



Universidad de Navarra

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Facultad de Farmacia

*Diseño, síntesis y evaluación biológica de
nuevos carbamatos selenados con actividades
antioxidante, citotóxica y antiproliferativa*

Beatriz Romano Álvarez



Universidad de Navarra

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica
Facultad de Farmacia

*Diseño, síntesis y evaluación biológica de
nuevos carbamatos selenados con actividades
antioxidante, citotóxica y antiproliferativa*

Memoria presentada por Dña. Beatriz Romano Álvarez para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica y autorizamos su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, Diciembre 2014

Dra. Carmen Sanmartín Grijalba

Dr. Juan Antonio Palop Cubillo

“Of course, now that we know the answer, it seems so completely obvious that no-one nowadays remembers just how puzzling the problem seemed then”

(Por supuesto, ahora que conocemos la respuesta, parece tan obvio que nadie en estos días recuerda qué complicado parecía el problema entonces)

Francis Crick.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todos los que me habéis acompañado en el camino que lleva a la entrega de este manuscrito. Sin vuestra ayuda y apoyo esta tesis no habría sido posible. Esta tesis es multidisciplinar y multicéntrica, por lo que he dividido los agradecimientos por Universidades y grupos, en función del tiempo que he pasado en cada uno de ellos. Mi sincera gratitud hacia todas las instituciones y personas que han colaborado con mi aprendizaje.

Gracias a la Universidad de Navarra, en especial a las facultades de Ciencias y Farmacia por la completa formación que he recibido. Quiero agradecer a la Asociación de Amigos y a Alumni, que creyeron en mí desde antes incluso de llegar a Pamplona y me han ayudado a formar parte de esta Universidad.

Gracias a mis directores de tesis, la Dra. Carmen Sanmartín y el Dr. Juan Antonio Palop por estar siempre disponibles, confiar en mí y formarme como investigadora. Gracias por transmitirme magistralmente los conocimientos de Química Orgánica y las ganas de que esta disciplina se convierta en el eje de mi profesión. Gracias por animarme a mirar más allá y abrir tanto las puertas del conocimiento como las barreras geográficas.

Gracias a Carmen Elizalde por todo lo que me has enseñado y ayudado cada día. Gracias por el soporte técnico, los pedidos para enfermería, los análisis, los puntos de fusión y la organización, entre otras muchas pequeñas cosas que han facilitado mi día a día.

Gracias a la Dra. Elena Lizarraga y a la Dra. Nieves Goicoechea por su interés en los productos sintetizados en esta tesis y por el ingente trabajo que este interés ha generado. Gracias a la Dra. María Font por su lucha con la liberación de metilselenol. No quiero olvidar al resto de profesores que forman parte del Departamento de Química Orgánica y, que de una forma u otra, han intervenido en mi trabajo estos años.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por los buenos ratos que hemos compartido tanto dentro como fuera de la universidad, sin vosotros esto habría mucho más difícil y aburrido.

Gracias a las caspaseras (y Ana). Gracias por los momentos de motivación y todos los planes gastronómicos (y los otros) con los que hemos ido amenizando estos 4 años. Gracias por compartir conmigo mis alegrías y los momentos de frustración en las fases en las que nada tenía sentido.

Gracias al Dr. Ignacio Encio por abrirme de par en par las puertas de su laboratorio y enseñarme el fascinante mundo de la investigación celular. Gracias por todas las horas que me has dedicado revisando células, datos, manuscritos... Gracias por enseñarme a apreciar la importancia de los detalles.

Gracias a Iván, María y Ronces por los cafés, ánimos y ayuda en enfermería.

I want to thank Professor Claus Jacob and Torsten Burkholz for allowing me to live my German adventure. Thank you for introducing me to different labs and groups, for the congress in Dijon, for helping me at my arrival and for making me feel part of the big family you have in Saarbrücken. Herzlichen Dank. Thanks to Lisa, Vanessa, Johanna, Mohamed, Firas, Javeria, Tekiya, Tom, Adel, Jawat... for sharing trips, afterworks, pizzas... summing up, for organising a plan for every day! Thanks Khairan for the great help I received in Zweibrücken.

Vielen Dank AG Prof. Gerald Thiel auch. I want to express my gratitude to Professor Thiel who accepted me not only for working in his facilities in Homburg, but accepted me as part of the group. I want to thank all of you for showing me the fascinating world of the transcription factors regulation. Thanks to Iris and Petra. Thanks to my “hoodmates” Melanie, Celina and Maxi, I will never forget our infection hours (oh Mann!!), thanks to Andrea, Sandra and Claudia for sharing coffee/lunch/incubation times and your technical support; thanks Anke for your endless patience with the western-Blots (oh Mann!! Again...) and of course thanks Oli for explaining to me protocols, differences between transcription factors, sensors, reporters... and for providing me with the beautiful pictures of the constructs. Thank you all for your “How to be German” lessons, traditional food, songs, schedules...and for showing great acceptance of my Spanish way of life!

I want to express my gratitude to Prof. Karl-Herbert Shäfer and the group he leads in Zweibrücken. Even when I didn't have enough time to work there, you also made me feel part of the group and showed me amazing techniques.

Thank you Nat for your English corrections and for being a real friend. Gracias a Javi por su inestimable ayuda informática y soporte gráfico. A ti te debo que las figuras de los artículos sean de tan alta calidad. Gracias a Alfredo por su ayuda con la estadística, a Gwen por los protocolos y ayuda con la técnica del ABTS y a Rebe con la del DPPH.

Agradezco a mi familia su apoyo incondicional e interés continuo por el desarrollo de esta tesis.

Gracias David por ser mi apoyo, haber compartido estos años y saber más sobre el selenio que la mayoría de los químicos. Gracias por animarme a perseguir mi sueño y darme la tranquilidad de que me seguirás al fin del mundo si mi amor por la ciencia me lleva hasta allí.

Gracias Javi por compartir y sufrir conmigo esta tesis, tú te has llevado los peores momentos y siempre has estado a la altura. Por animarme sin siquiera entender por qué, recordarme siempre que yo puedo, animarme a mirar hacia el futuro con ilusión y hacerme creer que conseguiremos los que nos propongamos. Gracias por ser el mejor

compañero de piso que se puede tener. Gracias Carlos, ¡la otra mitad! por cuidar de papá y mamá en nuestra ausencia, mantener el equilibrio y, a la vez, estar siempre presente en nuestra vida en Pamplona.

Gracias Papá y Gracias Mamá. Porque vuestro es este logro. Por formar esta familia. Por vuestro esfuerzo. Por el ejemplo que nos dais cada día. Por el optimismo y las fuerzas cuando las cosas no salen como queremos. Por el apoyo incondicional. Por sentiros cerca aunque nos separen miles de kilómetros. Porque gracias a vosotros yo he llegado hasta aquí. El punto de partida.

Gracias abuelo por cuidar de mi.

Glosario de abreviaturas y acrónimos

A

Aa: Aminoácido

ADN: Acido desoxirribonucleico

Akt: Proteín quinasa B

APS: Persulfato amónico (*Ammonium PerSulfate*)

ARN: Acido ribonucleico

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*)

ATM: Ataxia telangiectasia mutada

ATP: Adenosin trifosfato (*Adenosine TriPhosphate*)

ATR: Quinasa de la ataxia telangiectasia y Rad3 relacionados (*ATM-Related kinase*)

B

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2 (*Bcl-2-Associated X protein*)

BCA: Acido bicinconínico (*BiCinchoninic Acid*)

C

CARD: Dominio de reclutamiento de caspasa (*Caspase Recruitment Domain*)

CAT: Catalasa

CDK: Quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-Dependant protein Kinase*)

Chk1: Quinasa del punto de control 1 (*Checkpoint Kinase 1*)

Chk2: Quinasa del punto de control 2 (*Checkpoint Kinase 2*)

Cip/Kip: Proteínas de interacción con CDKs/ proteínas inhibidoras de kinasas (*Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*)

CKI: Inhibidor de CDK (*Cyclin-dependant protein Kinases Inhibitor*)

D

DD: Dominio de muerte (*Death Domain*)

DED: Dominio efector de muerte (*Death Effector Domain*)

DIOs: Iodotironinas deiodinasas

DISC: Complejo de señalización de inducción de muerte (*Death Inducing Signaling Complex*)

DKFZ: Centro de investigación alemán de cáncer (*Deutsches KrebsForschungsZentrum*)

DPDS: Difenildiseleniuro

DTT: Ditiotreitol

E

Egr-1: Respuesta rápida de crecimiento (*Early growth response 1*)

ERK1/2: Quinasa regulada por señales extracelulares (*Extracellular-Regulated Kinase 1/2*)

F

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas (*Fas-Associated protein with a Death Domain*)

G

Gag: Antígeno grupo específico (*Group-specific antigen*)

GNRH: Hormona liberadora de la hormona gonadotropina (*Gonadotropin-Releasing Hormone*)

GPxs: Glutatión peroxidasas

GSH: Glutatión reducido

GST: Glutatión-S-transferasa

H

HDAC: Histona desacetilasa

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*Human Epidermal growth factor Receptor-type2*)

I

IL-2: Interleucina-2

M

Mdm2: Gen murino doble minuto (*Murine double minute 2*)

MeSeH: Metilselenol

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero (*mammalian Target Of Rapamycin*)

MeSeA: Ácido metilselenínico (*MethylSeleninic Acid*)

MeSeCys: *Se*-metilselenocisteína

N

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido

NPCT: Ensayo nutricional de prevención de cáncer (*Nutritional Prevention of Cancer Trial*)

O

OMS: Organización Mundial de la Salud (*WHO en sus siglas en inglés*)

P

PARP: Poli(ADP-ribosa) polimerasa

p-XSC: 1,4-fenilenbis(metilen)selenocianuro

R

ROS: Especies reactivas del oxígeno (*Radical Oxygen Species*)

S

SAM: *S*-adenosilmetionina

Se: Selenio

SELECT: Estudio de quimioprevención con Se y vitamina E (*Se and Vitamin E Chemoprevention Trial*)

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SeCys: Selenocisteína

SeMet: Selenometionina

SePP1: Selenoproteína P

SPS1: Selenoproteína S

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SOD: Superóxido dismutasa

T

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor beta*)

TNF: Factores de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

TRAIL: Ligando de apoptosis inducida por el receptor de TNF (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)

TrxR: Tioredoxín reductasas

V

Vav2: Segundo miembro de la familia de oncogenes VAV

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

INTRODUCCIÓN	1
1. EL CÁNCER	3
1.1. <i>Incidencia del cáncer.....</i>	4
1.2. <i>Factores causales del cáncer</i>	5
1.3. <i>Tratamiento del cáncer.....</i>	6
1.3.1. Cirugía	7
1.3.2. Radioterapia.....	7
1.3.3. Quimioterapia.....	7
1.3.4. Terapia dirigida	12
1.3.5. Agentes de diferenciación.....	12
1.3.6. Terapia hormonal.....	13
1.3.7. Inmunoterapia	14
1.4. <i>Mecanismos biológicos alterados en las células cancerosas</i>	15
1.4.1. Estatus Redox, estrés oxidativo y Egr-1.....	16
1.4.2. Ciclo celular.....	17
1.4.3. Apoptosis.....	19
2. EL SELENIO.....	23
2.1. <i>Selenio y salud.....</i>	25
2.1.1. Enfermedades causadas por déficit de selenio en el organismo.....	25
2.1.2. Efectos adversos en el mantenimiento de la salud por déficit de selenio	25
2.1.3. Selenio y cáncer	26
2.2. <i>Metabolismo del selenio</i>	27
2.3. <i>Efectos del selenio sobre la carcinogénesis.....</i>	29
2.3.1. Expresión de genes.....	30
2.3.2. Daño y reparación del ADN.....	30
2.3.3. Vías de señalización.....	30
2.3.4. Ciclo celular y apoptosis	30
2.3.5. Metástasis	30
2.3.6. Antiangiogénesis.....	31
2.4. <i>Papel de las selenoproteínas</i>	31
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	33
1. DERIVADOS ORGANOSELENADOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL	35
1.1. <i>Derivados metilados de selenio</i>	35
1.1.1. Selenoaminoácidos metilados.....	36
1.1.2. Ácido metilselenílico (MeSeA)	36
1.1.3. Metilselenol (MeSeH).....	36
1.2. <i>Derivados contenido grupo cianoselanilo</i>	37
1.3. <i>Derivados contenido grupo diseleniuro</i>	38

2. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN.....	39
3. NEW SELENODERIVATIVES AS ANTITUMORAL AGENTS	40
HIPÓTESIS Y PLANIFICACIÓN.....	59
OBJETIVOS	63
RESULTADOS.....	67
CAPÍTULO 1.....	69
CAPÍTULO 2.....	89
CAPÍTULO 3.....	113
CAPÍTULO 4.....	129
CAPÍTULO 5.....	153
DISCUSIÓN.....	171
CONCLUSIONES	179
BIBLIOGRAFÍA	183
ANEXO	205
1. RELACIÓN DE ESTRUCTURAS SINTETIZADAS EN ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	207

Introducción

1. El cáncer

Se denomina cáncer a un conjunto de más de 200 enfermedades diferentes, caracterizadas todas ellas por la alteración morfológica y funcional de las células de un tejido, seguida de la proliferación descontrolada de las mismas que invaden, desplazan y destruyen, localmente y a distancia, otros tejidos sanos del organismo. Si esta extensión no se controla puede llevar a la muerte.

El cáncer es una enfermedad genética. Se produce por cambios en genes específicos, siendo necesario que una célula acumule un gran número de alteraciones genéticas para convertirse en cancerosa (Ashworth A, 2013; Kandoth C, 2013). Este proceso es muy improbable en células normales, ocurre de 1 a 3 veces por cada 10^{14} células. El gran catálogo de genotipos de células cancerosas es una manifestación de alteraciones en la fisiología celular que, en conjunto, dictan el crecimiento maligno. Revisiones bibliográficas, ampliamente aceptadas, (Hanahan D, 2000; Hanahan D, 2011) han descrito diez alteraciones comunes a todas las células cancerígenas (Figura 1):

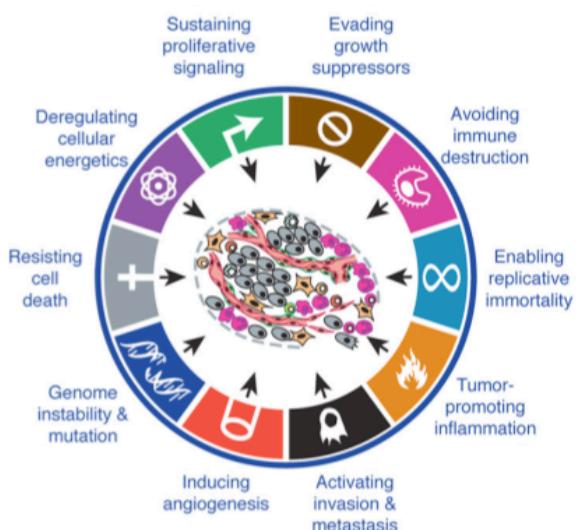


Figura 1: Capacidades adquiridas del cáncer (Hanahan D, 2011).

Autosuficiencia en las señales de crecimiento

Insensibilidad ante las señales de inhibición del crecimiento

Ilimitado potencial de replicación

Invasión de tejidos y metástasis

Inducción de la angiogénesis sostenida

Evasión de la muerte celular programada

Elusión de la destrucción por parte del sistema inmunitario

Promoción de la inflamación en el tumor

Inestabilidad en el genoma por el alto grado de mutación

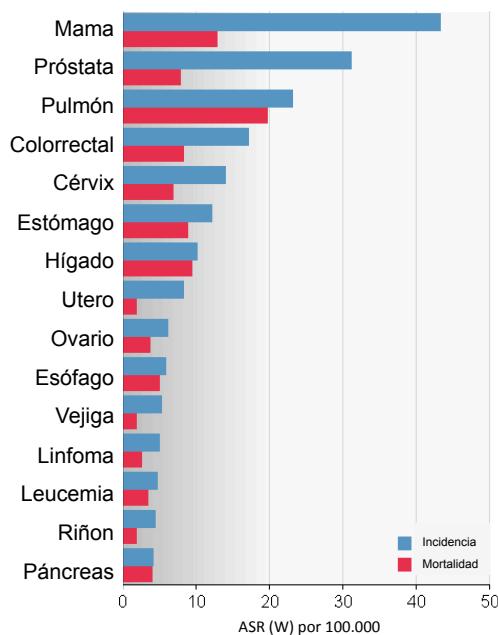
Introducción

Desregulación de la energética celular

La descripción de estas capacidades adquiridas y los avances en el conocimiento de la carcinogénesis a nivel celular posibilitan la búsqueda de dianas específicas para desarrollar nuevas terapias dirigidas (Ladomeri M, 2013).

1.1. Incidencia del cáncer

La importancia del cáncer ha aumentado en el último siglo como consecuencia del descenso de las muertes por enfermedades infecciosas y del aumento de la esperanza de vida, ya que la edad es uno de los principales factores de riesgo. En la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa de mortalidad, superado únicamente por las enfermedades cardiovasculares (Lozano R, 2012), y los datos epidemiológicos muestran el comienzo de esta tendencia en el mundo menos desarrollado, en particular en los países «en transición» y países de ingresos medianos (Farmer P, 2010). Más del 60% de los casos de cáncer se registran ya en África, Asia y Centro y Sudamérica, así como el 70% de las muertes asociadas al cáncer (Bray F, 2012; Vineis P, 2014).



