

Nuevo activador de AMPK como agente antitumoral en cáncer de próstata

Alicia Bort^{1,a}, Belén Sánchez-Gómez^{1,b}, Pedro Mateos-Gómez^{1,c}, Ana Castro^{2,d},
Nieves Rodríguez-Henche^{1,e}, Inés Díaz-Laviada^{1,f}

1. Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá. 28871, Alcalá de Henares, E-28871, Madrid, España. 2. Instituto de Química Médica (IQM-CSIC), Juan de la Cierva 3, E-28006, Madrid, España.

a. aliciabort@gmail.com b. belensg.88@gmail.com c. pedroantonio.mateos@uah.es d. acastro@1qm.csic.es
e. nieves.rhenche@uah.es f. ines.laviada@uah.es

Palabras clave: AMPK; diana terapéutica; derivados de oxindol, cáncer de próstata

Resumen

La quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) es una serín-treonín quinasa formada por tres subunidades, una catalítica (α) y dos reguladoras (β y γ), que actúa como sensor de la energía celular inhibiendo procesos anabólicos y activando procesos catabólicos. Recientemente se ha observado que además ejerce otras funciones como el bloqueo del ciclo celular o la regulación de la autofagia. Por ello se ha convertido en un objetivo terapéutico para el tratamiento del cáncer. AMPK tiene especial importancia en cáncer de próstata, ya que la activación de la vía lipogénica se correlaciona con la progresión y la agresividad del tumor. El objetivo de este trabajo ha sido valorar el efecto de una nueva serie de derivados de 2-oxindol con sobre la actividad de AMPK, así como su perfil antitumoral en células de cáncer de próstata. Uno de los compuestos estudiados **8c**, activó significativamente AMPK en células de cáncer de próstata PC-3, DU145 y LNCaP, inhibiendo a la vez su viabilidad celular. El compuesto **8c** redujo notablemente el crecimiento de tumores de células PC3 trasplantados en ratones. En conclusión, nuestros resultados muestran que un nuevo derivado fluorado del 2-oxindol presenta un efecto antitumoral *in vivo* en células de cáncer de próstata a través de la activación de AMPK, dándonos una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del cáncer de próstata andrógeno-independiente.

Cita: Bort, Alicia; Sánchez-Gómez, Belén; Mateos-Gómez, Pedro; Castro, Ana; Rodríguez-Henche, Nieves; Díaz-Laviada, Inés (2018) Nuevo activador de AMPK como agente antitumoral en cáncer de próstata. *dianas* 7 (1): e201803a11fp. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e201803a11fp.
URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: ©2018 Bort A, Sánchez-Gómez B, Mateos-Gómez P, Castro A, Rodríguez-Henche N, Díaz-Laviada I. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

La próstata es la glándula del órgano reproductor masculino, situado debajo de la vejiga, rodeando a la primera porción de la uretra. Su función es segregar un líquido ligeramente alcalino con gran variedad de sustancias que forma parte del semen, protegiendo los espermatozoides y neutralizando el PH de la vagina (1). La próstata está dividida en dos zonas, la fibromuscular anterior y otra glandular, la cual se divide en tres zonas, central, de transición y periférica. En la zona de transición es donde se origina la Hiperplasia Benigna de Próstata (BPH), mientras que en la zona periférica, es donde se desarrolla principalmente el cáncer de próstata.

Histológicamente está formada por dos tejidos: estroma y epitelio. El epitelio está compuesto por las células luminales, más cercanas a la luz de la glándula, y son las que secretan antígeno prostático específico PSA, que se utiliza de marcador tumoral en el diagnóstico del cáncer de próstata. El estroma está compuesto por células del musculo liso y fibroblastos (1).

Se distinguen varios estados patológicos relacionados con procesos inflamatorios y alteraciones del crecimiento como, la BPH, que es un crecimiento crónico, no maligno. Por otro lado se han empezado a considerar los estados inflamatorios los causantes de estados premalignos en la próstata, que pueden desencadenar en el desarrollo de un tumor. Se diferencian dos estados: la atrofia proliferativa inflamatoria (PIA) y la neoplasia intraepitelial prostrática (PIN) (2).

El cáncer de próstata o adenocarcinoma prostático en el 95% de los casos de origen epitelial, suponiendo la segunda causa de muerte por cáncer en el varón después del de pulmón, siendo el 75% de los varones diagnosticados después de los 65 años, El creciente conocimiento sobre el origen y la progresión de los tumores ha permitido sugerir nuevas características del cáncer, que pueden estar involucradas en la patogénesis de algunos tipos de esta enfermedad. Uno de ellos implica la capacidad de modificar, o reprogramar el metabolismo celular, con el fin de soportar altas tasas de crecimiento y requerimiento de energía, que son esenciales para el crecimiento y progresión tumoral sostenida (3, 4, 5).

En particular, una característica distintiva del cáncer de próstata es el aumento de la síntesis de ácidos grasos y colesterol *de novo* que se correlaciona con la progresión tumoral y un peor pronóstico (6, 9, 7). Por lo tanto, el estudio de reguladores moleculares asociados o mediante bloqueo de genes lipogénicos, puede ser una buena estrategia mediante la cual, las propiedades de las células de cáncer de próstata pueden explotarse para obtener mejoras terapéuticas.

