

Título: Aislamiento y caracterización de un nuevo polipéptido de origen bacteriano con potente actividad antitumoral.

Autora Principal: María del Carmen Abrahantes Pérez mc.abrahantes@cigb.edu.cu

Coautores: Eduardo Martíñez Díaz, Mónica Bequet Romero, Gloria Veliz Rios, María del Rosario Alemán, Luis Javier Gonzáález López, Jorge Valdés, Diamile González, Jorge Víctor Gavilondo Cowley, José García Suárez, Osmany Mendoza, Gabriel Márquez, Manuel Selman-Housein, Lila Castellano, Yoymí Claro Abreu, Rolando Paez Meireles, Jesús Reyes González.

Centro de trabajo: Unidad de Desarrollo Biotecnológico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana.

Introducción

El cáncer constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial y se espera que para el 2020 se convierta en la causa más frecuente (Forteza, 2004). De ahí el empeño de la comunidad científica internacional en estudiar cada vez más esta enfermedad y la búsqueda de fármacos efectivos para su tratamiento.

En este trabajo se aborda, en particular, la línea experimental relacionada con el efecto terapéutico de las infecciones bacterianas sobre los tumores malignos. El físico y cirujano William B. Coley fue el primero en informar que muchos de sus pacientes con varios tipos de cáncer, presentaron regresión tumoral después de ser infectados por bacterias patógenas (Coley, 1893). Luego le sucedieron otras publicaciones de regresiones de tumores malignos en pacientes después de infecciones con determinados microorganismos (revisado por Chakrabarty, 2003). Lógicamente, esta información ha servido de base en la búsqueda de fármacos terapéuticos contra el cáncer, por investigadores de diferentes laboratorios (Dang y col., 2001; Hunter y col., 2001).

La terapia experimental con microorganismos, -principalmente bacterias patógenas (Pawelek y col., 2002), ha incluido el uso de organismos vivos, atenuados o muertos, sus combinaciones, y el empleo de extractos microbianos diferentes (Chakrabarty, 2003).

Los efectos antitumorales observados en muchos de estos casos, se han atribuido a una estimulación de la inmunidad mediada por células (Paglia y col., 1998). Sin embargo, esta hipótesis ha sido cuestionada recientemente; ya que se ha encontrado que la regresión tumoral asociada a las infecciones pudiera estar relacionada con determinadas moléculas citotóxicas producidas por los microorganismos, con efecto directo sobre células tumorales (Yamada y col., 2002a; Goto y col., 2003) o endoteliales (Hunter y col., 2001) y sin la acción determinante del sistema inmune (Folkman y col., 2003).

Nosotros también realizamos observaciones similares a las anteriores, durante el desarrollo de experimentos destinados a evaluar las características del prendimiento tumoral del hibridoma CB-Hep.1 (Fontirroche y col., 1993) en ratones consanguíneos BALB/c mantenidos en condiciones de recinto. Se observó una sustancial disminución del rendimiento de producción de fluido ascítico en algunos animales, que se asoció a

un crecimiento deficiente de las células tumorales inyectadas en la cavidad peritoneal. El examen de las posibles causas de este fenómeno incluyó la evaluación microbiológica de la ascitis de cada ratón. En ésta se demostró que el número de extracciones de ascitis tumoral y el volumen de cada una de ellas, disminuían por animal, cuando la bacteria *Serratia marcescens* estaba presente en el fluido ascítico. La ausencia o desaparición del microorganismo se asoció igualmente a niveles normales en el rendimiento de la producción de ascitis tumoral en los animales. Estas observaciones reproducibles sugirieron una posible relación directa entre la regresión tumoral y la presencia de *S. marcescens* en el peritoneo de los ratones y llevaron a explorar la literatura, al respecto de si se habían publicado previamente efectos semejantes sobre tumores, tanto en modelos experimentales como en el humano, ante la presencia de infecciones con *S. marcescens*.

En el caso específico de *S. marcescens*, se han obtenido preparaciones con propiedades antitumorales experimentales y clínicas, a partir de cepas diferentes de esta bacteria anaerobia facultativa. Las más estudiadas son: [a] ImuVert® (Budagov y col., 2001), una preparación de membranas ribosomales que activan el sistema inmune de los pacientes, [b] la proteasa Serratial 56K (Wu y col., 2001), que induce la muerte celular por necrosis dependiente de la expresión de la proteína α -2 macroglobulina (Maeda y col., 1989), y [c] las prodigiosinas, una familia de pigmentos que actúan como inmunosupresores y anti-cancerígenos a través de la inducción de apoptosis (Montaner y col., 2003; Perez-Tomas y col., 2003).

El examen detallado de estas y otras publicaciones nos llevó a pensar que los efectos antitumorales observados en el plasmacitoma murino CB-Hep.1, podrían deberse a la acción de moléculas diferentes a las mencionadas anteriormente. Además, en ellos podían estar involucrados mecanismos distintos a los descritos por otros autores o una combinación de los mismos. Tampoco se descartó la posibilidad de estar en presencia de cepas de *S. marcescens* con propiedades diferentes. Sobre esta base y con el objetivo principal de intentar el descubrimiento de una o más moléculas novedosas con efecto antitumoral, nos planteamos la hipótesis de trabajo siguiente:

"Es posible utilizar el sistema microorganismo/tumor/hospedero con regresión tumoral, para seleccionar una cepa de *S. marcescens*, cuyo cultivo permita la obtención de un extracto con propiedades antineoplásicas *in vitro* e *in vivo* que contenga moléculas novedosas potencialmente útiles para la terapia del cáncer".

En este artículo se resumen más de 14 años de intensa investigación de nuestro equipo de trabajo, que permitieron demostrar la validez de una hipótesis que tuvo sus orígenes en una observación científica, hasta contar hoy con un novedoso polipéptido recombinante en la fase final de desarrollo preclínico para su posterior uso en la terapia del cáncer.

