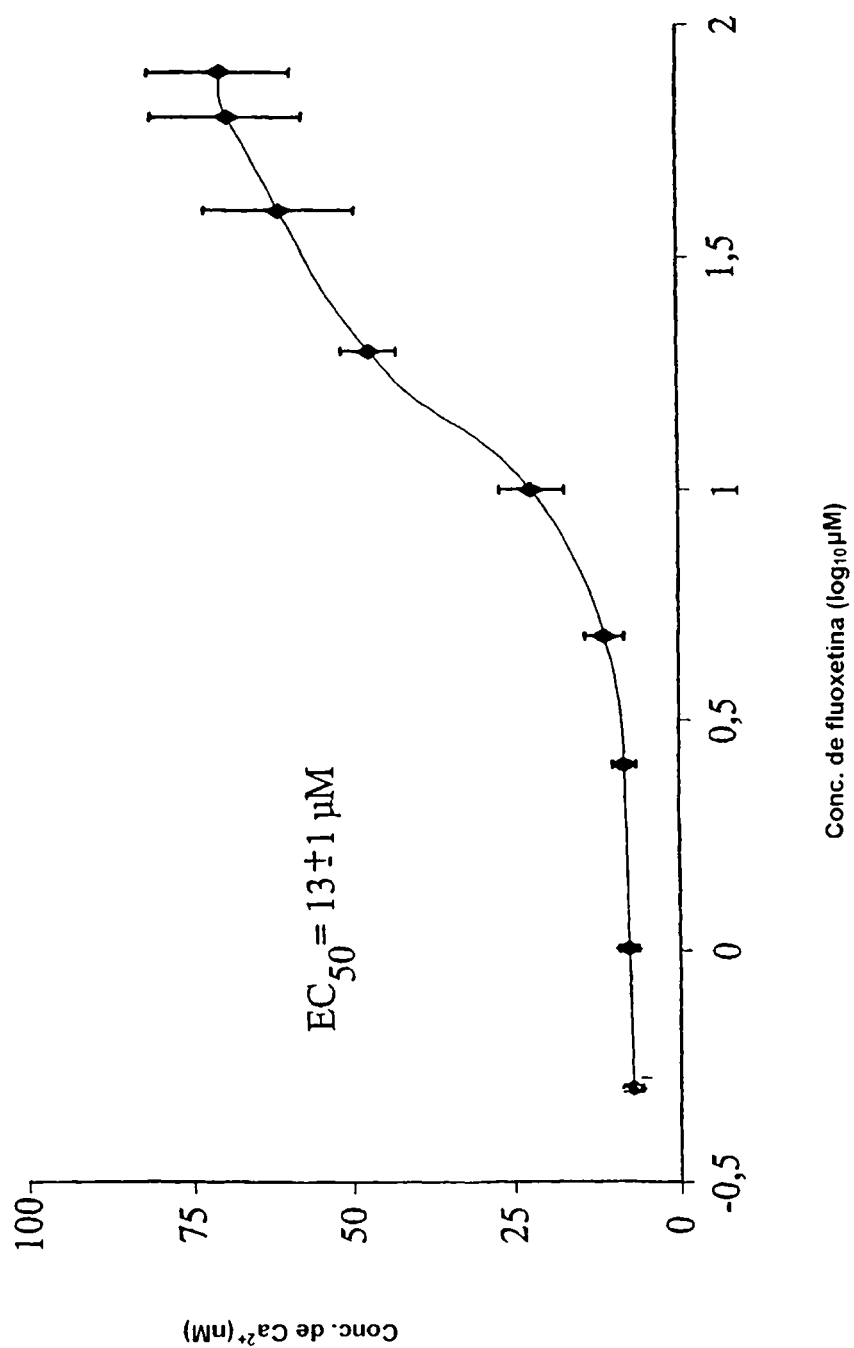


FIG 23