En este contexto y considerando el papel de la proteína activada por AMP (AMPK) como un sensor del estado de energía celular, la modulación de AMPK aparece como un camino prometedor para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y el tratamiento del cáncer (9, 10, 11). AMPK es una serín/treonín quinasa heterotimérica, compuesta por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ . Esta proteína funciona como sensor energético de la célula activando rutas catabólicas y por consiguiente la producción de ATP e inhibiendo rutas anabólicas y por consiguiente disminuyendo el consumo de ATP. Sin embargo, el papel de AMPK en el cáncer de próstata sigue siendo controvertido, ya que investigaciones recientes sugieren que AMPK puede ejercer funciones tumorales o antitumorales en el cáncer según el contexto (12). Varios estudios han demostrado que la activación de AMPK por metformina, MT63-78 o LKB1 suprime la viabilidad de las células de cáncer de próstata y reduce sus propiedades metastásicas (13, 14, 15). Los autores demuestran que la supresión de la lipogénesis *de novo* es el mecanismo subyacente responsable de la inhibición del crecimiento del cáncer de próstata mediado por AMPK (14). Además, el bloqueo de la síntesis de ácidos grasos mediante la inhibición de la esteroil-CoA desaturasa (SCD) (16) o la ácido graso sintasa (17) suprime la supervivencia de las células prostáticas. Del mismo modo, la expresión y la actividad de LKB1 también se ha relacionado inversamente con la proliferación y la supervivencia del cáncer de próstata y las células de cáncer de próstata (18, 19).

Hasta ahora, muchos esfuerzos de la Industria y la Academia se han centrado en buscar nuevos agentes que modulen AMPK directa o indirectamente. Desde la perspectiva del programa de descubrimiento de fármacos, los estudios cristalográficos de complejos heterotriméricos de AMPK han proporcionado importantes conocimientos relacionados con los mecanismos reguladores y también sobre el potencial modo de unión de los moduladores de AMPK (20, 21). En este contexto, A-769662, uno de los activadores de AMPK mejor caracterizado, o el indol, PF-06409577 (3), reportado recientemente por Pfizer para el tratamiento de la nefropatía diabética, aparecen como algunos ejemplos representativos (22).

En este trabajo se han sintetizado nuevos compuestos derivados del 2-oxindol evaluando su actividad antitumoral en células de próstata y su capacidad para activar AMPK.

Materiales y Metodos

Reactivos químicos usados

Los compuestos químicos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por el Instituto de Química Médica (IQM-CSIC) (23).

Cultivo de células

Se adquirieron células epiteliales humanas RWPE-1 y de cáncer de próstata humano PC3, DU145 y LNCaP de American Type Culture Collection (ATCC CRL-1435 CRL-1740 y CRL 11609 respectivamente) (Rockville, MD, EE.UU.). La línea celular PNT2 normal de próstata humana se adquirió en ECACC (European Collection of Cell cultures, Salisbury, SP4 0JG, Reino Unido). Las células se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640 suplementado con 100 UI / ml de penicilina G sódica, 100 μg / ml de sulfato de estreptomycin, 0,25 μg / ml de anfotericina B (Invitrogen, Paisley, RU) y suero de ternera fetal al 10%. Las células se usaron en pasajes entre 10-20. Para los experimentos de tratamiento, las células se sembraron en placa y se cultivaron durante la noche, el medio se reemplazó con RPMI 1640 libre de suero durante 24 horas y luego se incubó con diferentes dosis de los compuestos durante los tiempos indicados.

Viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el método del bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich). En resumen, se sembró un total de 5000 células / pocillo en una placa de 12 pocillos en un volumen final de 1 ml. Después de los tratamientos, se añadieron 20 μl de solución MTT (5 mg / ml en PBS) al medio y las células se incubaron a 37 ° C durante 4 h. Luego, se descartó el sobrenadante y se añadió isopropanol para disolver los cristales de formazano. Los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado. La densidad óptica en cada pocillo se evaluó midiendo la absorbancia a 490 y 650 nm usando un lector de microplacas (ELX 800 Bio-Tek Instruments, INC). Los valores de IC50 se calcularon usando GraphPad Prism frente a 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). La viabilidad celular también se determinó contando células viables y muertas mediante

tinción con azul tripán. Se contaron las células negativas y positivas de Trypan azul usando un contador celular automatizado Countess TM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los resultados se expresaron en relación con el número total de células contadas.

Western Blot

Las células se lisaron en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 0,8 M, MgCl₂ 5 mM, Triton X - 100 al 0,1%) que contenían inhibidores de la proteasa y cócteles inhibidores de la fosfatasa (Roche, Basilea, Suiza). Las concentraciones de proteína se midieron mediante el ensayo de proteínas BioRad™ (Richmond, CA, EE. UU.). Se separó una cantidad igual de proteína (20 µg) de cada muestra en geles de SDS-PAGE al 8% y se transfirió a membranas de PVDF (BioRad). Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo (1 × TBS, 0,1% de Tween 20 con 5% p / v de leche descremada sin grasa), se lavaron e incubaron con anticuerpos primarios a 4 ° C durante 12 h. Las membranas se lavaron posteriormente con TBS-T (1 × TBS y 0,1% de Tween 20) y se incubaron con anticuerpos IgG anti-ratón o anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma, St Louis, MO, EE. UU.) A temperatura ambiente durante 1 h. El complejo inmune se visualizó con un sistema ECL (Cell Signaling Technology). Las películas se analizaron por densitometría. El anti-pAMPK α 1-thr172, pACC-ser79, pRaptor y los anticuerpos contra las formas totales correspondientes se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.).