Materiales y métodos

Control del proceso de obtención de fluido ascítico rico en anticuerpos monoclonales para uso diagnóstico en laboratorios. Para identificar las causas que influyeron en la disminución reiterada del rendimiento de la producción de fluido ascítico del hibridoma CB-Hep.1 en ratones BALB/c (Fontirrochi y col., 1993), se evaluaron los factores que pudieran intervenir en este proceso. Para ello se estudiaron 20 animales distribuidos de manera aleatoria dentro de la población (1000 ratones).

Además, se realizó el estudio microbiológico de las posibles fuentes de contaminación, con el consecuente aislamiento de los microorganismos de interés.

Obtención de la cepa CMIB4202. La cepa CMIB4202 de *S. marcescens* se aisló desde la ascitis de animales con regresión tumoral producto de la co-inoculación i.p. de la cepa salvaje de *S. marcescens* SM1995 en ratones BALB/c con las células tumorales CB-Hep.1 (Abrahantes-Pérez MC y col., 1996).

Obtención de la preparación antiproliferativa MG2327. Para obtener una preparación antiproliferativa a partir de la cepa CMIB4202 de *S. marcescens* se realizó el cultivo en fermentadores de 5 L de medio PG a 28°C, y 0.1 de densidad óptica (DO) inicial. El medio de cultivo se ajustó a pH 7.2± 0.2 y la fermentación se realizó a pH libre por 14 h (areación 1 vvm, 250 rpm). El cultivo de CMIB4202 se centrifugó a 12 000 g, a 4°C por 30 min, se colectó el sobrenadante y se filtró por membrana de 0.2 µm, bajo condiciones asepticas. El volumen se redujo 10 veces mediante una membrana de 10 kDa de límite de exclusión. Después, el concentrado se dializó contra PBS, pH 7.2, a 4°C durante 24 h y se filtró nuevamente. Alícuotas de 5 mL se dispensaron en viales de cristal apirogénicos. La preparación, que se denominó "MG2327", se mantuvo almacenada a 4°C hasta su empleo (Abrahantes-Pérez y col., 2006).

Fraccionamiento del preparado MG2327. Para aislar los componentes proteicos de interés, se empleó una columna XK50/30 con resina de intercambio iónico DEAE Sepharose Fast flow equilibrada con 50 mM de tampón fosfato, pH 8.0. La elusión se realizó con un gradiente de tres niveles de NaCl (0.1, 0.2 y 2 M NaCl) en 50 mM tampón fosfato pH 8.0 y un flujo de 29.8 mL·min⁻¹.

Identificación de las biomoléculas antiproliferativas. Los polipéptidos antiproliferativos se identificaron mediante el método descrito por Hardy y Castellanos-Serra (Hardy y Castellanos-Serra, 2004). La secuencia del polipéptido de interés se completó por secuenciación automática y el método enzimático de terminación de cadena de Sanger (Sanger y Coulson, 1975) del gen codificante para la expresión de este polipéptido.

Actividad citotóxica sobre células tumorales o normales. Para la caracterización de la actividad antiproliferativa y/o citotóxica *in vitro* de la preparación MG2327 y sus moléculas de interés naturales o recombinantes, se evaluó un panel de líneas tumorales humanas (Viñas, Vínuesa y Abrahantes-Pérez, 2007) y murinas (también se evaluaron células normales) mediante el método del MTT (Skehan y col., 1990), o sulforrodamina B (SRB) (Monks y col., 1991).

Evaluación ultraestructural de las células tumorales P3X63Ag8 tratadas con MG2327. El análisis ultraestructural se diseñó simultáneamente con la evaluación del ADN "ladder". Un total de 10⁶ células tumorales del mieloma P3X63Ag8 se trataron con MG2327 (22 µg·mL⁻¹ de proteínas totales), en frascos de cultivo T25 (COSTAR). Las muestras se procesaron a las 2, 4, 6, 8 y 24 h después del tratamiento. Como control negativo se incluyeron 10⁶ células P3X63Ag8, las cuales recibieron solo PBS. Las células se fijaron con 3.2% de glutaraldehído en 0.1 M de tampón fosfato (pH 7.2) por 1 h a 4°C, y se lavaron repetidamente con el mismo tampón; las células se post-fijaron en 2% de OsO₄ por 1 h a 4°C, y se lavaron usando el mismo tampón. Finalmente, las células se deshidrataron en etanol a diferentes grados y se incluyeron en resina "Spurr". Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranil saturado en 50% de acetona con 2% de citrato de plomo. Después se examinaron con un microscopio electrónico Jeol JEM 2000EX operado 80 kV (Reyes y col., 1998).

Evaluación del efecto antiangiogénico de los polipéptidos P50 y P25 sobre la formación de estructuras tubulares en matrigel. La formación de cordones endoteliales por las células endoteliales humanas derivadas de microvasculatura (HMEC) se analizó sobre matrigel (Crum y col., 1985; Vacca y col., 1999), en presencia de concentraciones no citotóxicas de MG2327 y sus polipéptidos P25 y P50 (Abrahantes-Pérez y col., 2004). Los ensayos se realizaron como ha sido publicado por Sanz y colaboradores (Sanz y col., 2002). Los resultados finales se evaluaron teniendo en cuenta la longitud de las estructuras tubulares formadas y el número de interconexiones entre ellos utilizando el programa Image-Pro Express 4.5 (Media Cybernetic, MD, USA).