Gráfica 1: Estimación de la incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en 2012. (*Adaptado de GLOBOCAN 2012*).

El informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2012 contabiliza 32,6 millones de enfermos de cáncer, 8,2 millones de muertes debidas a esta enfermedad y el diagnóstico de 14,1 millones de nuevos casos, estimando el aumento de esta cifra hasta los 22 millones en las próximas dos décadas. Los tipos de cáncer más frecuentes son el de mama y el de próstata y el de mayor mortalidad el cáncer de pulmón (Gráfica 1) (<http://www.who.int/en/>). Se prevé un aumento de la mortalidad debida a cáncer de pulmón hasta 2030, a menos que se intensifiquen de forma notable las actividades de control mundial del tabaquismo.

La incidencia global de cáncer en España en 2012 fue de 215.534 casos, y la mortalidad se cifró en 102.762 casos, de los cuales 2/3 de los casos y 3/4 de las muertes corresponden a pacientes mayores de 65 años. La previsión de incidencia de cáncer en el año 2015 es de 227.076 casos. El tipo más frecuente de cáncer en España es el cáncer colorrectal, seguido de los de próstata, pulmón, mama y vejiga (Figura 2). En cuanto a sexos, el cáncer con mayor prevalencia en hombres es el de próstata y el de mama en las mujeres. Sin embargo, como sucede a nivel mundial, es el cáncer de pulmón el que produce un mayor número de defunciones (<http://www.seom.org/>).

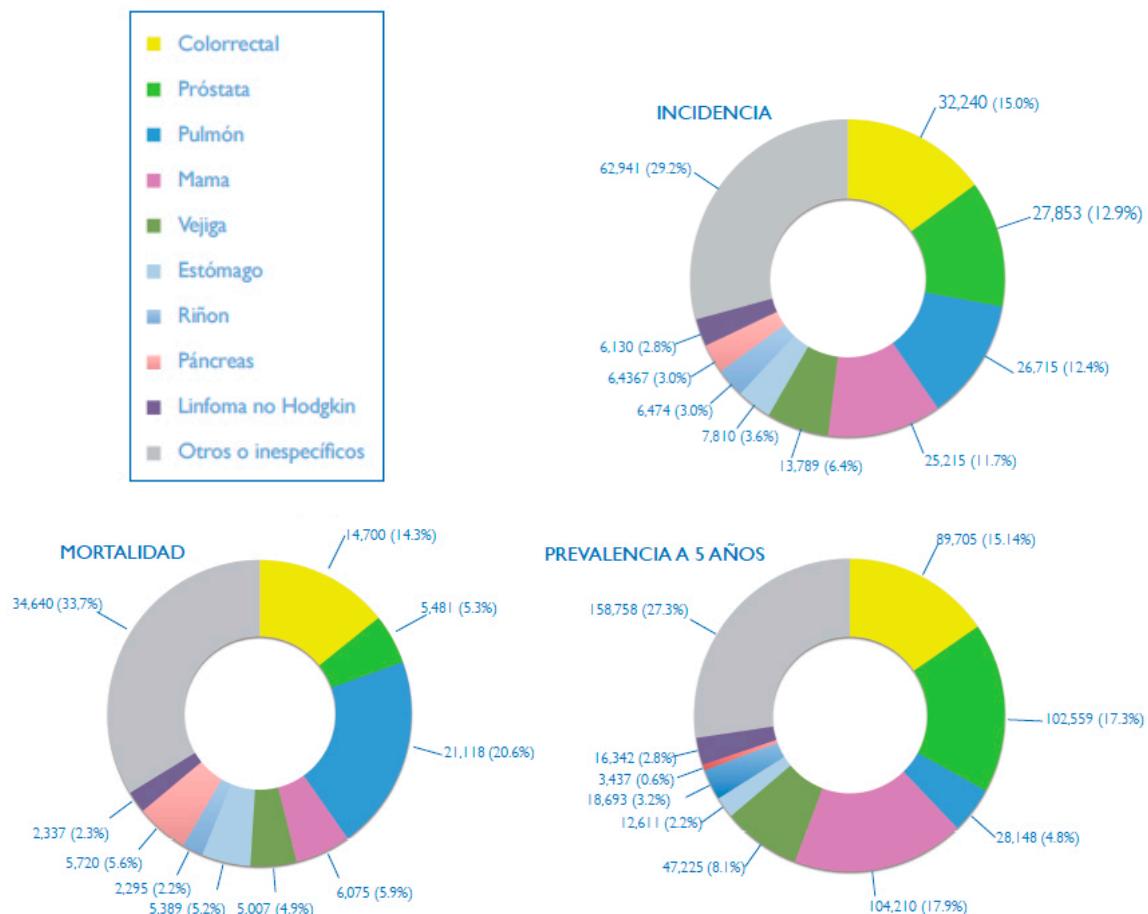


Figura 2: Incidencia, Mortalidad y Prevalencia a 5 años en España en 2012 en los tumores más frecuentes (Imagen adaptada de SEOM).

A pesar de que tanto el número de nuevos casos de cáncer como el número absoluto de muertes se incrementan, por al aumento y envejecimiento de la población; las tasas de mortalidad global disminuyen debido, sin duda, a los diagnósticos cada vez más precoces y al mejor resultado de los tratamientos.

1.2. Factores causales del cáncer

La aparición de cáncer se ha asociado a varios factores de riesgo comunes, genéticos propios de cada persona o por la exposición a agentes externos conocidos como carcinógenos.

Introducción

La exposición a carcinógenos químicos, por ejemplo a amianto en el entorno laboral o en el medio ambiente, a carcinógenos físicos, radiación (por ejemplo ultravioleta o ionizante) y/o a carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos, por ejemplo hepatitis B o infección por virus del papiloma humano (zur Hausen H, 2009), hacen que sea posible la unión de las mutaciones necesarias en una célula para que ésta se vuelva cancerígena. La probabilidad de desarrollar cáncer aumenta exponencialmente con la edad, siendo éste otro factor de riesgo importante. Se debe a que al envejecer se pueden acumular más factores de riesgo y que los mecanismos de reparación celular van perdiendo su eficacia.

Cabe destacar que el 30% de las muertes debidas al cáncer son consecuencia directa de hábitos de vida no saludables, por consiguiente evitables (Vineis P, 2014):

- Consumo de tabaco

Es el factor de riesgo más importante, el 20% de todas las muertes por cáncer son debidas al tabaquismo, subiendo este porcentaje al 70% en el caso del cáncer de pulmón (<http://www.who.int/en/>). Causa 1,8 millones de defunciones anuales de las cuales el 60% se registran en países de ingresos bajos y medianos (Vineis P, 2014).

- Exceso de peso, obesidad o inactividad física

Un ritmo de vida sedentario, con déficit de actividad física (Friedenreich CM, 2010; Clague J, 2012), un alto índice de masa corporal y la baja ingesta de frutas y vegetales (Boeing H, 2012) en conjunto provocan 274.000 defunciones anuales por cáncer (Friedenreich CM, 2010).

- Consumo nocivo de alcohol

351.000 defunciones anuales por cáncer se relacionan directamente a este hábito (Moodie R, 2013).

- Infección por virus del papiloma humano

Trasmitido por vía sexual, causa 235.000 defunciones anuales por cáncer (Crosbie EJ, 2013).

- Exposición a agentes carcinógenos en el entorno laboral

Se atribuyen al menos 152.000 defunciones anuales por cáncer a esta exposición (<http://www.who.int/en/>).

1.3. Tratamiento del cáncer

En la actualidad todavía no se dispone de tratamientos totalmente selectivos y eficaces contra el cáncer, aunque poco a poco, y gracias a los grandes avances que se están realizando en este campo, se espera que esto cambie en los próximos años. Actualmente, el cáncer se trata con cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica, inmunoterapia y terapia dirigida, siendo los tres primeros

los más habituales.

1.3.1. Cirugía

La cirugía es el método elegido para eliminar los tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para alcanzar alta eficacia se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor, con el fin de asegurar que todas las células cancerosas han sido eliminadas. Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, a través de la sangre o de la linfa, habrá que realizar otros tratamientos, bien sean añadidos a la cirugía o únicos y distintos a ella.

1.3.2. Radioterapia

La radioterapia utiliza rayos X de alta potencia o semillas radiactivas para destruir las células cancerígenas. Específicamente, la radioterapia daña el ADN de las células cancerosas impidiendo que dichas células crezcan y se dividan. No tiene selectividad por lo que células sanas del entorno radiado también pueden resultar destruidas en este proceso, produciendo efectos secundarios.

La radioterapia puede emplearse como tratamiento único en aquellos casos en que los tumores sean especialmente sensibles a la radiación y no haya señales de que se haya extendido hacia ningún otro lugar. A menudo se combina con la cirugía, anterior a ésta, para reducir el tamaño de un tumor al máximo posible y facilitar su extirpación, o tras la intervención para prevenir la reaparición del cáncer.

El tratamiento conjunto de radioterapia y quimioterapia se practica también con frecuencia. El empleo de quimioterapia, antes de la radioterapia, hace a las células cancerosas más sensibles a la radiación. Se puede usar la radioterapia después de la quimioterapia, con el fin de asegurar la eliminación de todas las células cancerosas.

1.3.3. Quimioterapia

La quimioterapia utiliza fármacos, conocidos como agentes quimioterápicos, para el tratamiento del cáncer. Debido a que los medicamentos se distribuyen a través del torrente sanguíneo a todo el cuerpo, la quimioterapia se considera un tratamiento sistémico (<http://www.cancer.org/>). El objetivo de la quimioterapia es la destrucción de las células que componen el tumor, aunque en la mayoría de las ocasiones se ven afectadas a su vez células sanas (<http://www.nlm.nih.gov/>). A continuación se presentan los principales tipos de quimioterápicos según su mecanismo de acción.

1.3.3.1. Agentes alquilantes

Estos agentes forman enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleófilas presentes en la célula, como las bases del ADN, originando

Introducción

puentes de unión intercatenarios o intracatenarios y bloqueando con ello la replicación del ADN, la transcripción del ARN, la mitosis y la síntesis de proteínas (Lorenzo P, 2012). Actúan durante todo el ciclo celular, afectando en mayor medida a las células en rápida división. Debido al deterioro del ADN, largos tratamientos con este tipo de quimioterápicos pueden causar daños en la médula ósea que puede degenerar en leucemia. Los agentes alquilantes se dividen según su naturaleza química (Figura 3).

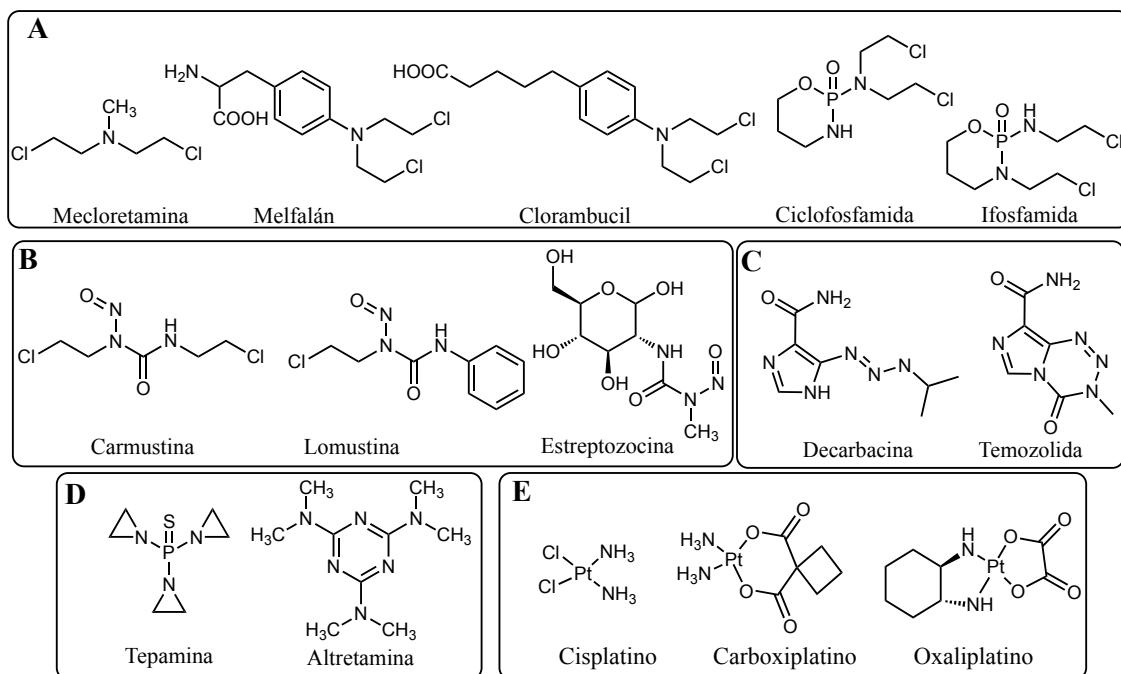


Figura 3: Ejemplo de agentes alquilantes. (A) Mostazas nitrogenadas. (B) Nitrosoureas. (C) Triazinas. (D) Etileniminas. (E) Compuestos con platino.

1.3.3.2. Antimetabolitos

Estos compuestos se asemejan a los componentes celulares necesarios para la síntesis del ADN. La maquinaria celular no es capaz de distinguirlos de sus análogos biológicos y los incorpora al mecanismo celular, lo que finalmente lleva a la célula a no poder dividirse. En este grupo se encuentran análogos de las purinas, como la Mercaptopurina o la Tioguanina; análogos de las pirimidinas, Citarabina, Gemcitabina, el 5-Fluorouracilo, la Floxuridina o la Capecitabina; el análogo de la adenosina, Fludarabina o análogos del ácido fólico como el Metotrexato o el Pemetrexed (Figura 4).

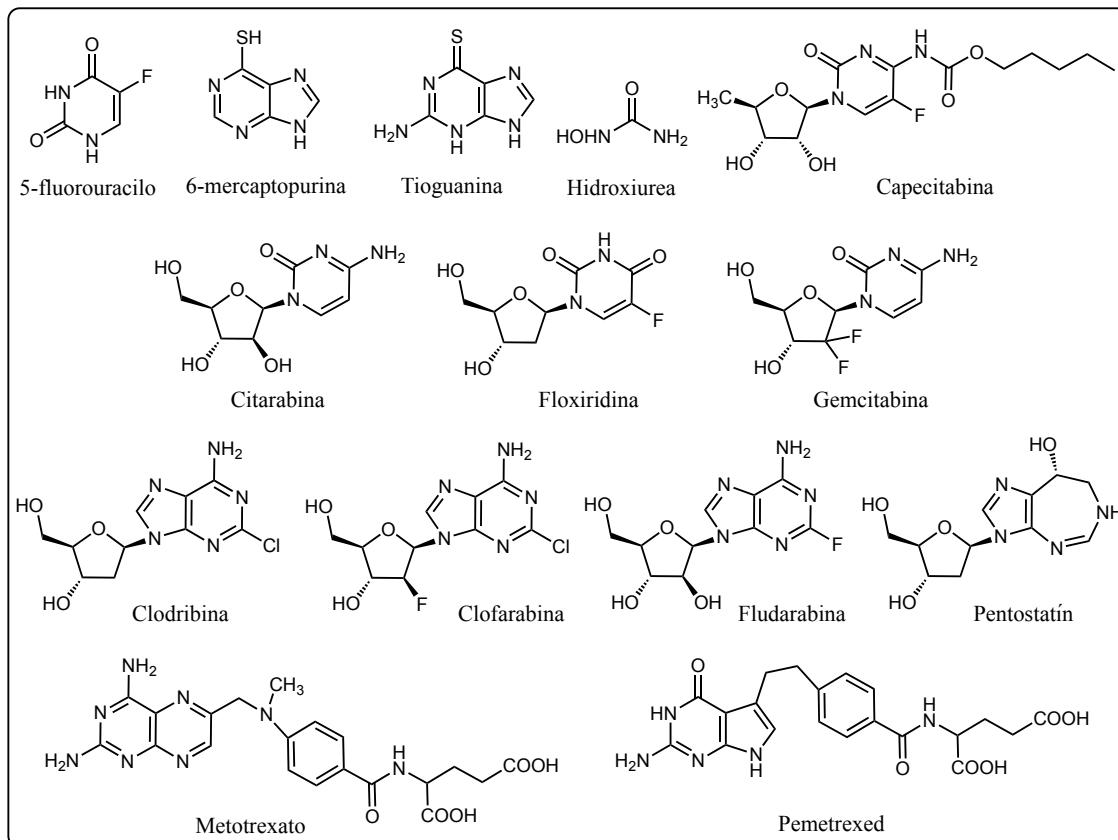


Figura 4: Ejemplos de fármacos antimetabolitos

1.3.3.3. Antibióticos

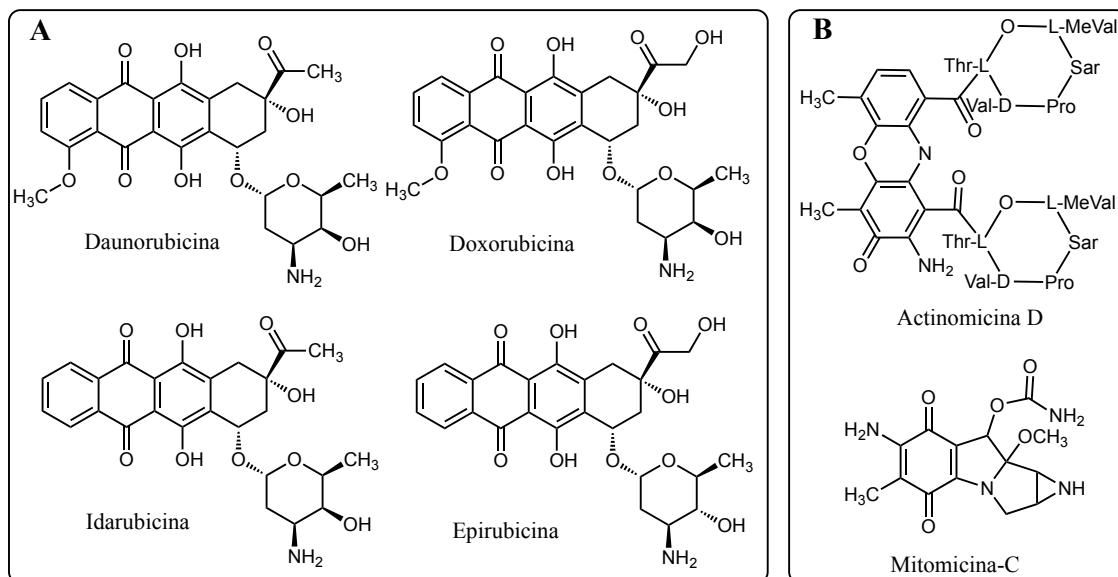


Figura 5: Ejemplos de antibióticos contra el cáncer. (A) Antraciclinas. (B) Otros tipos de antibióticos.