Silenciamiento de AMPK α 1 AMPK α 2

Para silenciar las subunidades AMPK α 1 y α 2, las células LNCaP y PC3 se transfectaron con 5 nM de siRNAs interferentes selectivos para las subunidades de AMPK α 1 o α 2 y un control negativo siRNA (Ambion-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando lipofectamina RNAi Max (Life Technologies, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El control del silenciamiento de las proteínas se llevó a cabo mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos de AMPK α 1 y AMPK α 2 (nº 2795 y nº 2757, respectivamente, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.).

Experimentación Animal

Los experimentos *in vivo* se realizaron de acuerdo con la Directiva de la UE 2010/63 / UE y las directrices institucionales definidas por el Comité Ético de Investigación Animal Experimental Institucional de la Universidad de Alcalá y en cumplimiento de la legislación actual española (Real Decreto 53/2013). Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Comunidad de Madrid (Ref. PROEX241 / 15).

Se usaron ratones Nude-Foxn1 (nu / nu) desnudos e inmunodeficientes (Envigo RMS, Barcelona, España), de 4 a 6 semanas de edad, para todos los estudios de xenoinjerto. Los ratones se alojaron en condiciones libres de patógenos específicos en un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas a 21-23 ° C y 40-60% de humedad con acceso a pellets de alimento y agua a voluntad. Los tumores se indujeron mediante inyección de flanco sc de 5 x 10⁶ (100 µL) de células PC-3 en PBS + BSA al 0,5%. Cuando los tumores fueron palpables, los animales se asignaron aleatoriamente a dos grupos (n = 8) y se les inyectó por vía subcutánea el compuesto **8c** (5 mg / kg / d, que teniendo en cuenta un peso promedio de 28 g corresponde a 128 µM) o vehículo (5% de etanol en PBS) durante 15 días. Los tumores se midieron con calibradores externos y el volumen se calculó mediante la fórmula elipsoidal modificada como volumen = longitud × (anchura)² × 0,52 mm³(24, 25).

Al final del estudio, los ratones se sacrificaron colocándolos en una cámara de CO₂ y los tumores extirpados se recuperaron y se homogeneizaron en tampón de lisis para la cuantificación de proteínas y la transferencia de Western.

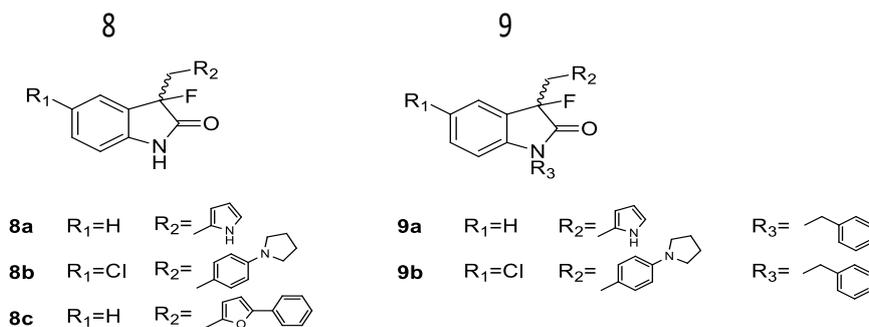
Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguida de la diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) o la prueba de comparación múltiple de Tukey, usando el intervalo de confianza del 95%. Cuando se indicó, la prueba t de Student se realizó para comparar la activación de AMPK entre los grupos tratados con **8c** y los grupos de control. La estadística se realizó con Microsoft Office Excel 2013. Los niveles de significación se definieron como P <0.05 (*, #) y P <0.01 (**, ##). Todos los gráficos fueron dibujados usando el software de Origin.

Resultados

Química

Los derivados de 2-oxindol utilizados en los siguientes ensayos se muestran en la Fig. 1



Reagents and conditions: (a) R₂-CHO (1 eq.), MeOH, reflux, 3 h, 37 – 64 %; (b) NaBH₄ (5 eq.), MeOH, rt, 8 h, 27 – 50 %; (c) Selectfluor (2 eq.), MeOH, 0 °C, 7 h, 18 – 53 %. (d) For R₃ = Bn: BnBr (1 eq.), NaH (1.1 eq.), DMF anh., 0 °C, rt, 15 min., 15 – 47 %.

Figura 1. Derivados de 2-oxindol sintetizados.

Evaluación de la actividad de AMPK en células de cáncer de próstata

Para investigar el efecto de los compuestos sobre la actividad de AMPK a nivel celular, los compuestos **8a-c** y **9a-b** se seleccionaron para realizar ensayos de fosforilación de AMPK en líneas celulares de cáncer de próstata humano. Usamos las líneas celulares PC-3, DU145 y LNCaP.

Encontramos que los compuestos **8a**, **9a** y **8b** inhibieron ligeramente, aunque significativamente, la fosforilación de AMPK en comparación con los controles y el compuesto **9b** produjo una débil activación de AMPK. En contraste, el compuesto **8c** causó un aumento significativo en la fosforilación de Thr172 de AMPK en comparación con las células control Fig. 2