Efecto del CIGB370n sobre la inhibición de metástasis. Modelo experimental de metástasis espontánea de pulmón de Lewis. Las células 3LLD122 (2×10^5) se inocularon en la almohadilla plantar posterior derecha de ratones C57BL/6 (Li y col., 2002). Siete días después, el polipéptido CIGB370n se inyectó por vía i.p. (dosis única de 1 mg.kg^{-1}). Cuando los tumores alcanzaron $\sim 8 \text{ mm}$ de diámetro, los tumores primarios se eliminaron mediante escisión quirúrgica de la pata portadora. Los ratones se sacrificaron 21 días después de este procedimiento. Los pulmones se pesaron, como parámetro indicador de la cantidad de metástasis presentes en los mismos.

Clonaje y expresión del CIGB370. Para ello se sintetizó un gen optimizado para la expresión del CIGB370 (desde la Ser₂₁₅ hasta el extremo C-terminal de la serralisina SERMA) en *E. coli*. El plásmido pTrcSM25K se transformó en la cepa DH5 α , y se realizaron estudios de expresión en diferentes medios de cultivo. La expresión se verificó mediante SDS-PAGE y *Western Blot*, para lo cual se tomaron alícuotas de los cultivos, equivalentes a 2/DO (660 nm) antes y después de la inducción de la expresión con IPTG durante los cultivos.

Micropurificación del CIGB370 obtenido por vía recombinante en *E. coli* a partir de geles SDS-PAGE con tinción inversa. Con el objetivo de realizar la prueba del concepto del nuevo paradigma de la regresión tumoral mediada por infección descrito en este trabajo, se micropurificó la banda del polipéptido CIGB370 expresada en *E. coli*, (CIGB370r). Para ello, se aplicó el precipitado de 2/DO (tratados con el tampón reductor Laemmli) del cultivo en medio LB a geles SDS-PAGE. Después se realizó la tinción Imidazol-SDS-Zinc (Hardy y col., 1996). La banda de interés se cortó, se trató con 25 mM Tris, 0.3 M glicina, pH 8.0 y se lavó con agua. Entonces la banda se reaplicó a un gel PAGE nativo y se recuperó mediante el método descrito por Hardy y colaboradores (Hardy y col., 1996). Similar procedimiento se realizó con el polipéptido CIGB370n y con la cepa negativa (DH5 α sin el gen de la P25). Para el establecimiento de la tecnología de obtención del polipéptido P25 recombinante y su posterior caracterización farmacológica, se realizó su clonaje y expresión en sistemas apropiados para uso humano.

Evaluación de la actividad antitumoral y antimetastásica del polipéptido CIGB370 (in vivo). Para evaluar la actividad antitumoral del polipéptido CIGB370 natural o recombinante, se evaluaron varios modelos singénicos o xenógrafos, diferentes vías y esquemas de administración. A modo de resumen, mencionaremos dos de ellos, referidos a la potencialidad de esta molécula para la terapia del cáncer de pulmón y su capacidad de inhibir metástasis en el mismo.

- 1) **Modelo singénico de actividad antitumoral:** TC-1 (Lin y col., 1996). Los ratones C57BL/6 se inyectaron (tiempo 0) en el flanco derecho por vía s.c. con 50 000 células

TC-1 (Lin y col., 1996). Las células TC-1 se generaron a partir de células epiteliales de pulmón de ratones C57BL/6 transfectadas con los genes E6 y E7 del HPV 16 y activadas con el oncogen ras. Después del tiempo especificado en cada experimento, los ratones recibieron una dosis i.p. de 1 mg.kg^{-1} del CIGB 370 **natural**. Los animales controles negativos recibieron solamente el vehículo. Se usaron 10 ratones en cada grupo experimental y se evaluó la sobrevivencia de los mismos. Las diferencias de sobrevivencia entre los grupos se determinaron con una prueba de Logrank, mediante el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

- 2) *Modelo singénico experimental de metástasis espontánea de pulmón de Lewis*. Las células 3LLD122 (2×10^5) se inocularon en la almohadilla plantar posterior derecha de ratones C57BL/6 (Li y col., 2002). Siete días después, el polipéptido CIGB370 **natural** se inyectó por vía i.p. (dosis única de 1 mg.kg^{-1}). Cuando los tumores alcanzaron ~ 8 mm de diámetro, los tumores primarios se eliminaron mediante escisión quirúrgica de la pata portadora. Los ratones se sacrificaron 21 días después de este procedimiento. Los pulmones se pesaron, como parámetro indicador de la cantidad de metástasis presentes en los mismos.
- 3) *Modelo xenógrafo de actividad antitumoral: A549* (Shaik y col., 2006). Los ratones atímicos BALB/c, nu/un, se inyectaron (tiempo 0) en el flanco derecho por vía s.c. con 3×10^6 células tumorales humanas A549 (células no pequeñas de cáncer de pulmón humano, ATCC CCL-185). Cuando los tumores fueron palpados, los ratones recibieron una dosis i.p. por semana durante 4 semanas de 1.5 mg.kg^{-1} del CIGB 370 **recombinante**. Otro grupo recibió 20 mg.kg^{-1} de Paclitaxel (Yamori y col., 1997) con similar vía y esquema de administración que el CIGB370. Los animales controles negativos recibieron solamente el vehículo. Se usaron 5 ratones en cada grupo experimental y se evaluó la sobrevivencia de los mismos. Las diferencias de sobrevivencia entre los grupos se determinaron con una prueba de Logrank, mediante el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados y discusión

Evaluación microbiológica de muestras del plasmacitoma CB-Hep.1 y su correlación con la disminución en la producción de fluido ascítico.