Entre los antibióticos empleados como antineoplásicos destacan las antraciclinas (Figura 5A), empleadas en diversos tipos de cáncer, como leucemias, mama, pulmón, mieloma, neuroblastoma, etc. Se han descrito numerosos mecanismos para explicar su acción anticancerosa, destacando su capacidad para intercalarse entre los pares de bases

Introducción

adyacentes de ADN, para inhibir la topoisomerasa II o producir alteraciones en la replicación y transcripción proteica, pudiendo originar, además, radicales libres en el interior celular por reducción de sus grupos quinona. Cabe mencionar a su vez la Actinomicina D que, intercalándose entre las hebras del ADN, impide su correcta replicación y altera la síntesis de ARN, y la Mitomicina C que actúa como agente alquilante (Figura 5B) (Lorenzo P, 2012).

1.3.3.4. Inhibidores de la topoisomerasa

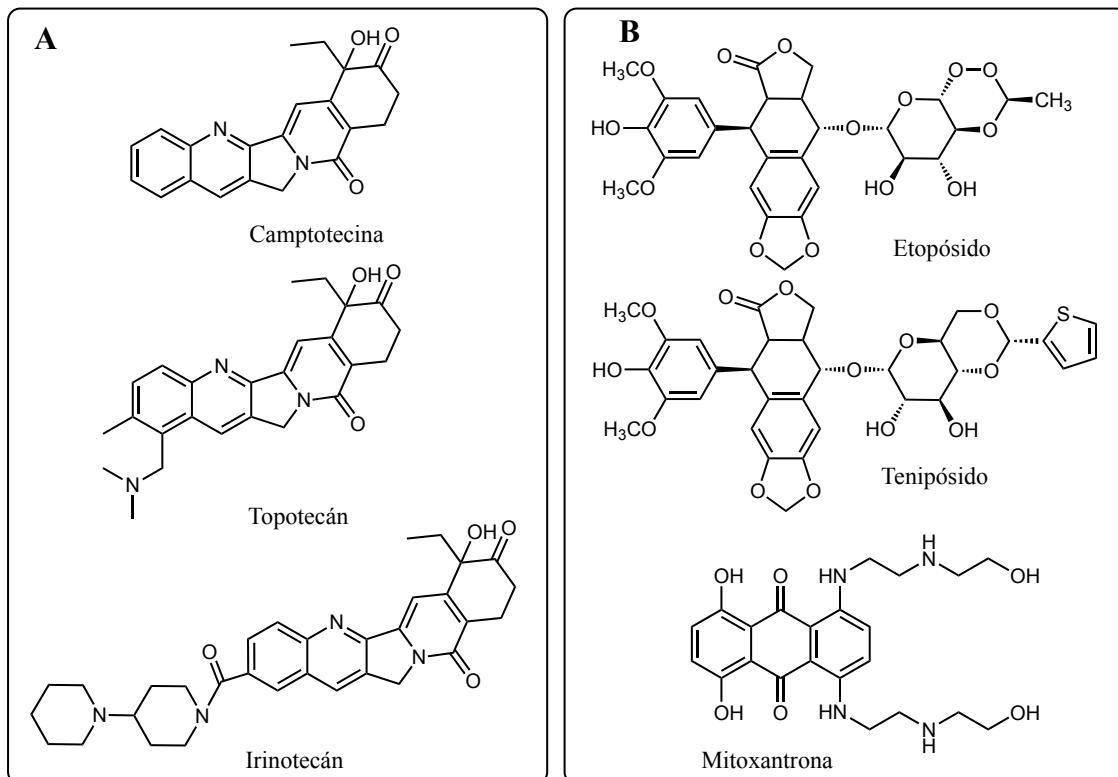


Figura 6: Fármacos inhibidores de la topoisomerasa (A) Inhibidores de la topoisomerasa I. (B) Inhibidores de la topoisomerasa II.

Las topoisomerasas son enzimas nucleares que controlan, mantienen y modifican las estructuras y la topología del ADN durante los procesos de replicación y traslación del material genético (Flórez J, 2008). Los antineoplásicos que dirigen su acción a esta diana terapéutica se dividen en dos grupos, en función del tipo de topoisomerasa que inhiben, la I o la II. Los inhibidores de la topoisomerasa I estabilizan el complejo que se forma entre la enzima y la hebra del ADN, lo que provoca la escisión de las cadenas de ADN y la muerte celular. En la Figura 6A, se muestran ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I; la Camptotecina, extracto activo de la planta *Camptotheca accuminata*, y análogos sintéticos de ésta con mayor actividad y menor toxicidad. Los inhibidores de la topoisomerasa II (Figura 6B) provocan la ruptura de la cadena de ADN; el Etopósido y el Tenipósido forman un complejo covalente con la enzima y la Mitoxantrona estabiliza el complejo ADN- topoisomerasa II.

1.3.3.5. Inhibidores de la mitosis

Actúan durante la metafase de la mitosis alterando la polimerización de la tubulina, necesaria para la formación del huso mitótico. Los derivados de la Vinca, la Vincristina y la Vinblastina, inhiben esta polimerización; mientras que los taxoles, el Paclitaxel y el Docetaxel, impiden la despolimerización de los microtúbulos, originando enlaces estables que carecen de la flexibilidad necesaria para su funcionalidad (Flórez J, 2008).

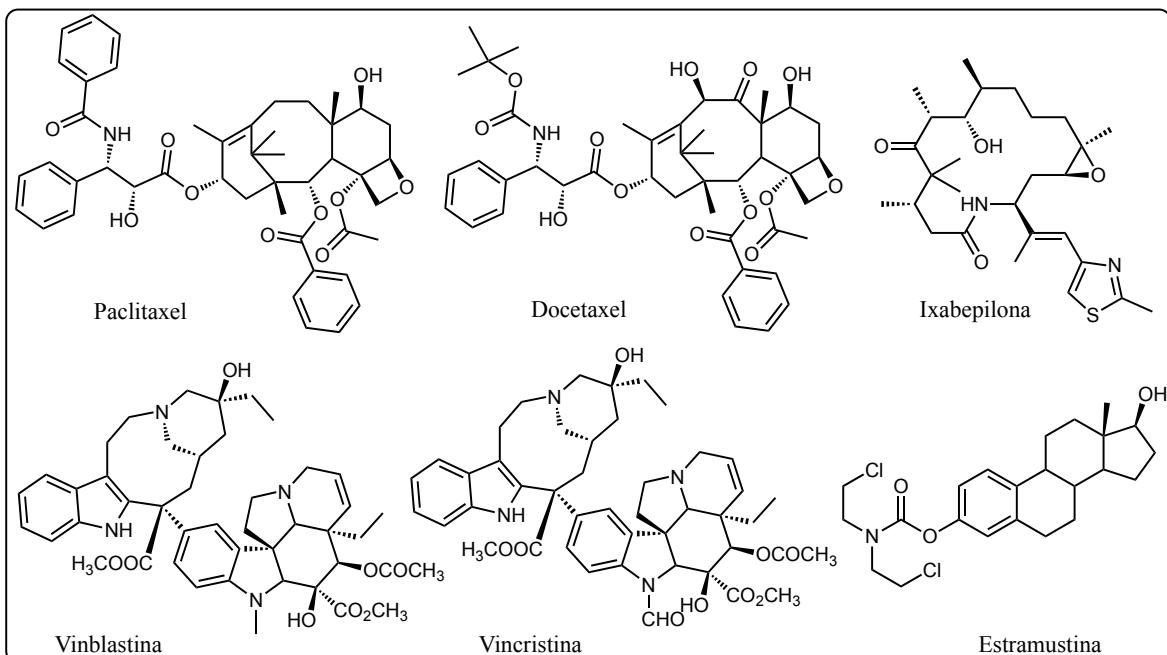


Figura 7: Ejemplos de fármacos que inhiben la mitosis

1.3.3.6. Corticoesteroides

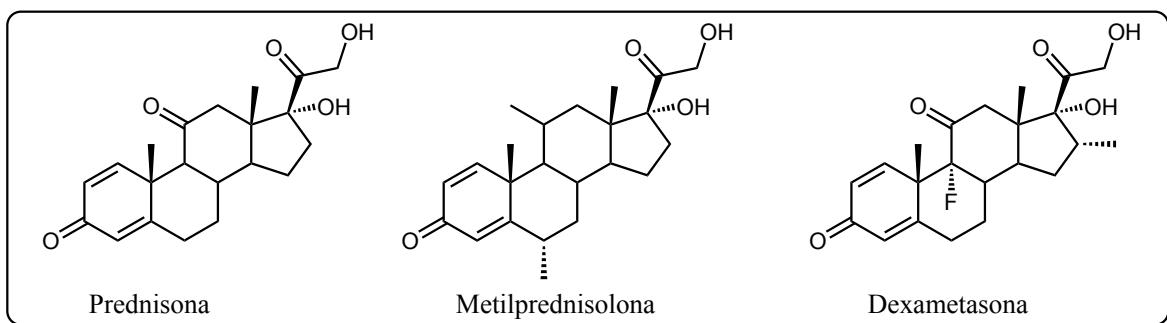


Figura 8: Ejemplos de corticoesteroides empleados como antineoplásicos

Los corticoesteroides son análogos de las hormonas que producen las glándulas para combatir el estrés relacionado con enfermedades y traumatismos. Reducen la inflamación y a la vez afectan al sistema inmunológico. Son útiles en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (linfoma, leucemias y mieloma múltiple), así como de otras enfermedades.

Introducción

1.3.4. Terapia dirigida

Técnicamente, los tratamientos catalogados en este grupo son quimioterápicos, pero incorporan una ventaja terapéutica importante: son capaces de atacar en mayor medida a las células cancerosas. Se consideran el futuro de la quimioterapia ya que, a la vez que avanza el conocimiento de los mecanismos y señales moleculares alterados en las células malignas, se pueden desarrollar moléculas dirigidas a estas dianas, presentes en menor grado, o incluso no presentes, en las células no tumorales. La mayoría de estos medicamentos son inhibidores de la tirosín quinasa.

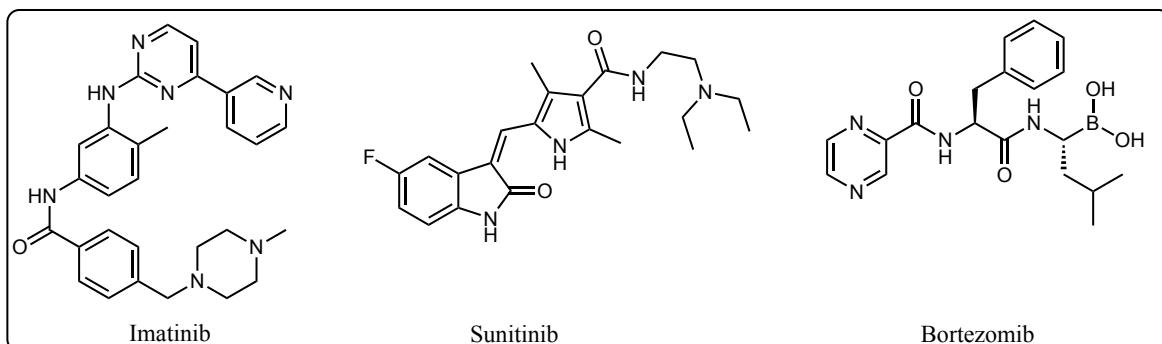


Figura 9: Ejemplos de terapias dirigidas

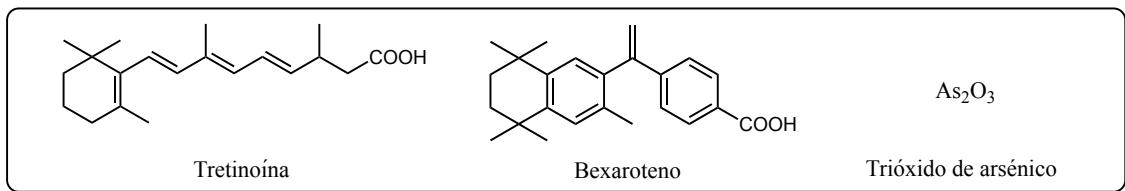
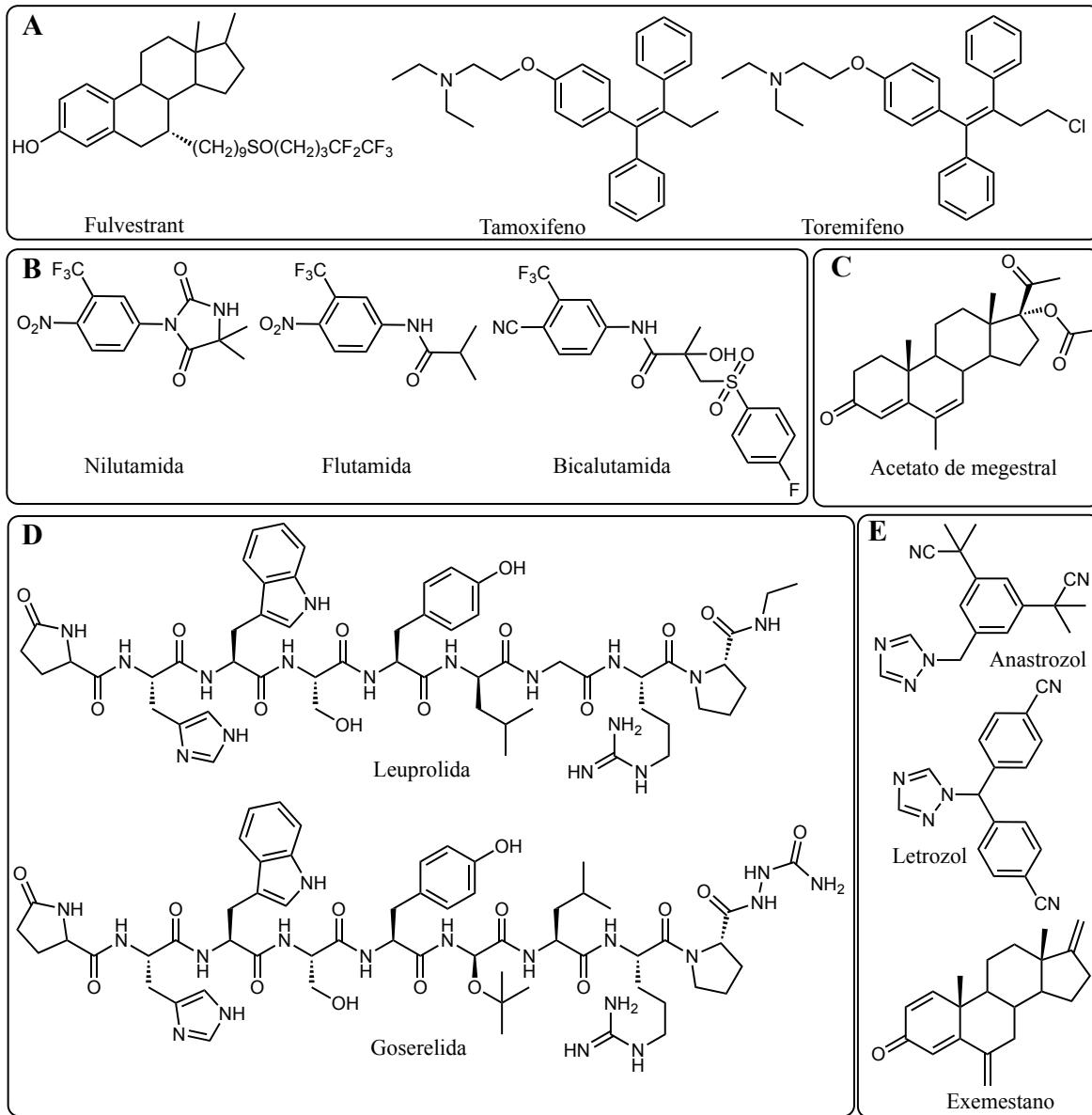
Imatinib es una de las primeras terapias dirigidas, utilizada en cáncer de estroma gastrointestinal (Demetri GD, 2002) y en algunas leucemias (Druker BJ, 2001). Es un inhibidor de la tirosín quinasa y actúa sobre proteínas o enzimas anormales presentes en las células cancerosas que promueven el crecimiento descontrolado (Druker BJ, 2001).