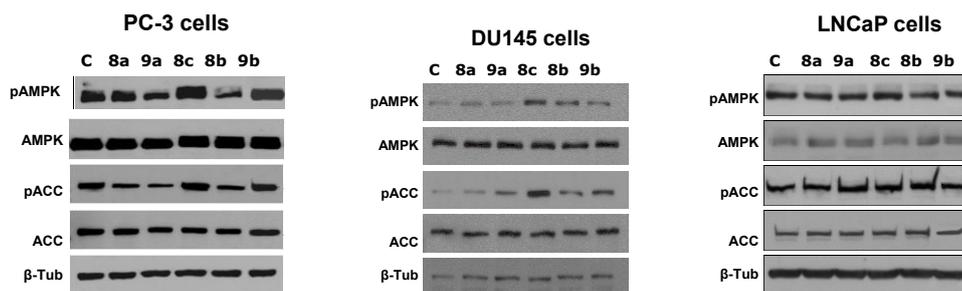


Figura 2. Efecto de los derivados fluorados de 2-oxindol en la actividad de AMPK en células de cáncer de próstata. (A) Las células PC-3, DU145 y LNCaP se trataron con 25 μ M de los derivados de 2-oxindol fluorados seleccionados durante 1 hora. Los niveles de la AMPK fosforilada (pAMPK), la ACC fosforilada (pACC) y sus formas totales se determinaron mediante transferencia de Western. Panel superior, una transferencia Western representativa de tres experimentos diferentes. β -tubulina (β -Tub) sirve como control de carga.

Efecto de los derivados fluorados de 2-oxindol en la proliferación de células de cáncer de próstata

Continuamos estudiando el efecto de los compuestos sobre la capacidad proliferativa en las células de próstata PC-3, DU145 y LNCaP. También utilizamos las líneas celulares de próstata PTN2 y RWPE-1 que derivan de un adulto histológicamente normal y, por lo tanto, se consideran células de próstata normales. Todos los compuestos se probaron a concentraciones que varían de 1 a 100 μ M. Se encontró que los compuestos **9a** y **8c** inhibían eficazmente la proliferación celular en el intervalo de 1-100 μ M de una manera dosis dependiente en las cinco líneas celulares, aunque el compuesto **8c** presenta un claro efecto antiproliferativo, con mayor eficacia y potencia en las líneas de cáncer LNCaP, DU145 y PC-3 en comparación con las células normales (Fig. 3).

De hecho, la mayor potencia de este compuesto **8c** se observa en las células PC-3 resistentes a andrógenos, que representan la forma más agresiva de cáncer de próstata. Los valores de CI50 para el compuesto **8c** fueron 18 μ M, 19 μ M, 30 μ M, 65 μ M y > 1000 μ M en células PC-3, DU145, LNCaP, PNT2 y RWPE-1, respectivamente.

Estos datos indican que el mayor efecto inhibitor se correlaciona con la mayor activación de AMPK en células de cáncer de próstata y nos llevó a continuar el estudio con el compuesto **8c**, que se selecciona para estudios posteriores.

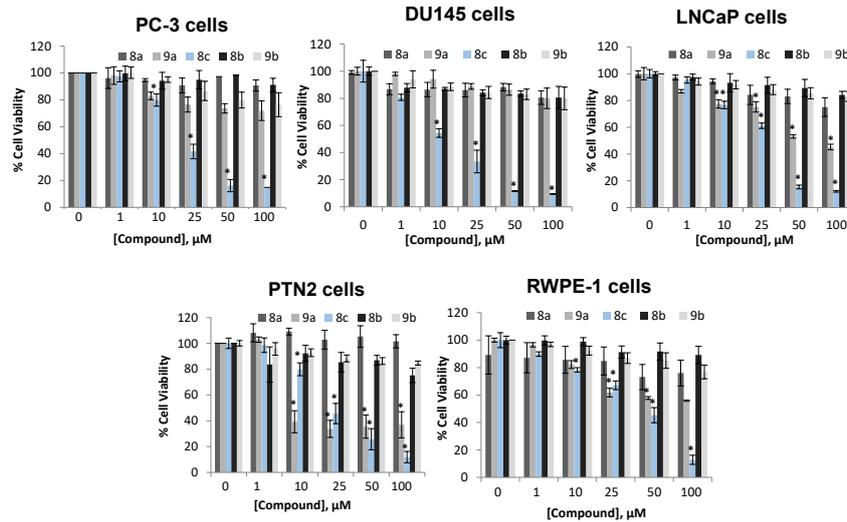


Figura 3. Comparación del efecto de los derivados fluorados de 2-oxindol en la proliferación de células de cáncer de próstata humano. Se trataron células de próstata normal (PTN2 y RWPE-1) y de cáncer (PC3, DU145 y LNCaP) con diferentes dosis de los compuestos durante 24 horas y se controló la viabilidad celular mediante ensayo de MTT

Caracterización de la activación de AMPK por compuesto 8c

Para confirmar la activación de AMPK inducida por el compuesto 8c en las células, PC-3 y LNCaP se incubaron con el compuesto durante 1 hora y 24 horas en presencia del inhibidor de AMPK Dorsomorfin. Como se muestra en la Fig. 5A, la activación de AMPK por el compuesto 8c también se observó a las 24 horas, siendo incluso más robusta que a 1 hora de tratamiento. La dorsomorfin bloqueó la activación de AMPK por el compuesto 8c tanto a la hora como a la hora. Por consiguiente, la fosforilación de ACC aumentó a 1h y 24h y se evitó mediante Dorsomorfin en ambas líneas celulares.