Durante la ejecución de experimentos de caracterización de la producción de

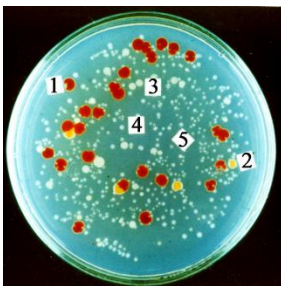


Figura 1. Fotografía de una placa petri donde se observan las colonias de las bacterias aisladas del fluido ascítico de los ratones analizados. Las colonias de color rojo fueron identificadas como la bacteria *S. marcescens*.

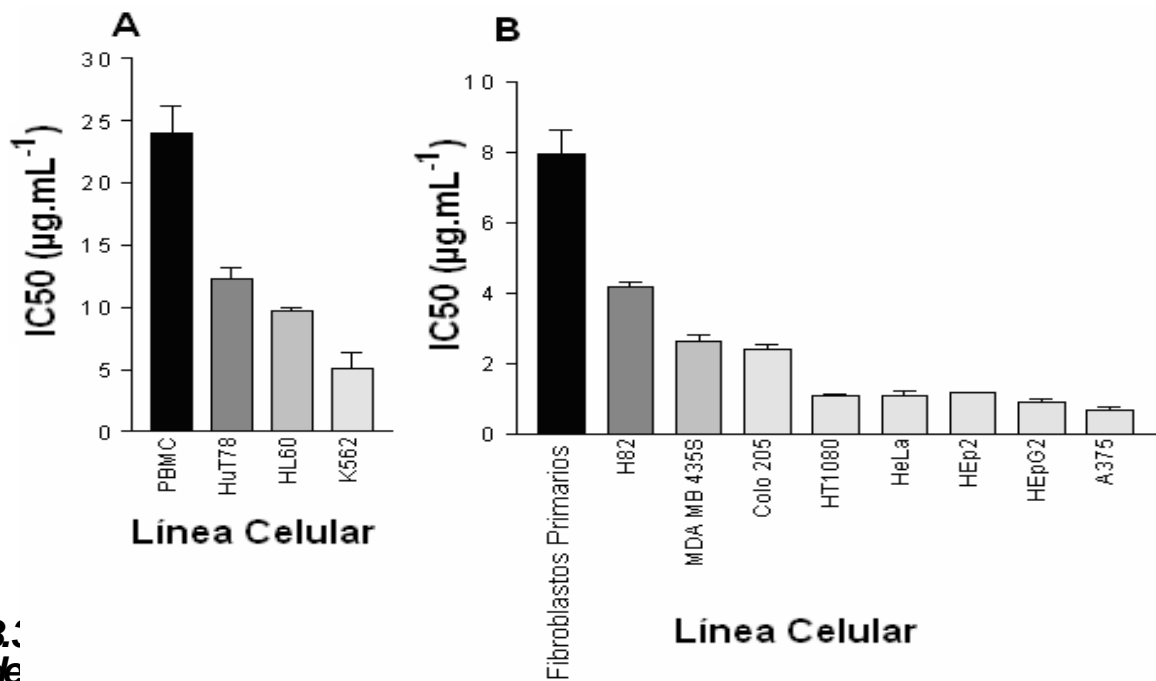
ascitis del hibridoma secretor del anticuerpo monoclonal CB-Hep.1 (Fontirrochi y col., 1993), en ratones BALB/c, se observó una significativa y reiterada disminución progresiva del volumen de fluido ascítico intraperitoneal en algunos animales. En el análisis microbiológico del fluido ascítico se encontró que los animales con regresión tumoral estaban mayoritariamente contaminados con un tipo específico de bacteria, la cual fue aislada e identificada como *Serratia marcescens* (Fig. 1, identificada con el número 1).

Estas observaciones reproducibles llevaron a pensar que podría existir una relación directa entre la regresión tumoral observada y la contaminación con la bacteria *S. marcescens*. Para comprobar esto se realizó la co-inoculación controlada de *S. marcescens* junto con células

tumorales en ratones BALB/c (Abrahantes-Pérez y col., 1996). Esta vez provenientes de lotes registrados como “libres de patógenos específicos” (SPF) y mantenidos en condiciones de recinto controlado. El crecimiento del tumor fue severamente suprimido, con una disminución del volumen de fluido ascítico en tres veces, y una regresión total de los tumores entre los diez y doce días después de la inoculación de la mezcla. Ello evidenció que la infección con *S. marcescens* del plasmacitoma murino CB-Hep.1, afectó el crecimiento del mismo, e indujo regresión tumoral en los animales infectados (Abrahantes-Pérez y col., 1996).

Efecto de MG2327 in vitro sobre células de diferente origen histológico.

Para estudiar si el efecto observado estaba relacionado con moléculas producidas por *S. marcescens* capaces de inducir regresión tumoral, se obtuvo un extracto del sobrenadante de cultivo (denominado MG2327) de esta bacteria (Abrahantes-Pérez y col., 2006a). Éste se evaluó *in vitro* por el método del MTT (Skehan y col., 1990), sobre líneas de células malignas humanas de origen histológico diferente, y su actividad se comparó con la obtenida sobre células normales: células mononucleares periféricas de la sangre (PBMC) y fibroblastos primarios. Los resultados demostraron acción citotóxica amplia y selectiva sobre células tumorales humanas, Fig. 2 (Viñas, Vinuesa y Abrahantes-Pérez, 2007).



3. de

apia

Figura 2. Efecto del extracto MG2327 de *S. marcescens* sobre células tumorales.

A) Actividad del extracto sobre células cancerígenas (o no) de origen epitelial humano.

B) Actividad del extracto sobre células cancerígenas (o no) de origen hematopoyético humano. Los fibroblastos primarios y PBMC son células normales. Las barras representan la DEM de tres experimentos independientes.