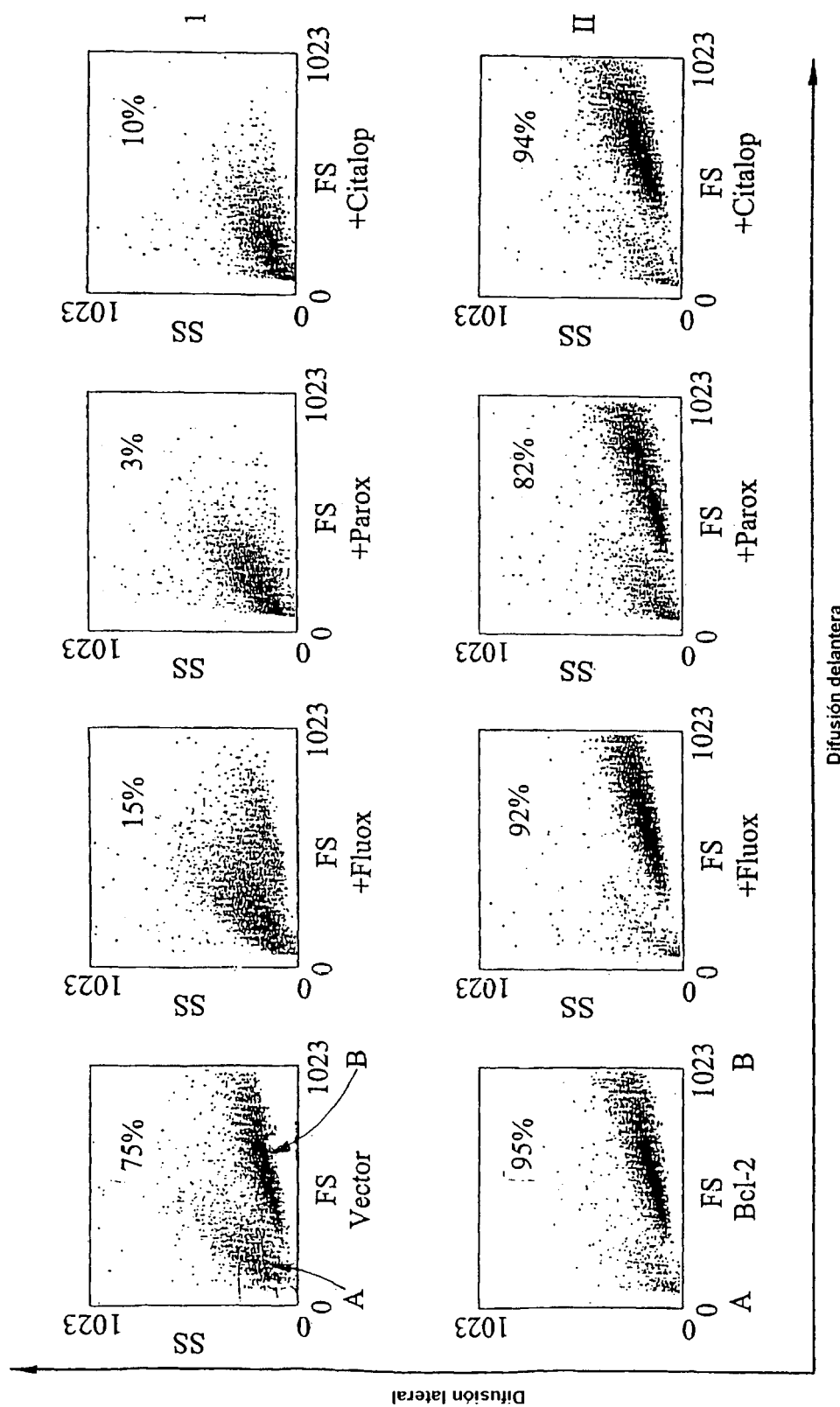


FIG 24

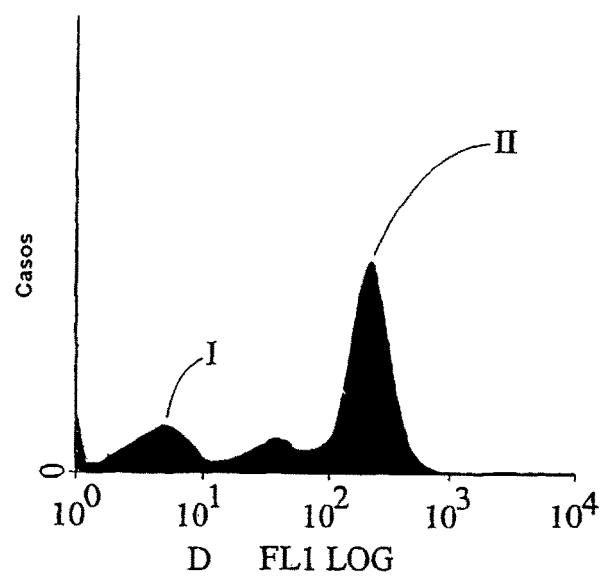