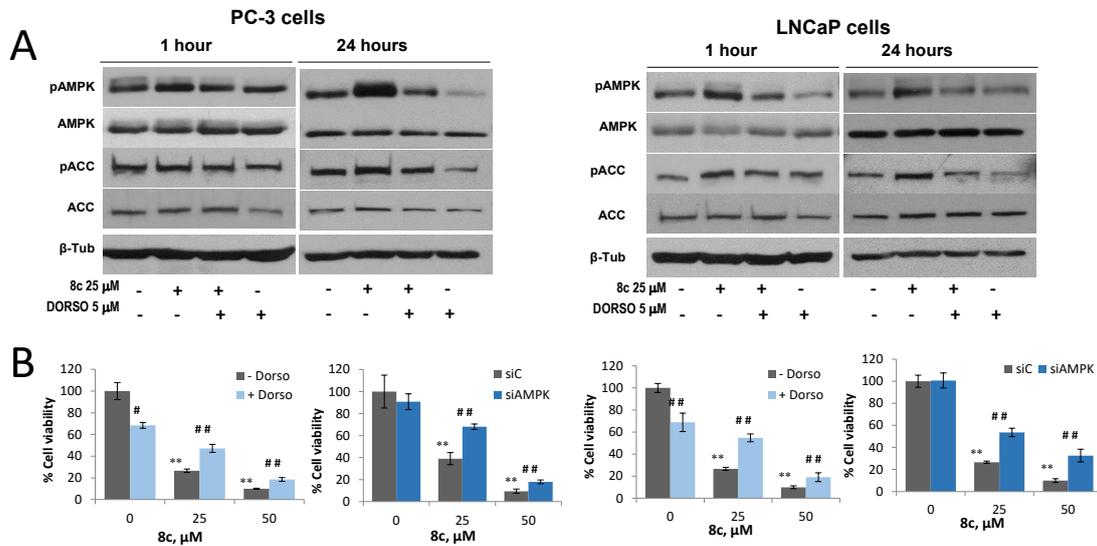


Figura 5. Activación de AMPK por el compuesto 8c en células de cáncer de próstata. (A) Las células PC-3 y LNCaP se trataron con vehículo, compuesto 8c de 25 μM + Dorsomorfin 5 μM (8c + D) o Dorsomorfin 5 μM (D), durante 1 hora o 24 horas y niveles del Se determinaron mediante Western blot la AMPK fosforilada (pAMPK), la ACC fosforilada (pACC), las formas de Raptor fosforiladas (pRaptor) y la HIF1α. Panel superior, Western blot representativo de tres experimentos diferentes. β-tubulina (β-Tub) sirve como control de carga. Panel inferior, análisis densitométrico de bandas representadas como la media de la relación pAMPK / AMPK o pACC / ACC. (B) Viabilidad celular monitorizada por ensayo de MTT en PC-3 y células LNCaP tratadas con vehículo, 25 μM y 50 μM de compuesto 8c solo o en presencia de 5 μM de Dorsomorfin o transfectadas con control siRNA (siC) o α1AMPK selectivo siRNA (siAMPK)

Para analizar si AMPK estaba implicado en el efecto antiproliferativo del compuesto 8c, se llevó a cabo la inhibición farmacológica de AMPK así como el silenciamiento de la proteína y se determinó la viabilidad celular. La Figura 5B muestra que la disminución de la viabilidad celular inducida por el compuesto 8c en las líneas celulares PC-3 y LNCaP, se redujo en células tratadas con el inhibidor de AMPK dorsomorfin. Del mismo modo, el silenciamiento de AMPK por siRNA específico previno la muerte

celular inducida por **8c**, apoyando aún más la participación de AMPK en el efecto antiproliferativo del compuesto **8c**.

AMPK es una proteína heterotrimérica compuesta por la subunidad catalítica (α) y las reguladoras (β y γ). En los mamíferos, las diferentes isoformas de las subunidades α , β y γ pueden asociarse para producir hasta 12 combinaciones AMPK diferentes (26). Merece la pena señalar que la forma más abundante de la subunidad α de AMPK presente en las células PC-3 es $\alpha 1$ (los complejos que contienen AMPK $\alpha 1$ son al menos 10 veces más abundantes que AMPK $\alpha 2$) (27). Para obtener información sobre el mecanismo subyacente de la activación de AMPK por el compuesto **8c** en células de próstata, silenciamos selectivamente AMPK $\alpha 1$ o AMPK $\alpha 2$ en células de cáncer de próstata. Observamos que cuando se silenció la subunidad AMPK $\alpha 1$, la fosforilación de AMPK inducida por **8c** se bloqueaba casi totalmente, y la fosforilación de ACC disminuía notablemente (figura 6). Por el contrario, cuando se silenció la expresión de la subunidad AMPK $\alpha 2$, el compuesto **8c** todavía fue capaz de fosforilar AMPK y ACC a un nivel similar al de las células no silenciadas (siC) (Fig. 6). Estos resultados sugieren que el compuesto **8c** necesita la subunidad $\alpha 1$ para ejercer su efecto y, por lo tanto, preferiblemente activa las isoformas AMPK que contienen la subunidad $\alpha 1$.