A partir de MG2327 se logró aislar un fragmento proteico de aproximadamente 25 kDa (codificado en el CIGB como P25 ó CIGB370), como el principal responsable de la

potente actividad antitumoral observada (Abrahantes-Pérez y col., 2006b). Con los resultados obtenidos mediante secuenciación por Degradación Edman automatizada, espectrometría de masas, secuencia nucleotídica y los alineamientos realizados, se logró obtener la secuencia completa del polipéptido (Abrahantes-Pérez y col., 2006b).

Este correspondió con el extremo C-terminal no proteolítico de la proteína PRZN_SERMA (Braunagel y col., 1990). Tanto el fragmento no proteolítico de interés (P25, CIGB370), como la metaloproteasa que le dio origen (P50, PRZN_SERMA), se encontraban sobreexpresados en el perfil de proteínas excretadas por la cepa CIMB4202, con respecto a la cepa salvaje SM1995.

Mediante estudios *in vivo* se logró evidenciar un marcado efecto antitumoral del polipéptido P25 sobre tumores sólidos (Fig. 3), incluso cuando se administró como dosis única por vía sistémica. Se demostró además, que este polipéptido tiene efecto anti-angiogénico (Fig. 3A) y anti-metastásico (Fig. 3C) (Abrahantes-Pérez y col., 2006b). Ello sugiere que la regresión tumoral mediada por infección puede estar dada por la acción directa de moléculas proteicas producidas por el microorganismo objeto de la infección, sobre las células tumorales y/o sobre la vasculatura del tumor. Estos novedosos hallazgos evidencian nuevos conceptos sobre éste fenómeno, que abren las puertas hacia la búsqueda de nuevos medicamentos para la terapia del cáncer, basado en este nuevo paradigma.

El polipéptido P25 fue finalmente obtenido por vía recombinante en *E. coli* (Fig. 4A) y se demostró que mantiene la misma actividad biológica *in vitro* por el método de sulforrodamina B (SRB) (Monks y col., 1991), observada en la molécula natural (Fig. 4B). En experimentos *in vivo* se ha encontrado un potente efecto antitumoral de esta molécula (Fig. 4C), superior a drogas anti-cancerígenas comerciales como el paclitaxel (Fig. 4D).

Potencialidad del polipéptido CIGB370 en la terapia del cáncer.

Los estudios mostrados en este trabajo se iniciaron a partir de la observación en 1994 de que la presencia de *S. marcescens* en la cavidad peritoneal de ratones portadores de un plasmacitoma murino, era capaz de disminuir la producción de ascitis. Esta investigación permitió conocer que la bacteria *S. marcescens* presenta la capacidad de producir factores solubles antitumorales con promisorio futuro para la terapia del cáncer. Nuestros resultados retomaron el tema de *S. marcescens* en la regresión tumoral y abrió nuevas líneas de investigación en otros laboratorios del mundo (Viñas, Vinuesa y Abrahantes-Pérez, 2007), tales como el de Perez-Tomas y colaboradores (Montaner y col., 2000; Perez-Tomas y col., 2003; Montaner y col., 2005).

La integración de los resultados obtenidos en la caracterización del nuevo polipéptido CIGB370 y del preparado MG2327 que le dio origen, permite hacer algunos comentarios y predicciones:

1. El hecho de que las líneas de células tumorales humanas H82, H125, y A549, derivadas de cáncer de pulmón, hayan mostrado gran sensibilidad al tratamiento *in vitro* con el CIGB370, y que los tumores TC-1 (modelo de cáncer de pulmón murino) y A549 (modelo de cáncer de pulmón humano) hayan disminuido su volumen tumoral con prolongada sobrevivencia de los ratones portadores, revierte vital importancia en el uso del CIGB370 recombinante para el tratamiento de esta patología, que actualmente es la primera causa de muerte por cáncer.

2. Otras patologías de cáncer a tener en cuenta para su evaluación en la clínica, dada su sensibilidad al polipéptido CIGB370 (y/o al preparado MG2327) y su resistencia a las terapias actuales son: (i) cáncer de piel (Zhang y col., 2005); (ii) carcinoma laríngeo; (iii) El cáncer de mama; (iiii) cáncer cervicouterino; (iiiii) cáncer de colon; y (iiiii) mielomas múltiples (Chou, 2005).

3. El polipéptido CIGB370 evidencia efecto antiangiogénico, el cual puede contribuir a la regresión de tumores malignos de diferente origen histológico. La combinación del efecto citotóxico y antiangiogénico hacen del CIGB370 un promisorio candidato para la terapia del cáncer (Gasparini, 2005).

4. Lo que hace difícil la erradicación del cáncer utilizando la cirugía o la radiación localizada, es su habilidad para formar metástasis (Tripathy y col., 2004; DeAngelis y Boutros, 2005). El polipéptido CIGB370 fue capaz de inhibir la formación de metástasis de pulmón en el modelo experimental de metástasis espontánea del tumor de Lewis. La comprensión de los mecanismos inducidos por el polipéptido CIGB370 debe permitir el diseño de tratamientos para bloquear las metástasis, independientemente del origen del tumor primario.

Proyecciones futuras en el campo de las bacterias en el tratamiento del cáncer.