Sunitinib es un inhibidor de quinasas que actúa inhibiendo el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Mendel DB, 2003), inhibe la angiogénesis y la tirosín quinasa, consiguiendo con ello frenar el crecimiento tumoral e impedir que pueda diseminarse al limitar la formación de vasos sanguíneos por parte del tumor. Se emplea en clínica en cáncer de riñón (Motzer RJ, 2006; Polyzos A, 2008) y estroma gastrointestinal (Demetri GD, 2006).

Bortezomib inhibe el proteosoma impidiendo así la destrucción de proteínas que ya no son útiles para la célula y llevándola con ello a la muerte. Se emplea en mieloma múltiple que no responde a otros tratamientos (Hideshima T, 2001).

1.3.5. Agentes de diferenciación

La terapia de diferenciación tiene como objetivo forzar a las células cancerosas a terminar el proceso de maduración hacia células normales y, con ello, revertir la carcinogénesis. No destruye las células cancerígenas pero sí frena su crecimiento, con menores efectos secundarios que los tratamientos clásicos de quimioterapia (Kawamata H, 2006).

**Figura 10:** Fármacos que actúan como agentes de diferenciación**1.3.6. Terapia hormonal****Figura 11:** Ejemplos de terapia hormonal. (A) Compuestos antiestrogénicos, (B) compuestos antiandrógenos, (C) progestina, (D) agonistas de la hormona liberadora de la hormona gonadotropina (GNRH), (E) inhibidores de la aromatasa.

La terapia hormonal inhibe la proliferación celular mediante la reducción de la tasa de hormonas estimulantes circulantes, o por actuación de los receptores hormonales específicos. Se utiliza satisfactoriamente en cánceres hormono-dependientes, como el de

Introducción

mama y el de próstata. Los medicamentos pertenecientes a este grupo (Figura 10) se dividen en:

Antiestrógenos: son fármacos que bloquean de forma competitiva la unión del estradiol al receptor nuclear estrogénico.

Antiandrógenos: se unen de forma selectiva al receptor para andrógenos impidiendo su función de proliferación sobre el núcleo de la célula.

Estrógenos

Progesterinas

Agonistas de la hormona liberadora de la hormona gonadotropina (GNRH): inhiben la liberación de hormonas gonadales saturando el eje hipotálamo hipófisis.

Inhibidores de la aromatasa: reducen la tasa de estrógenos y la proliferación celular inhibiendo la aromatasa, enzima que convierte la androstenodiona y testosterona en estrona y estradiol en el tejido graso.

1.3.7. Inmunoterapia

Los tratamientos de inmunoterapia se clasifican en *inmunoterapias activas*, que estimulan el sistema inmunitario del cuerpo para combatir la enfermedad, como la interleucina-2 (IL-2) o el interferón- α , e *inmunoterapias pasivas*, que utilizan los componentes del sistema inmunitario. Dentro de este subgrupo se encuentran las terapias con anticuerpos monoclonales, que se fundamentan en la presencia de moléculas específicas presentes en las células tumorales. Ejemplos de anticuerpos monoclonales empleados en el tratamiento de neoplasias son:

Trastuzumab: se fija al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), sobreexpresado en el 20-30% de los cánceres de mama (De P, 2013; Mortenson ED, 2014).

Bevacizumab: actúa contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), necesario para desarrollar los procesos de vascularización en el crecimiento de tumores sólidos (Dhillon S, 2013).

Cetuximab: se fija al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Pirker R, 2013).

Rituximab: se une específicamente al antígeno de membrana CD20, fosfoproteína no glicosilada localizada en los linfocitos B que se expresa en los linfomas no hodgkinianos de células B (Keating GM, 2010; Al-Zoobi L, 2014).

Ibritubomab tiuxetan [90Y]: su antígeno es también CD20, pero este anticuerpo está marcado con el isótopo litio 90, emisor β que permite destruir las células diana y sus vecinas (Scholz CV, 2013).

Alemtuzumab: reconoce a CD52, una glicoproteína de membrana que se expresa en los linfocitos T y B y monocitos, tanto normales como cancerígenos, empleado en el

tratamiento de leucemia linfocítica crónica (Fiegi M, 2014).

1.4. Mecanismos biológicos alterados en las células cancerosas

La carcinogénesis es un proceso complejo que tiene lugar en distintas etapas (Figura 12), pudiendo pasar años desde la exposición al carcinógeno hasta la aparición de la neoplasia. El metabolismo de ciertas sustancias en el interior de la célula puede provocar la aparición de moléculas reactivas que dañen el ADN (**Iniciación**). Si este daño no es reparado, puede traducirse en mutaciones o defectos genéticos, pudiendo dar lugar a estructuras celulares modificadas o células cancerígenas (**Promoción**). Cuando estas células alteradas se dividen incontroladamente aparece la neoplasia. El tumor puede crecer, o incluso diseminarse y provocar metástasis (**Progresión**).

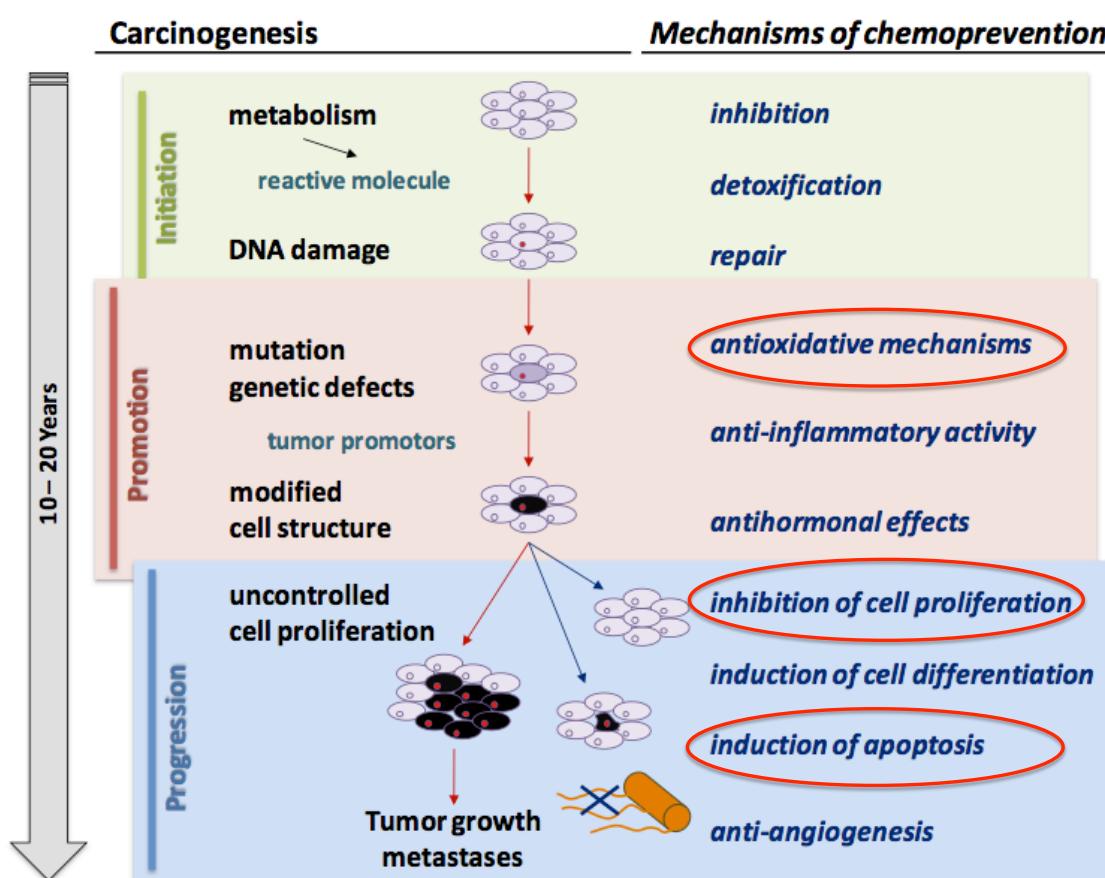


Figura 12: Esquema de las etapas de la carcinogénesis y mecanismos de quimioprevención (Adaptada de <http://www.dkfz.de/en>)

En cada una de estas etapas existen diversos mecanismos para prevenir o inhibir el desarrollo de este proceso y el conocimiento de los mismos es esencial para diseñar nuevas entidades que interfieran en la carcinogénesis. En la Figura 12 se han resaltado los tres mecanismos en los que se centra este estudio:

- mecanismos antioxidantes
- inhibición de la proliferación celular a través de alteraciones en su ciclo

Introducción

- apoptosis

1.4.1. Estatus Redox, estrés oxidativo y Egr-1

Las reacciones redox son esenciales en innumerables procesos biológicos y ayudan a mantener las funciones vitales celulares. Tal es el caso de la respiración celular aeróbica, donde la glucosa es oxidada hasta CO₂ y el oxígeno es reducido a agua, proceso fundamental de obtención de energía (Pagel JI, 2012). Múltiples enzimas y coenzimas contribuyen a estos procesos redox actuando de agentes oxidantes y/o reductores, como la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). Estos agentes son esenciales, también, en la producción y eliminación de las especies reactivas del oxígeno (ROS), un grupo heterogéneo de moléculas con alta reactividad que surgen como subproducto de reacciones redox metabólicas (Hayes P, 2012). Entre las numerosas entidades que forman este grupo hay que destacar los radicales libres, como el anión superóxido (O₂⁻), el óxido nítrico (NO) o el radical hidroxilo (·OH), y moléculas oxidantes como el agua oxigenada (H₂O₂) o el ácido hipocloroso (HClO).

Las ROS, en concentraciones fisiológicas, son necesarias en la mediación de la señalización celular (Circu ML, 2010), son partícipes en la activación de la apoptosis para la eliminación de células dañadas y son indispensables en la defensa inmune. Sin embargo, altas concentraciones de estas especies tienen efectos tóxicos en las células, pudiendo dañar el ADN, oxidar proteínas o causar peroxidación de lípidos (Brieger K, 2012; Ray PD, 2012). Para mantener el correcto balance entre la producción y el consumo o destrucción de ROS, las células cuentan con enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), tiorredoxinas, hemooxigenasas o peroxidases que metabolizan los excesos de las especies reactivas. Además, las células almacenan sustancias antioxidantes, como el ácido ascórbico (vitamina C), el tocoferol (vitamina E), o polifenoles, que colaboran con la eliminación de ROS (Seifried HE, 2007). El estrés oxidativo se produce cuando el equilibrio entre producción y detoxificación de ROS se rompe y está relacionado con la aparición de cáncer (Ralph SJ, 2010; Ziech D, 2011; Afanas'ev I, 2013; Bauer G, 2014) y otras enfermedades como arterosclerosis, diabetes, cataratas, retinopatías, Alzheimer (Mohsenzadegan M, 2012) o Parkinson (Yan MH, 2012).

El estrés oxidativo provoca la activación de numerosas vías de señalización cuya finalidad es promover la síntesis de los “genes redox sensibles”, entre los que se encuentra el gen que codifica el factor de transcripción de la respuesta rápida al crecimiento 1 (Egr-1) (Pagel JI, 2012). La inducción de la expresión de este gen es muy rápida y responde a cambios en diversas señales, como cambios en niveles de factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores y el ya mencionado aumento de ROS. Su activación supone un punto de convergencia entre diversas cascadas celulares y se le atribuyen papeles en el control de la plasticidad sináptica, en la curación de heridas, en la capacidad reproductiva femenina y en el control del crecimiento y la apoptosis (Thiel G, 2002). Se ha visto que en la mayoría de los carcinomas de próstata la expresión de Egr-1 está descontrolada, lo que sugiere que Egr-1 juega un papel importante en la

iniciación de este tipo de tumores y se presenta como una diana interesante para el desarrollo de terapias antitumorales (Pagel JI, 2012).

1.4.2. Ciclo celular

Durante el crecimiento embrionario y el posterior desarrollo, la división celular tiene lugar en cada tejido. La decisión de una célula de dividirse o no tiene una importancia crucial para el organismo. Cuando los mecanismos reguladores que limitan la división celular son defectuosos, las células pueden experimentar dos complicaciones contrarias: una falta de división o una división incontrolada. En el primer escenario se produce una quiescencia mayor de la necesaria para el mantenimiento homeostático de los diferentes tejidos, mientras que en el segundo, al dividirse de forma no programada, puede desencadenarse el desarrollo tumoral (Malumbres M, 2001; Malumbres M, 2009). La división celular en eucariotas tiene lugar en cuatro etapas bien definidas: G₁, S, G₂ y M. Entre los mecanismos de sincronización que determinan el inicio de la división celular y aseguran el paso ordenado a través de estos acontecimientos, juegan un papel fundamental las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las ciclinas, los inhibidores de las CDKs, (CKIs), la fosforilación de proteínas, la localización intracelular de diferentes proteínas reguladoras del ciclo, los puntos de restricción y de control de daños del ADN (Kastan MB, 2004) y el punto de control del huso mitótico (Figura 13) (Vermeulen K, 2003; Lehninger AL, 2009).

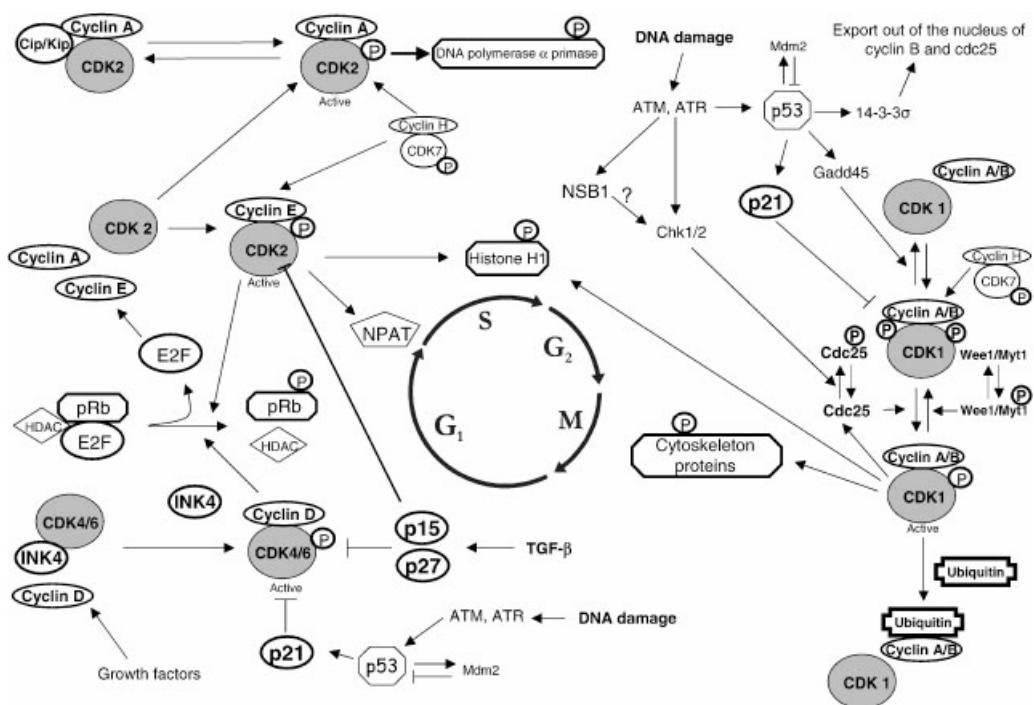


Figura 13: Etapas del ciclo celular y su principal regulación (Vermeulen, 2003)

1.4.2.1. Fases del ciclo celular

Fase G₁: es la primera fase del ciclo y comprende el periodo entre el nacimiento

Introducción

de la célula y el comienzo de la replicación del ADN. Durante este periodo la célula, con una dotación cromosómica 2n, dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de ARN, proteínas y otros componentes. Esta fase suele dividirse en temprana y tardía, separadas por un punto de control llamado *punto de restricción R*, en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria y que las condiciones ambientales son favorables. En un ciclo celular de 24 horas, esta fase tiene una duración de entre 6 y 12 horas.

Fase S: es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN. La dotación cromosómica varía desde 2n, al comienzo, hasta 4n al final de la fase. Su duración media varía entre 6 y 8 horas.

Fase G₂: este periodo comienza cuando todo el ADN se ha replicado, y por tanto, la célula tiene dos juegos diploides completos de cromosomas (4n), y termina cuando comienza la mitosis. En esta fase se encuentra el *punto de control G/M*, en el que la célula comprueba que ha duplicado la masa, de forma que pueda dar lugar a dos células hijas, y que ha completado la replicación de ADN, sólo una vez y sin errores. Su duración media es de 3 a 4 horas.