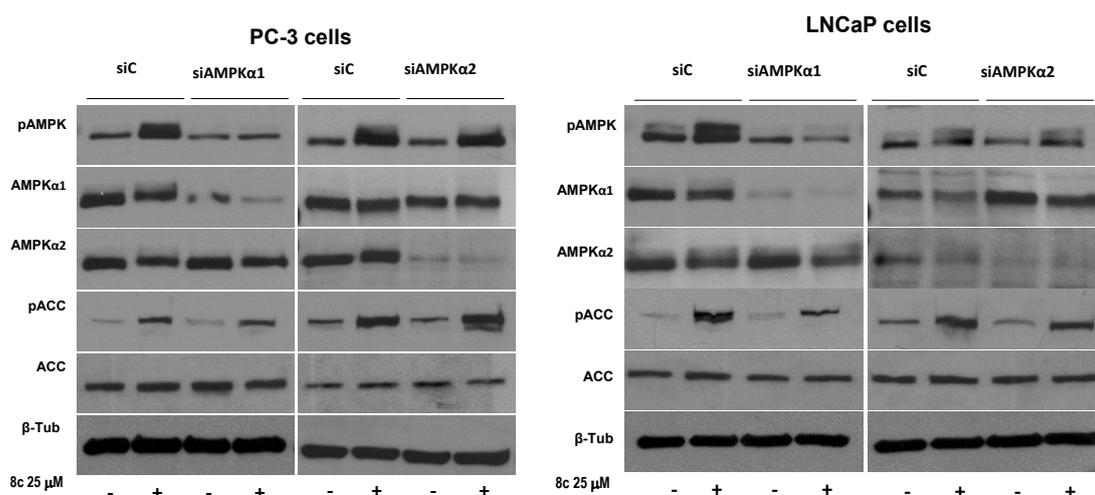


Figura 6. Fosforilación de AMPK y ACC en células de próstata transfectadas con ARNip de AMPK $\alpha 1$ o AMPK $\alpha 2$ selectivo. Las células PC-3 y LNCaP se transfectaron con ARNsi selectivo para las isoformas de la subunidad AMPK $\alpha 1$ o AMPK $\alpha 2$ y luego se trataron con vehículo o con el compuesto **8c** 25 μ M durante 1 h. Los niveles de la AMPK fosforilada (pAMPK), la ACC fosforilada (pACC) y sus formas totales se determinaron mediante transferencia de Western. Panel superior, una transferencia Western representativa de tres experimentos diferentes. β -tubulina (β -Tub) sirve como control de carga.

Inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral por el compuesto **8c**

Para validar el valor terapéutico del compuesto **8c** en el cáncer de próstata resistente a la castración, se empleó un modelo de xenotransplante murino. Debido al potente efecto del compuesto **8c** en la línea celular PC-3 y para evitar el desperdicio innecesario de animales de acuerdo con las directrices 3 Rs (reducción, reemplazo, refinamiento) para el uso de animales en investigación, solo usamos la línea celular PC-3 para los estudios *in vivo*. Se indujeron tumores PC-3 en ratones desnudos mediante inyección subcutánea de células en el flanco derecho del ratón. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 70 mm³, los ratones se trataron diariamente con 5 mg / kg del compuesto **8c**. En ratones tratados con vehículo, se observó un aumento en el volumen de crecimiento tumoral durante el curso del estudio y al final de la experimento (figura 7A). Sin embargo, el tratamiento con el compuesto **8c** redujo significativamente el crecimiento tumoral durante el período experimental de 15 días (Fig. 7A). El volumen del tumor al final del tratamiento fue notablemente más pequeño en animales tratados con **8c** que en controles (figura 7B). No se observó ningún efecto sobre el peso de los ratones o el bienestar de los animales en ratones tratados con compuesto **8c**. De acuerdo con nuestros resultados *in vitro*, el compuesto **8c** promovió la activación de AMPK, aumentó la fosforilación de ACC, en los tumores (Fig. 7C).