En este trabajo se muestra el efecto citotóxico de factores secretados por *S. marcescens* sobre células tumorales, en ausencia del sistema inmune. Estos factores también presentan actividad antiangiogénica, lo cual sugiere nuevos paradigmas en el campo de la regresión tumoral mediada por infección. Similares hallazgos fueron encontrados por Huntly y colaboradores (Hunter y col., 2001) en los experimentos con *T. gondii*. Ellos indicaron que la inhibición de la angiogenesis fue más rápida que un sistema inmune activado, y puede contribuir a la regresión del cáncer, al menos en *T. gondii* (Hunter y col., 2001). El presente trabajo corrobora este hallazgo (que al parecer se obtuvo en ambos laboratorios en paralelo) y aporta moléculas responsables de este efecto, confirniéndole al conocimiento actual que las *“infecciones de tumores con determinados microorganismos hacen que éstos sobreexpresen moléculas citotóxicas específicas para células tumorales y que éstas a su vez tienen capacidad antiangiogénica”*. Probablemente esta potencialidad la presenten los microorganismos anaeróbios que tienen la propiedad de proliferar en el núcleo de los tumores (Sznol y col., 2000). Este trabajo sugiere que las bacterias pueden secretar proteínas citotóxicas para células cancerígenas, de forma similar a muchos antibióticos que las bacterias producen para destruir otras bacterias u hongos. La proteína oxidoreductasa llamada azurin (proteína redox), parece ser secretada por bacterias para originar la muerte de células de mamíferos (Yamada y col., 2004; Punj y col., 2003a; Punj y col., 2003b; Punj y col., 2004). En el presente trabajo se evidenció que también las bacterias pueden sobreexpresar metaloproteasas para destruir células de mamíferos, con especial predilección para células proliferantes y que estas proteínas solubles pueden ser útiles para la terapia del cáncer, independientemente de su origen histológico. Probablemente esto se deba a que la región C-terminal tenga la capacidad de unirse a más de un receptor relacionado con la proliferación celular y que en las células tumorales estén sobreexpresados para garantizar su capacidad de crecer inexorablemente. Esto deberá ser de gran interés para bacteriólogos y microbiólogos en general, para explorar por qué las bacterias secretan proteínas redox (Chakrabarty, 2003) o metaloproteasas para originar la muerte de células de mamíferos.

El desarrollo de mejores métodos para evaluar y acceder a la diversidad microbiana deberá indudablemente proporcionar un suministro continuado de nuevas cepas microbianas que pueden incorporarse en los programas modernos de descubrimiento de drogas anticancerígenas. En este contexto, nuestro procedimiento (Abrahantes-Pérez y col. 1996), que permanece prácticamente inexplorado, representa un recurso particularmente prometedor. Este método podría convertirse en una herramienta rutinaria de trabajo para dirigir la producción de moléculas antitumorales de manera específica. El mismo revierte vital importancia en la obtención de productos naturales y las estructuras que de ellos se derivan, en el actual y futuro terapéutico del cáncer

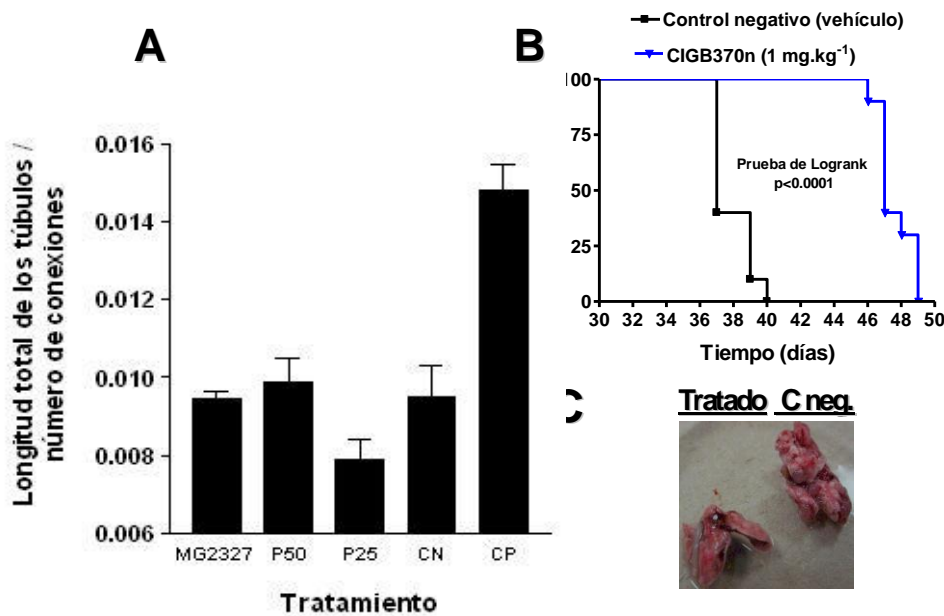


Figura 3. Actividad del polipéptido CIGB370 natural (P25). (A) Efecto de MG2327, P25 y P50 sobre la diferenciación de células endoteliales en matrigel. Las células HMEC se cultivaron en condiciones de activación (10 ng.mL^{-1} EGF, $1 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de hidrocortisona) en presencia de concentraciones similares de MG2327, P50 y P25, en ausencia de tratamiento (CP) y sin activar (CN). En el gráfico se agrupan los resultados de tres experimentos independientes. Las barras representan la DEM, ($n=3$). (B) El CIGB370n incrementó significativamente ($p<0.0001$) la supervivencia de los animales portadores del tumor TC-1. (C) El CIGB370n inhibe la formación de metástasis espontánea de pulmón de Lewis.