Fase M o Mitosis: en esta fase, que dura aproximadamente 1 hora, se produce la división del núcleo e incluye 4 subfases distintas: profase, metafase, anafase y telofase. La mitosis culmina en la citocinesis, es decir, la división del citoplasma llevando a la formación de dos células nuevas. En esta fase está el *punto de control del huso mitótico*, que comprueba la correcta alineación de todos los cromosomas.

Además de estas fases cíclicas hay una quinta, la fase G₀: tras la mitosis las células pueden volver a G₁ y recomenzar el ciclo o ir a fase G₀, y no replicarse de nuevo. En esta fase se encuentran las células en quiescencia, células con dotación cromosómica 2n, que mantienen una actividad de síntesis basal de ARN y proteínas, como neuronas o células del músculo cardiaco.

1.4.2.2. Regulación del ciclo celular

Las CDK son una familia de proteín quinasas serina/treonina, cuyos niveles se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular. Se activan en puntos concretos del ciclo celular por la unión de subunidades reguladoras conocidas como **ciclinas**, cuyos niveles van aumentando y disminuyendo a lo largo del ciclo y, cuando están activadas, fosforilan proteínas concretas, induciendo procesos de control. Además, la fosforilación en residuos concretos de treonina y tirosina regula la actividad de las CDK, al inducir cambios conformacionales que facilitan la unión con las ciclinas.

Se conoce un gran número de CDK pero sólo CDK1, CDK2, CDK4, y CDK6 están relacionadas directamente con el control del ciclo celular. A su vez hay cuatro tipos de ciclinas, que se unen a las distintas CDKs en fases específicas del ciclo:

- Los complejos ciclina D-CDK4 y CDK6 son esenciales para la entrada en G₁.
- El complejo ciclina E-CK2 regula la progresión de la fase G₁ a la fase S.

- El complejo ciclina A-CDK2 actúa en la fase S.
- El complejo ciclina A-CDK1 actúa en la fase tardía de G₂, promoviendo la entrada a M.
- El complejo ciclina B-CDK1 regula la mitosis.

La actividad de las CDK está contrarrestada por proteínas inhibidoras del ciclo celular, llamadas inhibidores de CDKs o CKIs, que se agrupan en dos familias: la familia INK4 y la familia Cip/Kip.

Familia INK4: está formada por p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), y p19 (INK4d). Estos inhibidores forman complejos estables con las CDKs, bloqueando su unión con las ciclinas (Ortega S, 2002).

FamiliaCip/Kip: que incluye p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2) p57 (Kip2), actúan inhibiendo los complejos CDK-ciclina. p21 además inhibe la síntesis de ADN. Estos inhibidores están regulados por señales internas y externas, p21 está controlado transcripcionalmente por el gen supresor de tumores p53, mientras que la expresión de p15 y la activación de p27 aumentan en respuesta al factor de crecimiento transformante beta (TGF-β).

La actividad CDK está también regulada por puntos de control que previenen la progresión celular hasta asegurar que la fase anterior ha concluido.

Punto de control de daños en el ADN: Se encuentra en 2 fases del ciclo, antes de entrar en fase S (punto de control G₁-S) o tras la replicación (punto de control G₂-M) (Kastan MB, 2004). El primero es dependiente de p53; los niveles de esta proteína aumentan rápidamente en respuesta a daño en el ADN, poniendo en marcha la transcripción de diferentes genes entre los que se encuentran p21, Mdm2 y Bax. p21 frena el ciclo y Mdm2 se une a p53, inhibiendo su actividad transcripcional y contribuyendo a su degradación por ubiquitinación. Ciertas proteínas quinasa, como ATM y ATR, fosforilan y activan p53 en respuesta al daño en el ADN (Bartek J, 2004). Cuando el daño se detecta en el punto de control presente en G₂-M la célula es capaz de bloquear el ciclo con y sin p53, gracias a las proteínas quinasas Chk1 y Chk2, que se activan a través de ATM y fosforilan Cdc25, inhibiendo su actividad y promoviendo la unión de éste a 14-3-3, evitando de esta manera la activación del complejo CDK1-ciclina B e impidiendo así la entrada de la célula en mitosis.

Punto de control del huso mitótico: en este punto se controla el correcto alineamiento de los cromosomas en el huso mitótico, para asegurar la correcta segregación de las cromátidas entre las células hijas. Si se detecta anomalía el ciclo se frena en metafase (Musachio A, 2007; Bolanos-García VM, 2014).

1.4.3. Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada, descrito por primera vez en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie (Kerr JF, 1972), que juega un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis tisular al eliminar células

Introducción

innecesarias o dañadas (Mondello C, 2011). Se calcula que cada segundo un millón de células son eliminadas del cuerpo humano por este mecanismo. Este proceso continuo de crecimiento, proliferación y muerte es esencial para el funcionamiento óptimo de prácticamente todos los tejidos y órganos y debe ser coordinado de manera precisa. Si la proliferación falla, o la muerte celular se da en exceso, aparecen patologías como enfermedades neurodegenerativas, SIDA, hepatitis C o infarto de miocardio; mientras que si la proliferación supera a la muerte pueden desarrollarse enfermedades autoinmunes o cáncer (Mason EF, 2011). El descenso de apoptosis en células cancerígenas, que promueve una proliferación celular aberrante con acumulación de defectos en el ADN, es un problema en sí mismo; pero a esto hay que sumar que frecuentemente confiere resistencia a la célula frente a los tratamientos (Plati J, 2011). Estos hechos subrayan la importancia del conocimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares que controlan la apoptosis para abordar el problema del cáncer.

1.4.3.1. Vías de activación de la apoptosis

Las señales de muerte celular que inician la apoptosis se procesan principalmente a través de dos rutas bioquímicas: una vía extrínseca, que se inicia mediante receptores de muerte externos, y una vía intrínseca, cuyo componente central es la mitocondria (Figura 14).

Vía extrínseca de activación de apoptosis: se inicia con la unión de un ligando de la familia de los TNF (factores de necrosis tumoral), como por ejemplo FAS o TRAIL, a uno de sus receptores de membrana. Esta unión desencadena el reclutamiento de proteínas que contienen el DD (*death domain*; dominio de muerte) como FADD y procaspasas con DED, la procaspasa-8 y la procaspasa-10. Al complejo que se forma se le llama DISC (*death inducing signaling complex*; complejo de señalización de inducción de muerte), que provoca la autoproteolisis de la caspasa-8 que activa las caspasas ejecutoras, en especial caspasa-3. La caspasa-8 también actúa sobre BID, cuya proteólisis transmite la señal de muerte a la vía intrínseca.

Vía intrínseca de apoptosis: se activa a través de la mitocondria en respuesta a una señal interna, como daño en el ADN que activa p53 o estrés oxidativo. Al recibir estas señales, la membrana de la mitocondria comienza a permeabilizarse liberando al citoplasma proteínas proapoptóticas, como el citocromo c. Se forma el apoptosoma que activa las cascadas de activación de caspasas, activando la caspasa-9 y la caspasa-3.

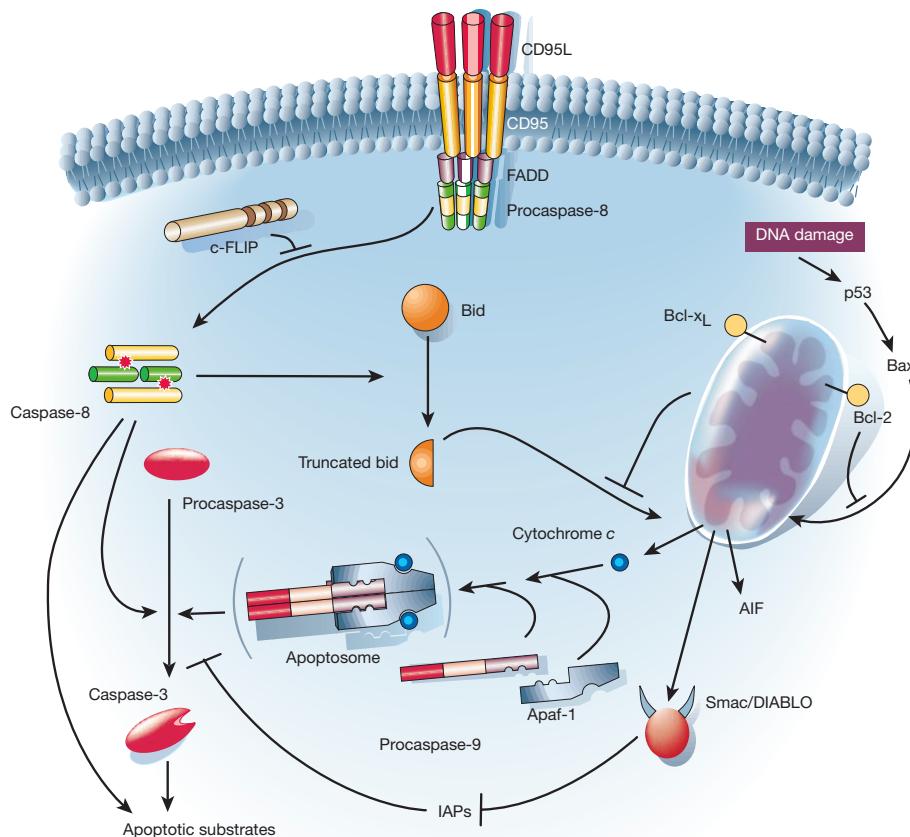
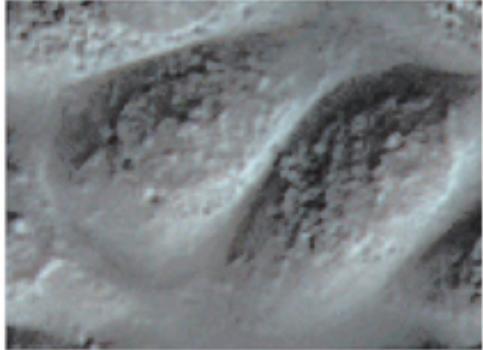


Figura 14: Las dos vías de apoptosis (Hengartner, 2000)

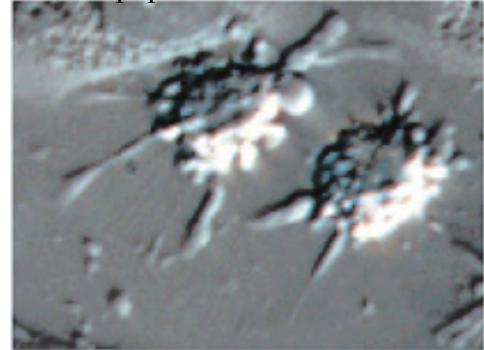
1.4.3.2. Morfología de la apoptosis

La apoptosis está morfológicamente caracterizada por la condensación de la cromatina, la reducción del volumen celular causado por la condensación del citoplasma, la fragmentación del ADN, el colapso del citoesqueleto y la formación de cuerpos apoptóticos que son rápidamente fagocitados y digeridos por macrófagos o células vecinas sin activación del sistema inmune, por lo que no se produce inflamación (Li J, 2008). El reconocimiento de las células apoptóticas por los macrófagos está promovido principalmente por la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática (Ulukaya E, 2011).

Célula viable



Célula apoptótica



Introducción

Figura 15: Morfología de la apoptosis vista al microscopio electrónico (Adaptada de Taylor RC, 2008)

1.4.3.3. Caspasas

A nivel molecular la apoptosis está fundamentalmente controlada por una familia de proteínas conocidas como caspasas. Las caspasas son cisteína proteasas que se sintetizan como proenzimas que requieren de la proteólisis de un dominio inhibidor (prodominio) para su activación. En el cuerpo humano existen 11 genes que codifican 11 caspasas, caspasa-1 a la 10 y caspasa-14. Las caspasas se clasifican generalmente en:

Caspasas iniciadoras: caspasa-1, -2, -4, -5, -8, -9 y -10. Estas caspasas iniciadoras poseen largos prodominios que contienen uno de los siguientes motivos característicos de interacción proteína-proteína, el DED (*death effector domain*; dominio efector de muerte) o el CARD (*caspase recruitment domain*; dominio de reclutamiento de caspasa) y están involucradas en los procesos iniciales de apoptosis.

Caspasas ejecutoras: caspasa-3, -6 y -7. Estas caspasas tienen prodominios cortos y se activan por la acción de las caspasas iniciadoras, actuando tras éstas en los procesos apoptóticos. Son las responsables de la mayor parte de las proteólisis que tienen lugar durante la apoptosis. Proteolizan diversos sustratos (en la literatura se reportan más de 400) entre los que se incluyen proteínas estructurales, reguladores de la transcripción y la translocación, quinasas, mensajeros (Li J, 2008).

2. El selenio

El selenio, que debe su nombre a la diosa griega luna Selene, fue descubierto en 1818 por el químico sueco Berzelius. El selenio fue considerado como un veneno desde su descubrimiento hasta 1957, año en que Schwarz y Foltz lo identificaron como micronutriente en bacterias, mamíferos y aves. La OMS lo introdujo en la lista de elementos traza esenciales para la vida al relacionar zonas geográficas con menor incidencia de cáncer con regiones con altos niveles de selenio en suelo (Shamberger RJ, 1969; Brozmanová J, 2010). El selenio es, además, el único oligoelemento presente en el código genético, formando la selenocisteína. Este aminoácido, al incorporarse a las selenoproteínas, protege a los tejidos y membranas del estrés oxidativo y controla el estatus redox de las células, si bien todavía se desconocen todas sus funciones. (Rayman MP, 2000; Hatfield DL, 2002).

La dieta es la fuente más importante de selenio, presente en los alimentos vegetales y en menor medida en el pescado, los mariscos, las carnes rojas, los granos, los huevos, el pollo, el hígado, el ajo, así como en la levadura de cerveza, en el germen de trigo y en los panes enriquecidos. El alimento más rico en selenio es la nuez de Brasil, una sola nuez contiene 120 µg de este elemento (<http://www.nlm.nih.gov/>). El contenido de selenio en los alimentos está influenciado por la localización geográfica, los cambios estacionales, el contenido en proteína y el procesado del alimento así como la cantidad de mineral que estaba presente en el suelo donde la planta creció, en el caso de los vegetales (Reilly C, 2006).

Las formas químicas de selenio presentes en los distintos grupos de alimentos son (Rayman MP, 2008; Rayman MP, 2012):

- Selenometionina (SeMet)

Análogo selenado del aminoácido (Aa) metionina, presente en cereales, levaduras y suplementos alimenticios.

- Selenocisteína (SeCys)

Análogo selenado de la cisteína, presente en animales por su presencia en las selenoproteínas.

- Selenoneína

2-selenil- $N_{\alpha}, N_{\alpha}, N_{\alpha}$ -trimetil-L-histidina, presente en pescado.

- *Se*-metilselenocisteína (MeSeCys) y γ -glutamil-*Se*-metilselenocisteína

Se encuentran en fuentes vegetales, como levaduras enriquecidas, ajo, cebolla y brócoli.

- Selenito sódico (Na_2SeO_3) y selenato sódico (Na_2SeO_4)

Componentes de los suplementos alimenticios y presentes ocasionalmente en aguas.