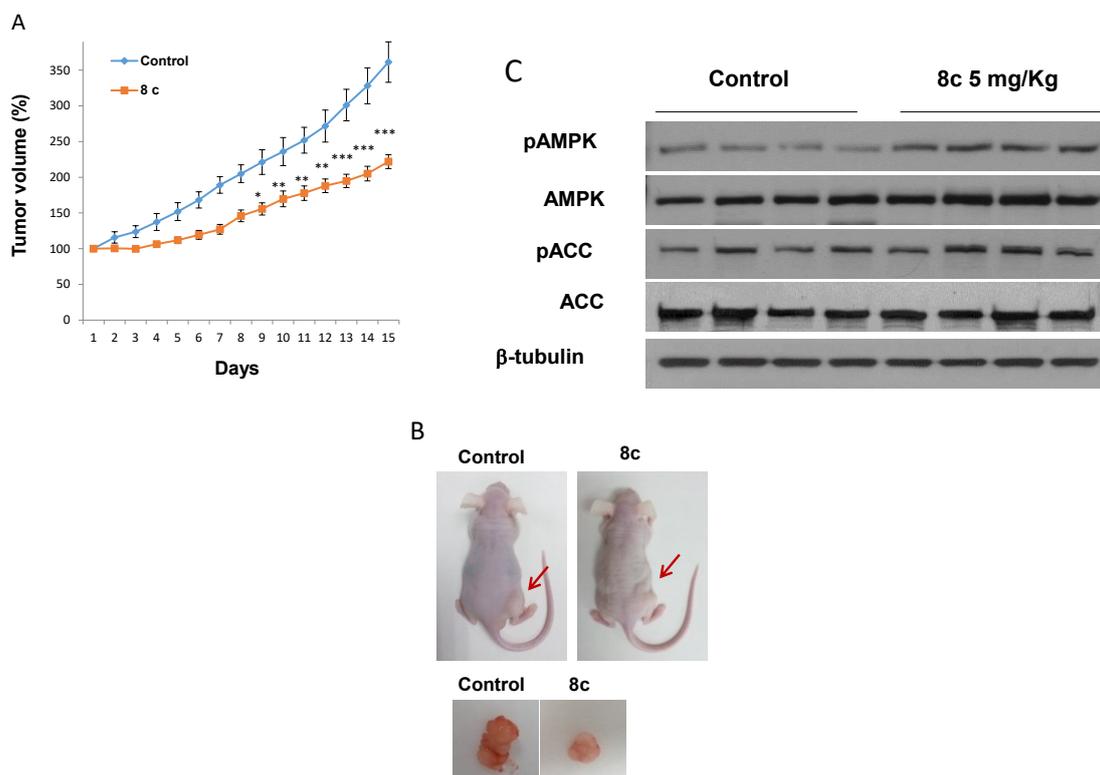


Figura 7. Inhibición del crecimiento del xenoinjerto de tumor de próstata *in vivo* por el compuesto **8c**. (A) Curvas de crecimiento de tumores de xenoinjerto PC-3 en ratones tratados diariamente con vehículo (Control), o 5 mg / kg de compuesto **8c**. Los resultados son la media (n = 8) \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01 y *** p <0.005 en comparación con los controles mediante la prueba de la t de Student. (B) Imágenes de ratones desnudos atímicos representativos que portan xenoinjertos de tumor de células PC-3 y los tumores disecados. (C) niveles de fosfo-AMPK y fosfo-ACC en 4 ratones controles representativos y 4 ratones representativos tratados con **8c**. β -tubulina sirve como control de carga.

Conclusiones

En este estudio hemos analizado la actividad de nuevos moduladores de AMPK y hemos seleccionado uno que presenta propiedades antitumorales potentes en las células de cáncer de próstata. Los ensayos de fosforilación en cultivos celulares muestran que los compuestos **8a**, **8b** y **9a** son inhibidores de AMPK. Sin embargo, los compuestos **8c** y **9b** presentan perfiles de activadores de AMPK. El compuesto **9b** aumenta ligeramente la fosforilación de AMPK en células PC-3 pero no en células LNCaP, mientras el compuesto **8c** es un potente activador *in vitro* e *in vivo* de AMPK y el mejor inhibidor del crecimiento de células prostáticas. Estos resultados sugieren que hemos identificado un nuevo activador de AMPK que exhibe propiedades antitumorales potentes contra las células de cáncer de próstata.

El fuerte efecto antiproliferativo observado del compuesto **8c** es dependiente de AMPK como lo sugiere la prevención con Dorsomorfina y el silenciamiento de AMPK. A pesar de que la Dorsomorfina puede ejercer efectos independientes inespecíficos de AMPK (28, 29, 30), en nuestro modelo, inhibe la activación de AMPK producida por el compuesto **8c** (figura 5B) y reduce la muerte celular producida por el compuesto **8c** y por la activación de AMPK, al menos en parte. Estos resultados fueron corroborados por el silenciamiento de AMPK, que bloqueó la muerte celular inducida por **8c**.

A nivel celular, el compuesto **8c** muestra un perfil adecuado como activador de AMPK. Este hecho nos llevó a investigar si **8c** estaba actuando sobre una isoforma de AMPK específica ya que las células de próstata expresan principalmente la isoforma $\alpha 1$. El silenciamiento selectivo de las isoformas alfa y los experimentos *in vitro* muestran que el compuesto **8c** actúa a través del complejo alfa 1.

Finalmente, la actividad antitumoral del compuesto **8c** fue secundada por la represión del crecimiento de tumores de xenotrasplantados *in vivo* a una dosis más baja que la utilizada previamente para activadores de AMPK en células de próstata (15). Además, en tumores tratados con **8c** se observó un aumento en la fosforilación de AMPK y fosforilación de ACC, demostrando que este compuesto puede activar AMPK también *in vivo*. En esta línea de resultados, Zadra et al. (15) demostraron que el nuevo activador directo de AMPK MT63-78 inhibía el crecimiento del tumor de próstata LNCaP *in vivo* y promovía la activación de AMPK en tumores de células PC-3.

En general, estos hallazgos sugieren que la AMPK actúa como un supresor tumoral en el cáncer de próstata y, por lo tanto, su activación podría ser una estrategia terapéutica bastante prometedora para luchar contra el cáncer de próstata resistente a la castración. Los resultados mostrados aquí indicaron que el compuesto **8c** es muy potente como activador de AMPK como inhibidor del crecimiento de tumores de próstata y, en consecuencia, es un candidato prometedor con valor terapéutico para el cáncer de próstata.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno (Beca n° Patrocinio 2013-001) para apoyo financiero en su investigación.