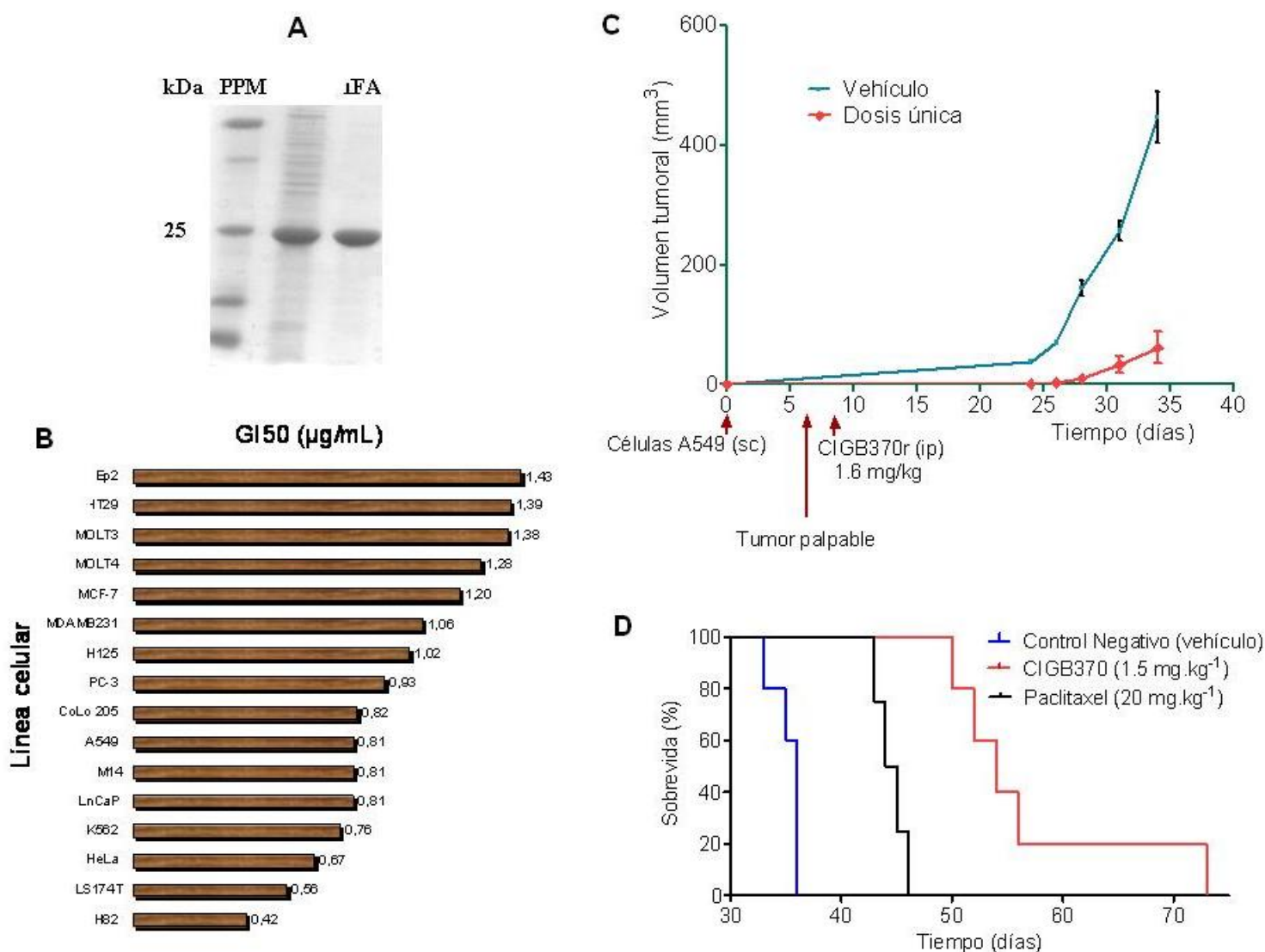


Figura 4. Actividad antitumoral del polipéptido CIGB370 obtenido por vía recombinante. A) Purificación del CIGB370r con más de 95% de pureza. IFA: Ingrediente farmacéutico activo. B) Amplio espectro de actividad antiproliferativa. C) Actividad antitumoral en el modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas A549, en ratones atímicos. D) Sobrevida del CIGB370r comparada con paclitaxel.

Bibliografía

- Abrahantes-Pérez MC, Reyes J, Veliz G y col., (1996) "Method for obtaining microorganisms capable of producing antitumor molecules". *Patente* WO 98/14566.
- Abrahantes-Pérez MC, Reyes J, Veliz G y col., (2006a). "Cytotoxic proteins combined with prodigiosin have both broad and selective cytotoxic activity on tumor cells". *Journal of Chemotherapy*. 18:172-81.
- Abrahantes-Pérez MC, Reyes J, Veliz G y col., (2006b) "Pharmaceutical composition containing serralisine polipeptides fragments". *Patente* WO 2006/005268.

- Braunagel SC, y Benedik MJ (1990) "The metalloprotease gene of *Serratia marcescens* strain SM6". *Mol. Gen. Genet.* **222**:446-451.
- Budagov RS, y Ulianova LP (2001) "Effect of microbial derived agents on the level of blood cytokines, hematological status and survival of mice following combined radiation injury". *Radiats Biol Radioecol.* **41**:38-42.
- Chakrabarty, A.M. (2003) "Microorganisms and cancer: quest for a therapy". *J Bacteriol.*, **185**:2683-2686. Review.
- Chou T (2005) "Multiple myeloma--recent advances in diagnosis and treatment". *Gan To Kagaku Ryoho.* **32**:304-8. Review.
- Coley WB (1991) "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations o erysipelas with a report of ten original cases": 1893 classical article. *Clin. Orthopaedics Related Res.* **262**: 3-12.
- Crum R, Szabo S, Folkman J. (1985) "A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment". *Science.* **230**:1375-8.
- Dang LH, Bettgowda C, Huso DL y col., (2001) "Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors". *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:15155-15160.
- Folkman J (2003) "Angiogenesis and apoptosis". *Semin Cancer Biol.* **13**:159-67. Review.
- Fontirrochi G, Dueñas M, Fernández de Cossio ME, y col., (1993) "A mouse hybridoma cell line secreting IgG and IgM antibodies with specificity for the Hepatitis B virus surface antigen". *Biotechnol Aplic.* **10**: 24-30.
- Forteza F (2004) "Cuba y Estados Unidos cooperan contra el cancer". *Avances médicos de Cuba.* **40**:33.
- Gasparini G, Longo R, Fanelli M, y col., (2005) "Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions". *J Clin Oncol.* **23**:1295-311. Review.
- Goto M, Yamada T, Kimbara K, y col., (2003) "Induction of apoptosis in macrophages by *Pseudomonas aeruginosa* azurin: tumour-suppressor protein p53 and reactive oxygen species, but not redox activity, as critical elements in cytotoxicity". *Mol Microbiol* **47**:549-59.
- Hardy E, Santana H, Sosa A, y col., (1996) "Recovery of biologically Active proteins detected with Imidazole-Sodium Dodecyl sulfate-Zinc (reverse stain on sodium dodecil sulfate ges". *Analytical biochemistry* **240**: 150-152.
- Hardy E, y Castellanos-Serra LR (2004) "Reverse-staining" of biomolecules in electrophoresis gels: analytical and micropreparative applications. *Anal Biochem.* **328**:1-13. Review.
- Hunter CA, Yu D, Gee M, y col., (2001) "Cutting edge: systemic inhibition of angiogenesis underlies resistance to tumors during acute toxoplasmosis". *J Immunol.* **166**:5878-5881.
- Li Y, Wang MN, Li H, y col., (2002) "Active Immunization Against the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor flk1 Inhibits Tumor Angiogenesis and Metastasis". *J. Exp. Med.* **195**: 1575-1584.
- Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, y col., (1996) "Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen". *Cancer Research.* **56**:21-26.
- Maeda H, Molla A, Sakamoto K, y col., (1989) "Cytotoxicity of bacterial proteases in various tumor cells mediated through alpha 2-macroglobulin receptor". *Cancer Res.* **49**:660-664.