Introducción

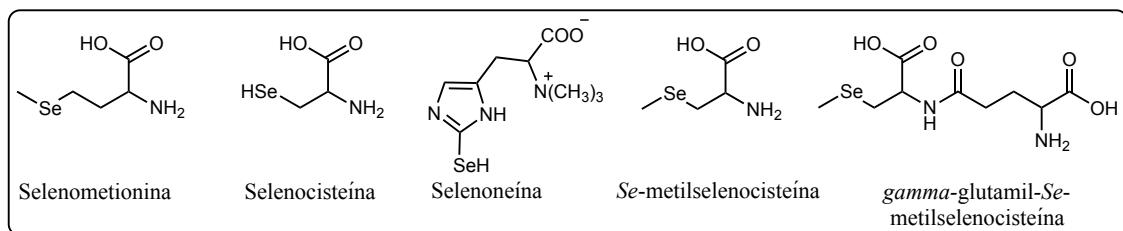
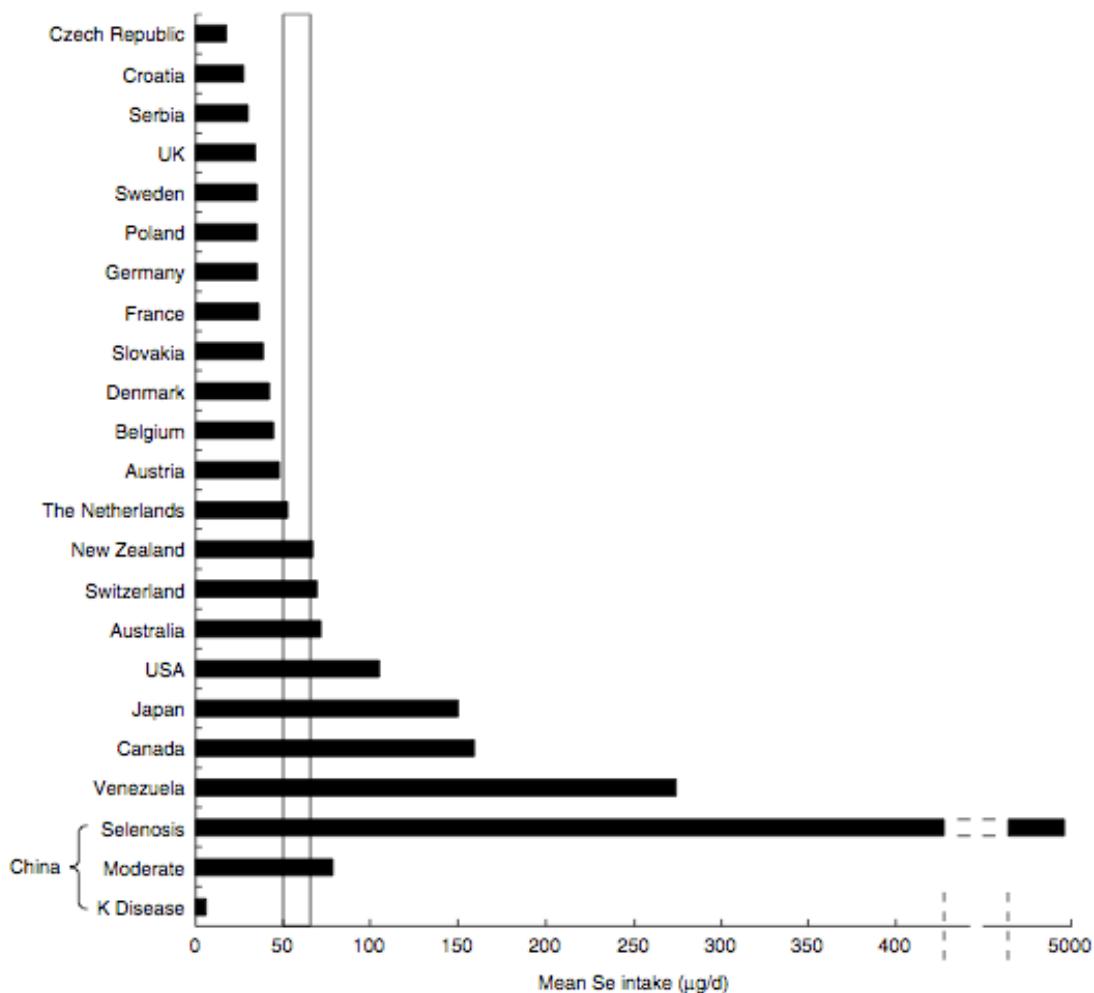


Figura 16: Estructuras químicas de los compuestos selenados presentes en los alimentos

La US Food and Nutrition board (1980) determinó en 50-200 µg/día la cantidad diaria recomendada de ingesta de selenio (Valdiglesias V, 2010), ya que la acción favorable que ejerce el selenio sobre la salud está condicionada a su concentración en el organismo. La ingesta de selenio varía enormemente de una región geográfica a otra, en un intervalo que abarca desde muy deficiente (7 µg/día) hasta concentraciones muy elevadas (4990 µg/día) (Gráfica 2). En Venezuela, Canadá, Estados Unidos y Japón la ingesta es adecuada, mientras que en Europa es inadecuada, 40 µg/día, hecho que se agrava en los países de Europa del este. Es destacable el caso de China, con regiones que van desde el déficit hasta el exceso (Rayman MP, 2012).



Gráfica 2 Niveles medios de selenio ingeridos en la dieta (µg/día) en varios países (Rayman MP, 2005)

2.1. Selenio y salud

El exceso de selenio en el cuerpo humano es tóxico, pudiendo causar **selenosis**, una afección que provoca pérdida del cabello, problemas en las uñas, náuseas, irritabilidad, fatiga y daño nervioso leve. Por otro lado, una deficiencia en selenio puede causar enfermedades o tener efectos adversos sobre la salud.

2.1.1. Enfermedades causadas por déficit de selenio en el organismo

- La enfermedad de Keshan

Es una forma endémica de cardiomielitis causada por una deficiencia de selenio que lleva a que se presente una anomalía del músculo cardíaco. Dicha enfermedad se cobró la vida de muchos niños en la China, hasta que se descubrió su relación con el selenio y se comenzó a suministrar en los suplementos (Chen X, 1980; Chen J, 2012).

- La enfermedad de Kashin-Beck

Ocasionalmente provoca problemas articulares y óseos (Yao Y, 2011).

- El cretinismo endémico mixedematoso

Produce retraso mental (Dumont JE, 1994).

2.1.2. Efectos adversos en el mantenimiento de la salud por déficit de selenio

- Función inmune

Numerosos estudios sugieren que la deficiencia de selenio va acompañada de una pérdida de inmunocompetencia (McKencie RC, 1998; Huang Z, 2012).

- Infecciones virales

La deficiencia está unida a la aparición, virulencia o la progresión de algunas enfermedades virales (Taylor EW, 1997; Harthill M, 2011). Estudios *in vitro* muestran que el selenio es un potente inhibidor de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana, VIH (Sappey C, 1994). También aparece como protector en individuos infectados con el virus de la hepatitis (B o C), evitando la progresión hacia cáncer de hígado (Yu SI, 1997).

- Reproducción

El selenio es esencial para la fertilidad masculina ya que es necesario en la biosíntesis de testosterona y la formación y correcto desarrollo de los espermatozoides (Behne D, 1996; Ahsan U, 2014).

- Humor

La deficiencia de selenio se ha asociado con un aumento significativo en la incidencia de la depresión, así como de la ansiedad, confusión y hostilidad (Benton D, 1990; Hawkes WC, 1996).

Introducción

- Función tiroidea

La glándula tiroidea es el tejido con mayor contenido en selenio, siendo esencial para la síntesis de la forma activa de la hormona tiroidea (Rayman MP, 2012; Köhrle J, 2013).

- Enfermedad cardiovascular:

La prevención de complicaciones cardiovasculares está relacionada con el papel que tienen las selenoproteínas en prevenir las modificaciones oxidativas de los lípidos, inhibir la agregación plaquetaria y reducir la inflamación (Rayman MP, 2000; Rayman MP, 2012).

2.1.3. Selenio y cáncer

Alrededor de 200 estudios en animales han evaluado los efectos de una nutrición rica en selenio en la carcinogénesis. De éstos, dos tercios han concluido que altos niveles de selenio en la ingesta reducen el desarrollo de tumores, mientras que una minoría no encontró dicha relación. Sin embargo, por el momento es difícil generalizar y extrapolar estos resultados a humanos, ya que estos estudios generalmente usan dosis al menos 10 veces superiores a la dosis clínica requerida (Rayman MP, 2005).

Se han realizado hasta la fecha diversos estudios epidemiológicos para estudiar la relación entre el selenio y el cáncer. El primero, publicado por Schrauzer en 1977 evaluó la correlación entre la ingesta de selenio y la mortalidad debida al cáncer. Se estudiaron 17 tipos de cáncer y la cantidad de selenio se estimó con el consumo de comida en 27 países diferentes. Constataron que existían correlaciones inversas entre la ingesta de selenio y la mortalidad debida a los cánceres de intestino, recto, próstata, mama, ovario, pulmón y leucemia (Schrauzer GN, 1977).

Desde 1983 hasta 1991 se realizó el *Nutritional Prevention of Cancer Trial* (NPCT) cuyo objetivo era evaluar la disminución de cáncer de piel al suministrar a los pacientes un suplemento de 200 µg/día de selenio. Si bien los resultados no corroboraron dicha disminución, en general se produjo una reducción del 37% en la aparición de cáncer (incluyendo todos los tipos de cáncer), destacando la reducción del 63% en la aparición de cáncer de próstata en el grupo que recibió la suplementación (Clark LC, 1996).

En 1999 se presentaron los resultados del estudio cuyo objetivo era mostrar la prevención de la formación de nuevos adenomas malignos al suministrar una suplementación alimenticia de selenio y otros antioxidantes a pacientes que ya presentaban este tipo de cáncer. Tras cinco años de estudio, los científicos observaron una reducción del 50% en la aparición de adenomas malignos, tanto en el intestino grueso como en el recto, entre quienes habían tomado selenio y otros antioxidantes (Bonelli L, 1999).

A raíz de estos resultados tan prometedores se han ido desarrollado otros estudios, siendo muy relevante, por su magnitud, el *Se and Vitamin E Chemoprevention Trial* (SELECT), diseñado para determinar si el selenio (en forma de selenometionina) y la

vitamina E, por separado o combinados, reducen el riesgo de desarrollar cáncer de próstata en hombres sanos (Lippman SL, 2005). Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos no mostraron ninguna relación entre el selenio y la vitamina E y la prevención del cáncer de próstata, por lo que el estudio se paró en el 2008 (Lippman SL, 2009).

Una de las teorías más aceptadas, que explicaría el resultado negativo de este estudio, es que la selenometionina (SeMet) administrada no es la forma química de selenio más adecuada (El-Bayoumy K, 2005; Weeckley CM, 2013). Los datos preclínicos que existen sobre el tema muestran, en ensayos con animales, que la metilselenocisteína (MeSeCys) es mejor agente quimiopreventivo que la SeMet. En el NPCT se administró a los sujetos levadura enriquecida con Se, que contiene varias formas químicas de este elemento, entre las que se encuentran la SeMet y la MeSeCys. Se concluye que la acción quimiopreventiva del suplemento con Se mostrada en el NPCT, es debida a otras formas del selenio distintas de la SeMet, o incluso a una combinación de efectos causados por varias de estas formas presentes en la levadura enriquecida (El-Bayoumy K, 2009).

2.2. Metabolismo del selenio

Entre los mecanismos implicados en la acción antitumoral del selenio se han descrito la reducción del daño del ADN (Rayman MP, 2005), el estrés oxidativo (Drake EN, 2006; Pinto JT, 2007), la inflamación, la inducción de conjugados de enzimas en fase II que detoxifican carcinogenes, el aumento de la respuesta inmune (Ryan-Harshman M, 2005), la acción de las selenoproteínas, la alteración de la metilación del ADN en los genes supresores de tumores (Yu YP, 2007; Ramachandran K, 2007), la inhibición del ciclo celular (Klein EA, 2004) y la angiogénesis e inducción de apoptosis (Wang Z, 2002; Nadiminty N, 2008).

El selenio por sí mismo no es anticáncero. La actividad biológica del selenio es el resultado de la acción de una gran variedad de sus metabolitos. Este efecto biológico no es órgano-específico, y pequeñas modificaciones en la estructura de los compuestos pueden tener efectos sorprendentes en su actividad biológica. A su vez, el selenio puede mostrar diversos tipos de actividades anticánceras dependiendo de la dosis. Dichas actividades pueden ser ejecutadas por algunas enzimas dependientes de selenio (a dosis de selenio bajas), o por determinados metabolitos de selenio generados cuando la cantidad de este elemento es mayor (Combs GF Jr., 1998) (Figura 17). Así pues, el selenio, dependiendo de su concentración, provoca distintos efectos en la carcinogénesis.

Introducción

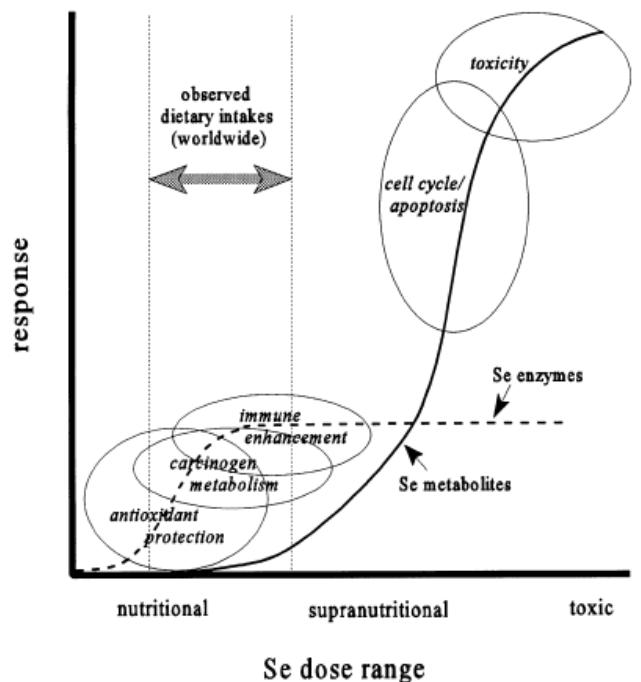


Figura 17: Modelo de dos etapas de la acción quimiopreventiva del selenio. (Combs GF Jr., 1998).

Los diferentes compuestos de selenio se metabolizan a través de distintas vías y mecanismos en el organismo, como se puede observar en la Figura 18, de donde se infiere que el efecto anticancerogénico del selenio varía en gran medida según la forma química de ingesta del mismo.

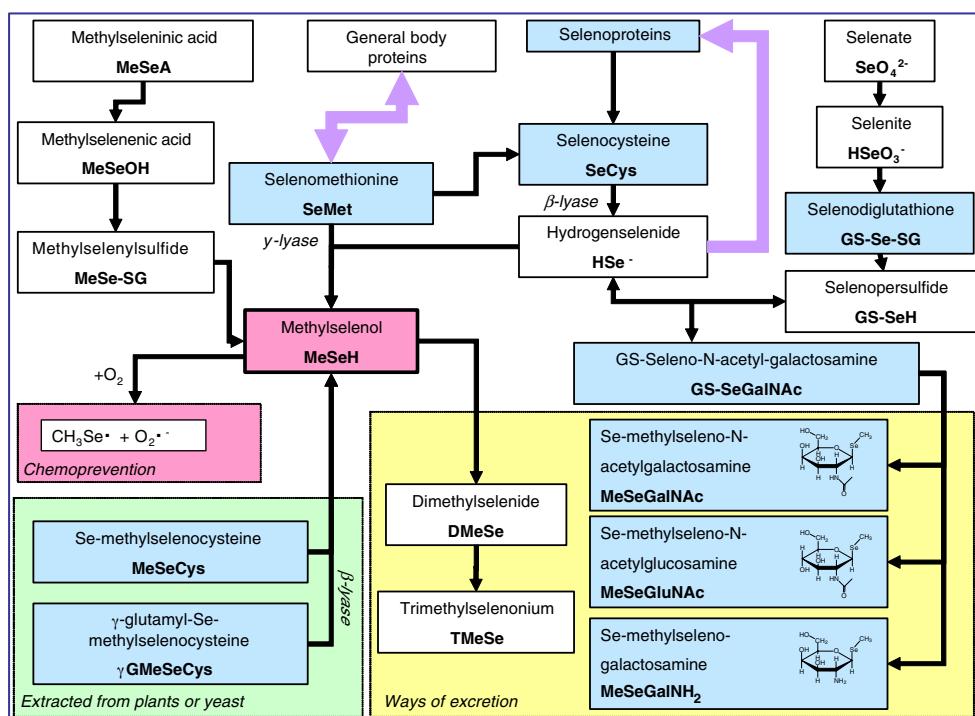


Figura 18: Esquema del metabolismo humano del selenio (Gammelgaard B, 2008).

De todas las especies selenadas formadas en la ruta metabólica de selenio, se ha demostrado la eficacia anticancerosa de cuatro metabolitos (Drake EN, 2006):

- las selenoproteínas
- el seleniuro de hidrógeno (H_2Se o HSe^-)
- el metilselenol ($MeSeH$)
- los compuestos inorgánicos de selenito.

La SeCys y la SeMet deben metabolizarse a MeSeH para ejercer su actividad antitumoral. Tras la digestión, el selenio se metaboliza a MeSeH, que es fisiológicamente activo, o se incorpora a las enzimas antioxidantes y otras selenoproteínas. La generación de MeSeH a partir de compuestos de selenio está mediada por enzimas como la γ -glutamil SeMeSeCys β -liasa o la L-metionina- α -diamino- γ -mercaptometano liasa, también llamada metioninasa. Si el precursor contiene el selenio metilado la transformación es directa. Los compuestos no metilados forman primero un intermedio, el H_2Se , que es metilado *a posteriori* enzimáticamente. El H_2Se es, a su vez, un precursor necesario en la síntesis de selenoproteínas (Nadiminty N, 2008).