Bibliografía

1. Lee C.H., Akin-Olugbade O., Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 40(3):565-75, doi: 10.1016/j.ecl.2011.05.012. (2011)
2. De Marzo, A.M., Nakai, Y. & Nelson, W.G. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 25(5), pp.398–400, (2007)
3. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013> (2011).
4. Brooks Robey, R. et al. Metabolic reprogramming and dysregulated metabolism: Cause, consequence and/or enabler of environmental carcinogenesis? *Carcinogenesis* 36, S203–S231, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv037> (2015).
5. Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pages, M., Pestell, R. G., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature reviews. Clinical oncology*. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.60> (2016).
6. Butler, L. M., Centenera, M. M. & Swinnen, J. V. Androgen control of lipid metabolism in prostate cancer: novel insights and future applications. *Endocrine-related cancer*. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0556> (2016).
7. Zadra, G., Photopoulos, C. & Loda, M. The fat side of prostate cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 1518–1532, <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.03.010> (2013).
8. Wu, X., Daniels, G., Lee, P. & Monaco, M. E. Lipid metabolism in prostate cancer. *American journal of clinical and experimental urology* 2, 111–120 (2014).
9. Dandapani, M. & Hardie, D. G. AMPK: Opposing the metabolic changes in both tumour cells and inflammatory cells. *Biochemical Society Transactions* 41, 687–693, <https://doi.org/10.1042/bst20120351> (2013).
10. Salt, I. P. & Palmer, T. M. Exploiting the anti-inflammatory effects of AMP-activated protein kinase activation. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 21, 1155–1167, <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.696609> (2012).
11. Salminen, A., Hyttinen, J. M. T. & Kaamiranta, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: Impact on healthspan and lifespan. *Journal of Molecular Medicine* 89, 667–676, <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0748-0> (2011).
12. Popovics, P., Frigo, D. E., Schally, A. V. & Rick, F. G. Targeting the 5'-AMP-activated protein kinase and related metabolic pathways for the treatment of prostate cancer. *Expert opinion on therapeutic targets* 19, 617–632, <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1005603> (2015).
13. Babcook, M. A. et al. Synergistic simvastatin and metformin combination chemotherapy for osseous metastatic castration-resistant prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics* 13, 2288–2302, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0451> (2014).
14. Zadra, G. et al. A novel direct activator of AMPK inhibits prostate cancer growth by blocking lipogenesis. *EMBO molecular medicine* 6, 519–538, <https://doi.org/10.1002/emmm.201302734> (2014).
15. Grossi, V. et al. Loss of STK11 expression is an early event in prostate carcinogenesis and predicts therapeutic response to targeted therapy against MAPK/p38. *Autophagy* 11, 2102–2113, <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091910> (2015).
16. Peck, B. et al. Inhibition of fatty acid desaturation is detrimental to cancer cell survival in metabolically compromised environments. *Cancer & metabolism* 4, 6, <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0146-8> (2016).

17. Wen, S. et al. Targeting fatty acid synthase with ASC-J9 suppresses proliferation and invasion of prostate cancer cells. *Molecular carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1002/mc.22468> (2016).
18. Xu, P., Cai, F., Liu, X. & Guo, L. LKB1 suppresses proliferation and invasion of prostate cancer through hedgehog signaling pathway. *International journal of clinical and experimental pathology* 7, 8480–8488 (2014).
19. Lu, J., Sun, P., Sun, B. & Wang, C. Low LKB1 Expression Results in Unfavorable Prognosis in Prostate Cancer Patients. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 21, 3722–3727 (2015).
20. Miglianico, M., Nicolaes, G. A. F. & Neumann, D. Pharmacological Targeting of AMP-Activated Protein Kinase and Opportunities for Computer-Aided Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* 59, 2879–2893, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01201> (2016).
21. Rana, S., Blowers, E. C. & Natarajan, A. Small molecule adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase (AMPK) modulators and human diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* 58, 2–29, <https://doi.org/10.1021/jm401994c> (2015). www.nature.com/scientificreports/ | *Scientific Reports* | (2018) 8:4370 | DOI:10.1038/s41598-018-22690-2 17
22. Cameron, K. O. et al. Discovery and Preclinical Characterization of 6-Chloro-5-[4-(1-hydroxycyclobutyl)phenyl]-1H-indole-3-carboxylic Acid (PF-06409577), a Direct Activator of Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK), for the Potential Treatment of Diabetic Nephropathy. *Journal of Medicinal Chemistry* 59, 8068–8081, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00866> (2016).
23. Bort, A., Quesada, S., Ramos-Torres, A., Gargantilla, M., Priego, E. M., Raynal, S., Lepifre, F., Gasalla, J. M., Rodriguez-Hemche, N., Castro, A. & Diaz-Laviada, I. Identification of a novel 2-oxindole fluorinated derivative as *in vivo* antitumor agent for prostate cancer acting via AMPK activation. *Scientific Reports* 8, 4370, doi:10.1038/s41598-018-22690-2 (2018)
24. Faustino-Rocha, A. et al. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Anim (NY)* 42, 217–224, <https://doi.org/10.1038/labam.254> (2013).
25. Jensen, M. M., Jorgensen, J. T., Binderup, T. & Kjaer, A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Med Imaging* 8, 16, <https://doi.org/10.1186/1471-2342-8-16> (2008).
26. Ross, F. A., MacKintosh, C. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 favours. *The FEBS journal* 283, 2987–3001, <https://doi.org/10.1111/febs.13698> (2016).
27. Laderoute, K. R., Calaoagan, J. M., Madrid, P. B., Klon, A. E. & Ehrlich, P. J. SU11248 (sunitinib) directly inhibits the activity of mammalian 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cancer Biology and Therapy* 10, 68–75 (2010).
28. Lee, Y., Park, B. H. & Bae, E. J. Compound C inhibits macrophage chemotaxis through an AMPK-independent mechanism. *Biochemical and biophysical research communications* 469, 515–520, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.015> (2016).
29. Oosterman, J. E. & Belsham, D. D. Glucose Alters Per2 Rhythmicity Independent of AMPK, Whereas AMPK Inhibitor Compound C Causes Profound Repression of Clock Genes and AgRP in mHypoE-37 Hypothalamic Neurons. *PLoS One* 11, e0146969, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146969> (2016).
30. Liu, X., Chhipa, R. R., Nakano, I. & Dasgupta, B. The AMPK inhibitor compound C is a potent AMPK-independent antiglioma agent. *Molecular cancer therapeutics* 13, 596–605, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0579> (2014).