- Monks A**, Scudiero D, Skehan P, y col., (1991) "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines". *J Natl Cancer Inst.* **83**:757-66.
- Montaner B**, Castillo-Avila W, Martinell M, y col., (2005) "DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin". *Toxicol Sci.* **85**:870-879.
- Montaner B**, Navarro S, Pique M, y col., (2000) "Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines". *Br J Pharmacol.* **131**:585-93.
- Montaner B**, y Pérez-Thomas R (2003) "The prodigiosins: a new family of anticancer drugs". *Curr Cancer Drug Targets.* **3**:57-65.
- Paglia P**, y Guzman CA (1998) "Keeping the immune system alerted against cancer". *Cancer Immunol. Immunother.* **46**:88-92.
- Pawelek JM**, Sodi S, Chakrabarty AK, y col., (2002) "*Salmonella* pathogenicity island-2 and anticancer activity in mice". *Cancer Gene Ther.* **10**:813-818.
- Perez-Tomas R** y Montaner B (2003) "Effects of the proapoptotic drug prodigiosin on cell cycle-related proteins in Jurkat T cells". *Histol. Histopathol.* **18**: 379-385.
- Punj V**, Bhattacharyya S, Saint-Dic D, y col., (2004) "Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer". *Oncogene.* **23**:2367-78.
- Punj V**, Das Gupta TK, y Chakrabarty AM. (2003a) "Bacterial cupredoxin azurin and its interactions with the tumor suppressor protein p53". *Biochem Biophys Res Commun.* **312**:109-14. Review.
- Punj V**, y Chakrabarty AM (2003b) "Microreview Redox proteins in mammalian cell death: an evolutionarily conserved function in mitochondria and prokaryotes". *Cellular Cell Microbiol* **5**: 225-231.
- Reyes J**, Abrahantes-Pérez MC y col., (1998) "Ultrastructural study on the effect of a new compound with antitumor activity potentially on tumor cell lines". *Electron Microscopy.* **4**: 886.
- Sanger F**, Coulson AR (1975) "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase". *J Mol Biol.* **94**:441-448.
- Sanz L**, Pascual M, Munoz A, y col., (2002) "Development of a computer-assisted high-throughput screening platform for anti-angiogenic testing". *Microvasc Res.* **63**:335-339.
- Shaik MS**, Chatterjee A, Jackson T y col., (2006) "Enhancement of antitumor activity of docetaxel by celecoxib in lung tumors". *Int. J. Cancer.* **118**: 396-404.
- Skehan P**, Storeng R, Scudiero D, y col., (1990) "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
- Sznol M**, Lin SL, Bermudes D, y col., (2000) "Use of preferentially-replicating bacteria for the treatment of cancer". *J. Clin. Investig.* **105**:1027-1030.
- Vacca A**, Iurlaro M, Ribatti D, y col., (1999b) "Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine". *Blood.* **94**:4143-55.
- Viñas M**, Vinuesa T y Abrahantes-Pérez MC (2007) "*Serratia marcescens*: from Miracles to Cancer Treatment". In *Hot Spots in Applied Microbiology. Research Signpost 37/661* (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India. 145-159 ISBN: 81-308-0144-2.
- Wu Jun**, Akaike T, Hayashida K, y col., (2001) "Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxy nitrite and matrix metalloproteinase". *Jpn. J. Cancer Res.* **92**:439-451.

- Yamada T, Goto M, Punj V, y col., (2002a)** “Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer”. *Natl. Acad. Sci. USA* **99**:14098-14103.
- Yamada T, Hiraoka Y, Das Gupta TK, y col., (2004)** “Regulation of mammalian cell growth and death by bacterial redox proteins: relevance to ecology and cancer therapy”. *Cell Cycle*. **3**:752-5.
- Yamori T, Sato S, Chikazawa H y col., (1997)** “Anti-tumor Efficacy of Paclitaxel against Human Lung Cancer Xenografts”. *J. Cancer Res.* **88**, 1205-1210.
- Zhang J, Demirci H, Shields CL, y col., (2005)** “Cavitary melanoma of ciliary body simulating a cyst”. *Arch Ophthalmol.* **123**:569-71. Review.