2.3. Efectos del selenio sobre la carcinogénesis

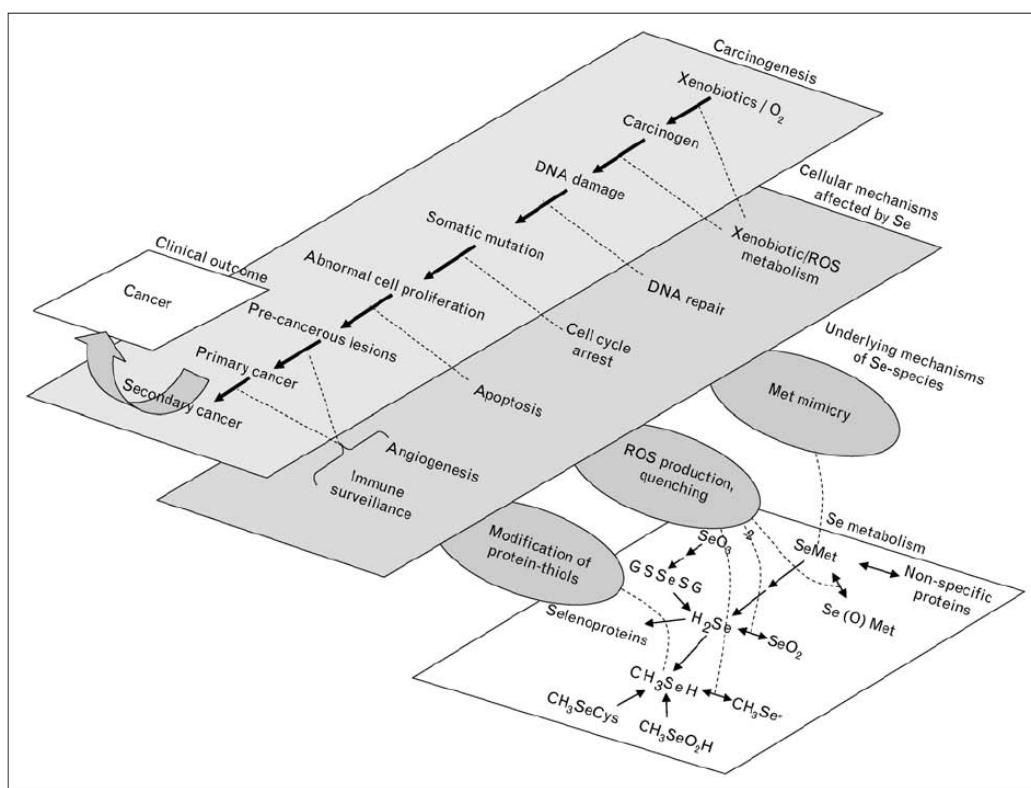


Figura 19: Mecanismos celulares y moleculares de la carcinogénesis afectados por los metabolitos de selenio (Jackson MI, 2008)

La anticarcinogénesis del selenio puede considerarse como un proceso en varios niveles, en el cual las acciones químicas y bioquímicas de los metabolitos del Se se traducen en cambios en el riesgo de desarrollar cáncer a través de mecanismos intermedios moleculares y celulares (Figura 19).

Introducción

2.3.1. Expresión de genes

Los estudios en cultivos celulares utilizando SeMet o MeSeH muestran alteraciones en la expresión de genes asociados con la proliferación celular y la apoptosis. Estudios realizados *in vivo* describen sobreexpresión de genes del metabolismo de xenobióticos y receptores de prostaglandina y reducción en la expresión de distintos oncogenes, entre ellos el oncogén Vav2 (Jackson MI, 2008).

2.3.2. Daño y reparación del ADN

El selenito sódico induce daño en el ADN, rompiendo la doble hélice y produciendo delecciones en levaduras. Este efecto ha sido descrito tras el tratamiento con SeMet o MeSeH (Letavayová L, 2006). El daño inducido por el selenito en células mamíferas malignas se ha asociado con la inducción de los genes p53 y p58 y la inducción de apoptosis independiente de caspasas (Rudolf E, 2008).

La mayoría de las selenoproteínas influyen en el mantenimiento de un estado redox adecuado de la célula y de los componentes celulares, incluido el ADN. En concreto, se ha demostrado como el selenio modula la actividad del gen supresor tumoral p53 por medio de modificaciones redox de Cys₂₇₅ a Cys₂₇₇ mediante el factor Ref1 (Seo YL, 2002), induciendo la expresión de factores de reconocimiento de daños y aumentando la tasa de reparación, con la consecuente protección del ADN (Fischer JL, 2007).

2.3.3. Vías de señalización

El impacto del selenio en las vías de señalización varía con la forma química de selenio: mientras que en el tratamiento de células tumorales el selenito aumenta la regulación de algunas proteínas quinasas, reduciendo la fosforilación de otras, el MeSeH actúa causando los efectos opuestos. Por su parte la SeMet activa la vía de las caspasas y el proteosoma (Ghose A, 2001; Sanmartín C, 2011; Brigelius-Flohe R, 2013; Zhang W, 2014).

2.3.4. Ciclo celular y apoptosis

Cultivos celulares y estudios de tumores muestran que el selenio puede parar el ciclo celular en diferentes etapas: el selenito provoca arresto del ciclo en la fase S, dando lugar a una apoptosis independiente de caspasas; mientras que el selenio metilado lo hace en fase G₁, activando la apoptosis mediada por caspasas (Sanmartín C, 2008; Sanmartín C, 2012; Zheng H, 2009).

2.3.5. Metástasis

Tanto el selenito como la SeMet pueden inhibir el crecimiento de tumores

secundarios en animales a través de la alteración de la expresión del gen de colágeno, siendo este efecto mayor con la SeMet. También se ha demostrado que la SeMet reduce la invasión de células tumorales reduciendo las ROS (Jackson MI, 2008; Chen YC, 2013).

2.3.6. Antiangiogénesis

La angiogénesis es el proceso fisiológico de formación de vasos sanguíneos nuevos, a partir de vasos preexistentes, necesario durante el desarrollo embrionario, el crecimiento del organismo y la cicatrización de las heridas, siendo además, un proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral.

Se ha descrito que el tratamiento con selenio puede afectar al desarrollo microvascular de tumores animales (Jiang C, 2002). El mismo grupo de investigación ha demostrado, a su vez, que la parada del ciclo celular con compuestos metilados de selenio en células endoteliales microvasculares está asociada con la reducción de la densidad microvascular tumoral (Wang Z, 2008). La efectividad, con respecto a este mecanismo de acción, de las formas metiladas de selenio es mayor que la del selenito (Li GX, 2008). Este efecto puede proporcionar una sinergia terapéutica con fármacos anticancerígenos (Bhattacharya A, 2008).

2.4. Papel de las selenoproteínas

El cuerpo humano posee 25 selenoproteínas, esenciales para el mantenimiento de la salud (Kriukov GV, 2003; Zhang Z, 2014). Las selenoproteínas contienen SeCys en su centro activo, aminoácido que puede obtenerse a partir de la dieta, como se ha descrito anteriormente, o sintetizarse a partir de la SeMet en el organismo (Navarro-Alarcón M, 2008). Las selenoproteínas más importantes son:

- Glutatióperoxidasa (GPxs)

Familia formada por 5 enzimas antioxidantes que reducen el estrés oxidativo al eliminar el peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de lípidos, fosfolípidos y colesterol (Reeves MA, 2009; Touat-Hamici Z, 2014). En un estado de déficit de selenio su síntesis es prioritaria. El déficit de estas enzimas provoca cardiomiopatías y puede llevar al desarrollo de diversos tipos de cáncer (Lubos E, 2011; Yuzhalin AE, 2012).

- Iodotironinas deiodinasas (DIOs)

Se encargan de activar la hormona tiroidea T₃, desde su forma inactiva T₄ (Schomburg L, 2011; Dentice M, 2013).

- Selenoproteína P (SePP1)

Esta proteína contiene 10 SeCys, siendo el mejor indicador del nivel de este elemento en el organismo (Ashton K, 2009; Xia Y, 2010). Su función principal es distribuir el selenio desde el hígado, a través del sistema circulatorio, al resto de tejidos como cerebro, testículos y riñón. Se le atribuyen funciones antioxidantes y quelantes. Es

Introducción

esencial para la fertilidad masculina (Michaelis M, 2014) y necesaria para el cerebro, ya que el déficit de esta proteína provoca espasticidad (Byrns CN, 2014). Se relaciona también con el cáncer de próstata y otros carcinomas (Penney KL, 2013). Debido a que la mayor parte de selenio en el organismo se encuentra formando parte de SePP1, su déficit afecta a la expresión del resto de selenoproteínas.

- Tiorredoxín reductasas (TrxR)

Proteínas esenciales para el correcto estado redox de la célula. Reducen la tiorredoxina, imprescindible para la síntesis de ADN. Además, están implicadas en la activación de factores de transcripción, proliferación celular y apoptosis (Lothrop AP, 2014).

- Selenoproteína S (SPS1)

Esta enzima cataliza la reducción de puentes disulfuro y peróxidos (Liu J, 2013). Tiene función antiinflamatoria y se cree que protege a la célula del estrés oxidativo en el retículo endoplasmático (Reeves MA, 2009).

Antecedentes y justificación

1. Derivados organoselenados con actividad antitumoral

El interés por la síntesis de derivados orgánicos que contienen selenio es creciente. Este interés se sustenta en el amplio espectro de actividades biológicas mostradas por este tipo de compuestos (Abdel-Hafez ShH, 2008; Naik HR, 2009; Ghosh P, 2013; Guang Q, 2014; Piovan L, 2014) y en la evidencia de su menor toxicidad con respecto a los derivados inorgánicos del Se (El-Bayoumi K, 2004; Nogueira CV, 2011; McKelvey SM, 2014). Un gran número de estos compuestos han sido diseñados para una futura aplicación en el ámbito oncológico (Jeong SL, 2009; Fernández-Herrera MA, 2014; Kim JH, 2014; Roy SS, 2014).

Por su relevancia en el diseño de los derivados sintéticos presentados en este trabajo de investigación, a continuación se describe la actividad biológica de compuestos que contienen Se metilado, compuestos con el grupo cianoselanilo y compuestos con la funcionalidad diseleniuro.

1.1. Derivados metilados de selenio

En los últimos años, se ha reforzado la hipótesis de que los metabolitos en los que el Se se encuentra metilado juegan un papel fundamental en la quimioprevención relacionada con este elemento (Ip C, 2000; Li GX, 2008; Ohta Y, 2008), abriendose también un campo interesante para el desarrollo de agentes quimioterápicos. La presencia de este tipo de derivados en la fisiología, en forma de aminoácidos, y la formación de los mismos en el organismo, por el metabolismo de otras especies no metiladas provenientes de la dieta, refuerzan la relevancia de estos compuestos (Figura 20).

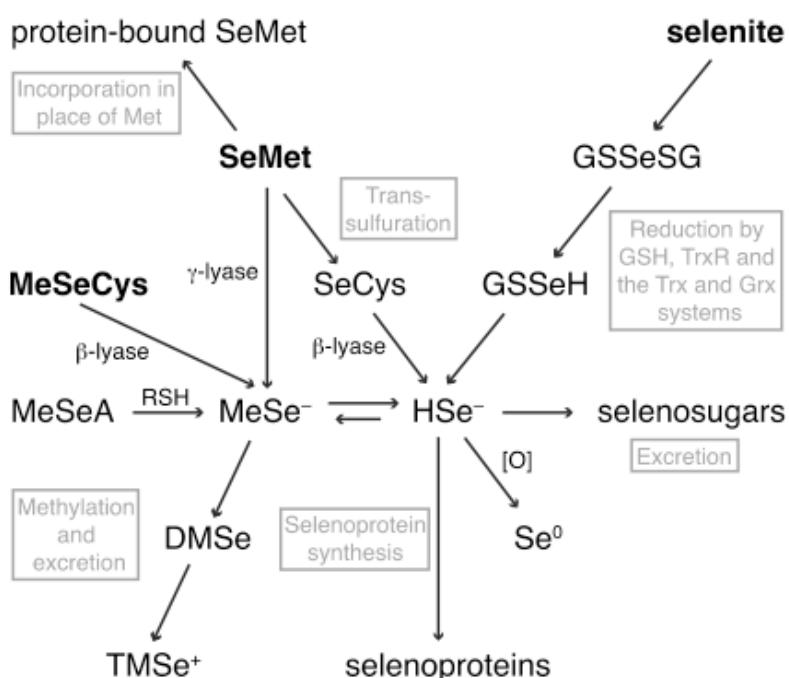


Figura 20: Esquema del metabolismo de tres selenocompuestos presentes en la dieta (Weeckley CM, 2013).

1.1.1. Selenoaminoácidos metilados

Los selenoaminoácidos se presentan como agentes antiangiogénicos muy interesantes, ya que, al formar parte de las moléculas fisiológicas, son bien tolerados por el organismo.

La administración de Se-metilselenocisteína (MeSeCys) provoca la desregulación de numerosos marcadores de supervivencia tumoral (Bhattacharya A, 2012). Se propone su uso combinado con quimioterapias clásicas, con el fin de proteger a las células no tumorales de los efectos citotóxicos de los tratamientos (Li Z, 2009; Bhattacharya A, 2012).

La selenometionina (SeMet) es la forma química de selenio más empleada en los estudios quimiopreventivos realizados con selenio, sin embargo, sus efectos anticancerosos no son los más relevantes dentro del grupo de compuestos selenados (El-Bayoumy K, 2005; Zhao R, 2006; Li GX, 2008). Administrada conjuntamente con la enzima metioninasa, ha demostrado capacidad de inducir apoptosis dependiente de p53, mediada por la producción en exceso del ión superóxido (Zhao R, 2006).

La γ -glutamil-Se-metilselenocisteína es considerada un transportador de MeSeCys, y su mecanismo de acción es muy similar al de este selenoaminoácido (Dong Y, 2001).

1.1.2. Ácido metilselenínico (MeSeA)

El MeSeA es uno de los derivados de selenio más estudiados, siendo uno de los precursores de mtilselenol. El MeSeA induce apoptosis mediada por caspasas, con liberación del citocromo C al citoplasma, ruptura de la Poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y fragmentación del ADN (Jiang C, 2002; Wang Z, 2002). Se cree que esta inducción de apoptosis es consecuencia de un incremento en la concentración de ROS, que produce estrés oxidativo celular (Liu C, 2012). Estudios realizados *in vivo* han demostrado que el MeSeA inhibe la angiogénesis y reduce la presencia de focos metastásicos en cáncer invasivo de próstata (Sinha I, 2012) y cáncer de pulmón (Ren Y, 2013).

Se ha descrito además que el uso combinado de MeSeA con agentes quimioterápicos potencia la eficacia de estos últimos, al favorecer la acción del tratamiento en tumores sólidos que ofrecen resistencia (Yin S, 2012).

1.1.3. Metilselenol (MeSeH)

El MeSeH es considerado uno de los metabolitos críticos que ejercen la acción anticancerosa del selenio (Zeng H, 2010). El MeSeH se genera de forma endógena en el metabolismo de los selenoaminoácidos, como se ha comentado en el apartado Metabolismo del selenio, y por reducción y posterior metilación del selenito, mediado

por enzimas antioxidantes y *S*-adenosilmetionina (SAM) (Fernandes AP, 2012). El MeSeH es un metabolito volátil y muy reactivo, por lo que, para evaluar su mecanismo de acción, es necesario generarla *in situ*. Con este objetivo, habitualmente se administra MeSeA, transformado a MeSeH por reducción (Last K, 2006); SeMet, administrada conjuntamente con la metioninasa, enzima necesaria para su transformación a MeSeH (Kim A, 2007); y MeSeCys, que libera MeSeH por la acción de la β-lisasa (Zhang J, 2010).

El MeSeH es capaz de inhibir la proliferación celular y el crecimiento tumoral en modelos animales de cáncer de próstata (Zhang J, 2010) y de cáncer de colon (Zeng H, 2013). Asimismo, modula la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, induce parada en la fase G1, y la apoptosis, interactúa con el sistema redox de la célula (Fernandes AP, 2012) e inhibe la actividad de la HDAC (Kassam S, 2011). La inducción de apoptosis está mediada por la inhibición de ERK1/2 (extracellular-regulated kinase 1/2) (Zeng H, 2009) y del oncogén c-myc (Zeng H, 2012).

1.2. Derivados conteniendo grupo cianoselanilo

Los derivados cianoselanilo están siendo ampliamente estudiados como agentes quimioterápicos por sus propiedades anticancerosas y antioxidantes (Sk UH, 2010; Krishnegowda G, 2011; Shimada T, 2011; Crampsie MA, 2012; Roy SS, 2014).

Uno de los derivados orgánicos de selenio más estudiado es el 1,4-fenilenbis(metilen)selenocianuro (*p*-XSC), cuya eficacia en la prevención y tratamiento de cáncer *in vitro* e *in vivo* ha sido demostrado. *p*-XSC inhibe múltiples vías de señalización celular que afectan a la proliferación y a la inducción de apoptosis y altera la expresión de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo (Sinha R, 2008). Entre las acciones descritas se encuentran la inhibición de la vía del Akt (Facompre ND, 2010), la alteración de la vía de activación de mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) (Facompre ND, 2012), el incremento en los niveles de glutatión reducido (GSH) (Emmert SW, 2012) y la modulación de enzimas antioxidantes como GPxs, glutatión-S-transferasa (GST), TrxR, SOD o CAT (Sk UH, 2010; Crampsie MA, 2012).

Otro compuesto destacado es el difenilmetselenocianato, que actúa protegiendo el ADN del daño causado por estrés oxidativo, modulando, al igual que *p*-XSC, enzimas antioxidantes (Chakravorty P, 2011; Das JK, 2013).

El ácido kójico y sus derivados se presentan como potentes quimiopreventivos ya que se ha demostrado su capacidad protectora frente al daño producido por radiación (Emami S, 2007; Wang K, 2014) o por ROS (Dung TT, 2014).