FIG 25

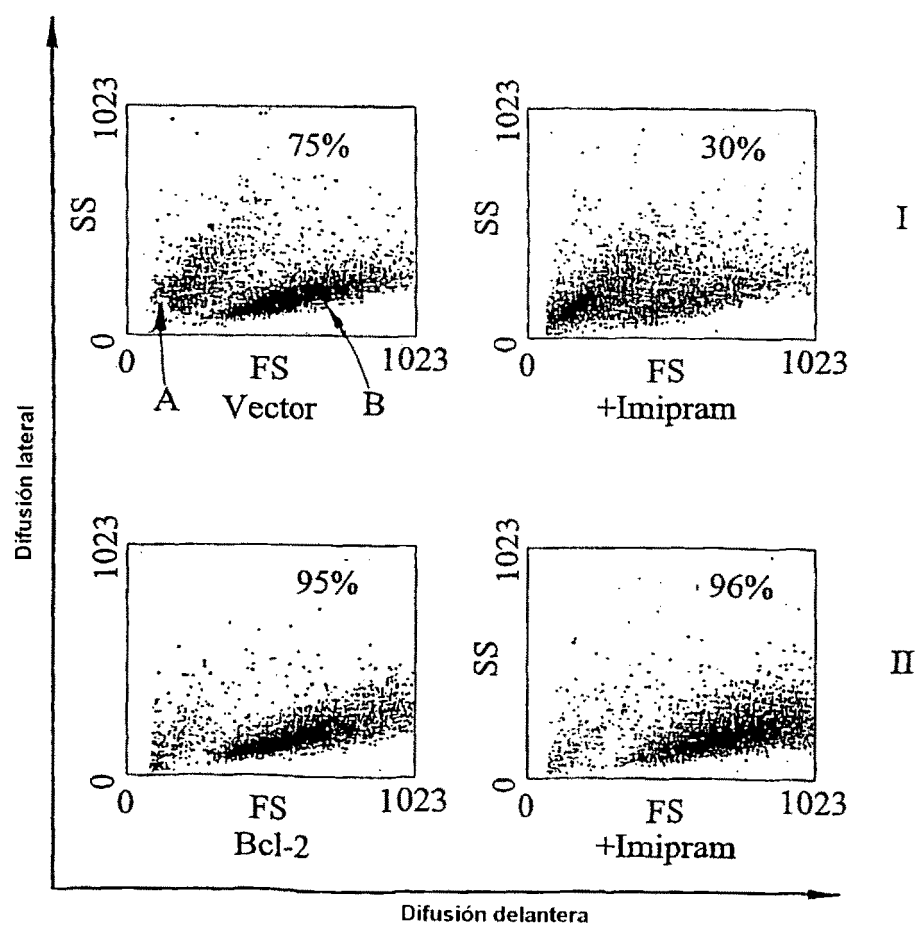


FIG 26