Antecedentes y justificación

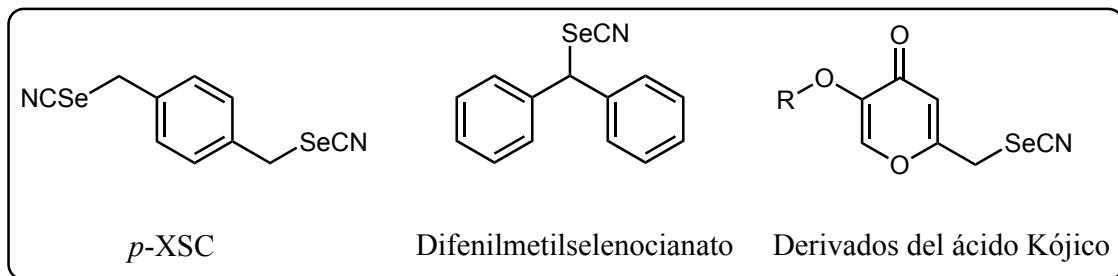


Figura 21: Ejemplos relevantes de derivados cianoselaniilo

1.3. Derivados contenido grupo diseleniuro

Los compuestos que presentan grupo diseleniuro pueden ser buenos fármacos para el tratamiento de enfermedades causadas por estrés oxidativo, como cáncer y Alzheimer. Numerosos estudios han sugerido que la unión Se-Se de estos compuestos mimetiza la actividad peroxidasa del puente disulfuro presente en las GPxs (Nascimento V, 2012; Stefanello ST, 2013; Orian L, 2014; Rakesh P, 2014), protegiendo a las células, con este mecanismo, de los daños causados por las ROS.

El derivado más estudiado de este grupo de compuestos es el difenildiseleniuro (DPDS). Se ha descrito su capacidad de proteger el ADN del daño oxidativo inducido por Tamoxifeno (Melo MT, 2013), por LDL oxidado (Straliotto MR, 2013) y, en modelos animales, del daño inducido por el consumo de tabaco (Luchese C, 2009). Se ha reportado también la capacidad de DPDS de modular la expresión de genes de enzimas antioxidantes, como CAT, SOD, GPx y TrxR, *in vivo* (Straliotto MR, 2013; Roseni Mundstock Dias G, 2014).

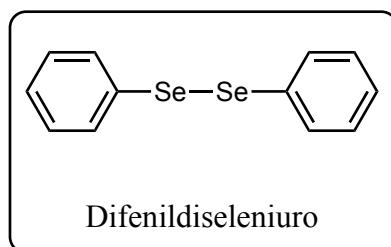


Figura 22: Estructura química del DPDS

2. Antecedentes del grupo de investigación

El grupo de investigación del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra liderado por la Dra. Carmen Sanmartín tiene una gran experiencia investigadora en el desarrollo de compuestos selenados, campo en el que se enmarca esta Tesis doctoral.

En los últimos años se han explorado numerosas estructuras en las que el selenio constituye el elemento principal, obteniendo resultados muy satisfactorios de actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* e *in vivo*. Entre las estructuras presentadas el selenio se encuentra formando parte de diversos grupos funcionales como imidoselenocarbamatos (Plano D, 2007; Ibáñez E, 2011; Ibáñez E, 2012), selenoésteres de carboxietilo (Sanmartín C, 2009; Plano D, 2011; Dominguez-Alvarez E, 2014); selenocianuros y diseleniuros (Plano D, 2011; Baquedano Y, 2014), selenodiazoles (Plano D, 2010; Plano D, 2011) y derivados selenados con anillos de pirido[2,3-*d*]pirimidina y quinazolina (Plano D, 2011; Moreno E, 2012) (Figura 23).

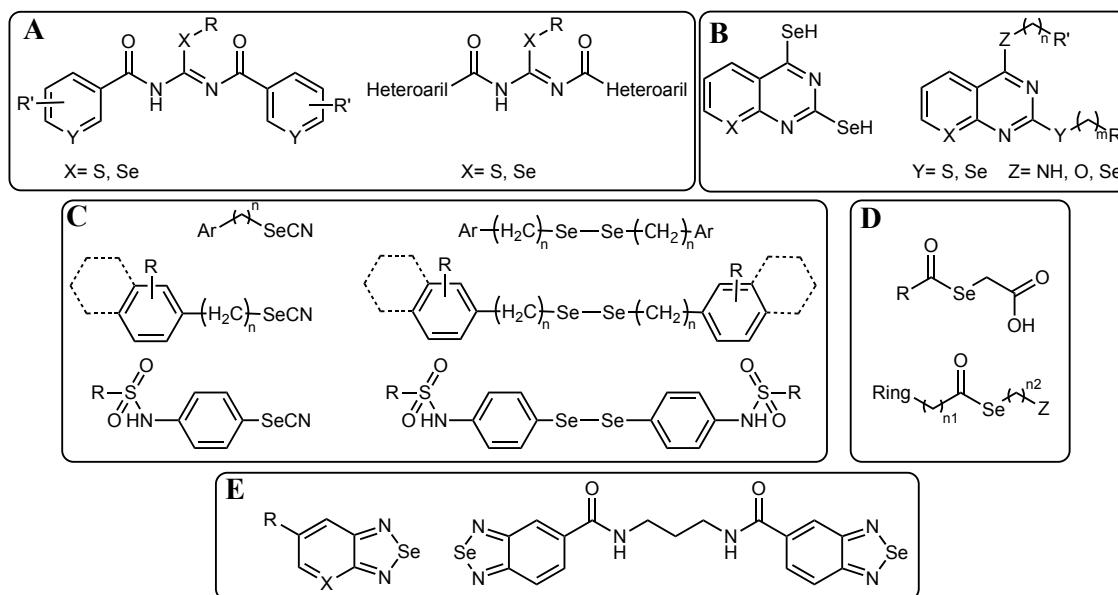


Figura 23: Estructuras de derivados organoselenados publicados por el grupo de investigación. (A) Imidoselenocarbamatos. (B) Derivados selenados con anillos de pirido[2,3-*d*]pirimidina y quinazolina. (C) Derivados selenocianuro y diseleniuro. (E) Selenodiazoles

3. New selenoderivatives as antitumoral agents

10

New Selenoderivatives as Antitumoral Agents

Carmen Sanmartín, Juan Antonio Palop,

Beatriz Romano and Daniel Plano

*Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, University of Navarra
Spain*

En este capítulo del libro Prostate Cancer-Original Scientific Reports and Case Studies. Philippe E. Stiess. ISBN: 978-953-307-342-2 se realiza una amplia revisión de los nuevos selenoderivados que se postulan como agentes quimioterápicos en cáncer de próstata.

New Selenoderivatives as Antitumoral Agents

Carmen Sanmartín, Juan Antonio Palop,
Beatriz Romano and Daniel Plano

*Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry, University of Navarra
Spain*

1. Introduction

Prostate cancer (PC) is the most common male malignancy in Western countries and the second most common urological malignancy (Knudsen & Vasioukhin, 2010). In 2008 the estimated new cases for PC in the European Union were 382.000 (Ferlay et al. 2010). The possibility of early detection is attractive to clinicians and potential patients in spite of the fact that until recently concrete evidence that screening would influence PC mortality was lacking (Schröder, 2010). There are many risk factors for PC occurrence. The family history, genetic and environmental factors and their interaction can contribute to develop PC (Colloca & Venturino, 2011). Other risk factors are age, ethnic-racial-geographic factors, named constitutional factors, though it is not possible to know what percentage of these neoplasms are a result of these risk factors (Ferris-i-Tortajada et al. 2011). The polymorphisms in genes associated with PC probably represent the most part of familial PC burden. The recent advances in genomic research have made it possible to identify several new genomic based biomarkers for PC. These markers are easy to measure and stable over time but only one biomarker, prostate specific antigen (PSA), is used in the clinical today (Aly et al. 2011). The PSA screening allows to detect PC years before the emergence of clinically evident disease, which usually represents locally advanced or metastatic cancer (Gjertson & Albertsen, 2011). Treatment options for advanced PC – including hormone ablation therapy, radiation and surgery – do not offer cure but delay the inevitable recurrence of the lethal hormone-refractory disease. Chemotherapy using available anticancer drugs, with the exception of the taxane drug docetaxel, for late stage PC does not offer any survival benefit. All of these treatments are costly and have significant side effects including impotence and incontinence, which negatively affect the quality of life of the patients. Prevention is an important strategy for limiting PC morbidity and mortality. Pharmacological and dietary interventions have potentials functions in reduction of incident cases and in inhibition of disease progression and recurrence (Silberstein & Parsons, 2010). 5-alpha reductase inhibitors remain the predominant therapy to reduce the future risk of a PC diagnosis. Dutasteride and finasteride are currently the only proven agents for PC risk reduction (Strope & Andriole, 2010). Among the potential dietary intervention efforts to use of the micro-nutrient selenium (Se) in PC clinical trials is emerging as an important highlight and the outcomes indicate that Se is a promising treatment. Furthermore, Se inhibits PC through multiple mechanisms, and it is beneficial in controlling the development of this disease (Abdulah

et al. 2011). Se is an essential trace element for humans, animals and some bacteria and it is important for many cellular processes, cardiovascular disease, central nervous system pathologies and may prevent cancer (Dennert et al. 2011). The evidence that Se is a cancer preventive agent includes that from geographic, animal, prospective and intervention studies (Tabassum et al. 2010, Schmid et al. 2011).

Furthermore, literature reports have consistently shown that the different effects of different chemical forms and dose of Se (Algotar et al. 2011) on signaling and expression of transcripts in PC cells might have important implications in the outcome of ongoing PC prevention clinical trials. These include the forms of Se present in the diet and in the body, their functions and mechanisms of action, and methods employed in assessing an individual's Se nutritional status – both in general and in epidemiological studies into the risk of cancer in relation to diet, as well as in connection with long-term trials for investigating the disease-preventive potential of selenium supplementation. Several mechanisms have been suggested to mediate the anticancer effects of Se. The major ones are reduction of DNA damage; oxidative stress; inflammation; induction of phase II conjugating enzymes that detoxify carcinogens; enhancement of immune response; incorporation into selenoproteins; alteration in DNA methylation status of tumor suppressor genes; inhibition of cell cycle and angiogenesis and induction of apoptosis. The specific mechanisms for PC are the inhibition of androgen receptor (AR) signaling, reduction in the mRNA, and protein levels of the AR, recruitment of corepressors to the AR elements in the promoters of androgen responsive genes, inhibition of signaling pathways like NF- κ B, IL-6, Stat3, and induction of apoptosis (Nadiminty & Gao, 2008) (Figure 1).

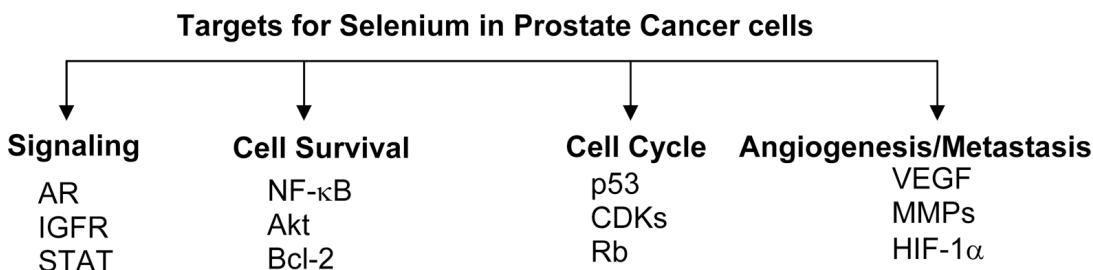


Fig. 1. Schematic representation of cellular processes targeted by Se and some specific molecular targets in each pathway. Figure from Nadiminty & Gao, 2008 with permission from John Wiley and Sons.

The rapid advance in the knowledge of different selenoproteins and their biological functions has opened up new possibilities to increase our understanding of the biological effects of Se supplementation (Rebsch et al. 2006). Selenoprotein deficiency leads to the accelerated development of lesions associated with PC progression, implicating selenoproteins in cancer risk and development and raising the possibility that Se prevents cancer by modulating the levels of these selenoproteins. Recently, it has been reported that the new discovered selenoprotein, SEP15, which is highly expressed in the prostate, may play a role either independently or by modifying the effects of Se in PC survival (Penney et al. 2010). Moreover, further research and additional trials of this type are needed to define the benefits and risks of different types and doses of Se supplements that in the future may be implemented for public health reasons. Another necessary focus for future research is a better understanding of the mechanisms by which Se interferes with the carcinogenic

processes. The direction of future studies lies in clarifying the effects of these products and exploring the biological mechanisms responsible for the prevention of prostate cancer (Fairweather-Tait et al. 2011). This chapter includes information on twenty eight general chemical structures containing Se that have shown either anticancer, chemopreventive or apoptotic activities. Thus, Se derivatives emerge as promising downstream candidates for cancer therapy.

2. Selenoderivatives against prostate cancer

2.1 Methylseleninic acid, sodium selenite and sodium selenate

Some studies have shown that the selenium-based compound methylseleninic acid (MSeA, Figure 2) can disrupt AR signaling in PC cells by reaction with reduced glutathione within the PC cell (Husbeck et al., 2006). On the other hand, it was observed that a combination of MSeA with bicalutamide produced a robust downregulation of PSA through the identification of *hTERT*/telomerase as an important AR target. Telomerase activation has been reported in >90% of prostate cancer samples, but not in normal or benign prostatic hyperplasia tissues. Telomerase activation play an essential role in cell survival and oncogenesis, and inhibition of telomerase has been shown to suppress growth and tumorigenic potential of PC (S.A. Liu et al., 2010). Other mechanisms have demonstrated that the growth inhibitory effect could be attributed to cell cycle modulation and apoptosis induction provoked by MSeA by activation the forkhead box O1 (FOXO1) (H.T. Zhang et al., 2010). This compound has shown efficacy in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model (Wang et al., 2009). Too, it has been investigated in mice model treated with this Se form and were observed changes in its proteome (Zhang et al., 2011). In addition, MSeA exerted a dose-dependent inhibition of DU145 xenograft growth without genotoxic properties (Li et al., 2008). Moreover, in advanced and hormone refractory prostate cancer the efficacy of MSeA is based on down regulating hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) accompanied of a reduction of vascular endothelial growth factor (VEGF) and glucose transporter 1 (GLUT1) (I. Sinha et al., 2011). On the other hand, MSeA inactivated protein kinase C (PKC), particularly the promitogenic and prosurvival epsilon isoenzyme, acting through a redox modification of vicinal cysteine sulfhydryls in the catalytic domain of PKC (Gundimeda et al., 2008). Some metabolites of MSeA such as methylselenol may contribute to their anticancer activities. For example, an upregulation of cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) proteins p21Cip 1 and/or p27Kip 1 was observed in DU145 prostate cancer cells (Wang et al., 2010). Too, a novel mechanism of Se action has been proposed for methylselenol due to its ability to inhibit histone deacetylase (HDAC) (Kassam et al., 2011). Recently, speciation analysis showed that MSeA was completely transformed during the incubations while metabolic conversion of the other Se compounds was limited (Lunoe et al., 2011).

Sodium selenite (Figure 2) is another compound that has been studied in relation to PC and it may modulate the androgen receptor through the repression of interleukin-6 (IL-6) (Gazi et al., 2007). Too, it was observed that selenite decreased HDAC activity and increased levels of acetylated lysine 9 on histone H3, but decreased levels of methylated H3-Lys 9 (Xiang et al., 2008). Other mechanisms of action have been postulated such as an increase of the activity of the tumor suppressor protein (PTEN) and of the thioredoxin reductase (TR) (Berggren et al., 2009). Too, selenite is able to induce cell death and apoptosis by production of superoxide in mitochondria in LNCaP cells (Xiang et al., 2009). In 2010 was reported that

sodium selenite inhibited the lipopolysaccharide (LPS)-induced TLR4-NF- κ B signaling in PC-3 (Pei et al., 2010). Sodium selenite can act alone or in combination with other treatments for PC. So, this compound significantly enhances the effect of radiation on well established hormone-independent prostate tumors and does not sensitize the intestinal epithelial cells to radiation. These results suggest that may increase the therapeutic index of radiation therapy (Tian et al., 2010). In addition, the effectiveness on PC treatment of the association between sodium selenite and docetaxel has resulted as a new strategy in PC therapeutic approach (Freitas et al., 2011). Too, combination of genistein and selenite has shown synergistic effects on apoptosis, cell cycle arrest associated signaling pathways in p53 expression (Zhao et al., 2009). Actually, other inorganic forms of Se as sodium selenate (Figure 2), where Se is in oxidation state + 6, are in Phase I studies and have shown antiangiogenic properties (Corcoran et al., 2010).

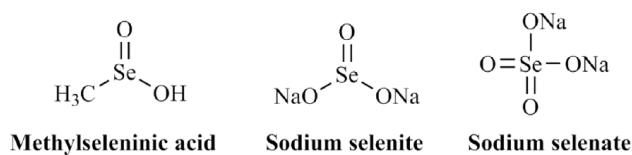


Fig. 2. Methylseleninic acid, sodium selenite and sodium selenate structures.

2.2 Methylselenocysteine and selenomethionine

Se may exert its beneficial effects through incorporation into selenoproteins including, glutathione peroxidases, selenoprotein P, iodothyronine deiodinases and thioredoxin reductases. There are more than 30 selenoproteins that have been identified in humans and they are involved in a range of cellular functions including immune function and protection against lipid and DNA damage. The cancer preventive mechanisms of action of methylselenocysteine (MeSeCys) (Figure 3) in human prostate cells are variable. A mechanism of action proposed for MeSeCys is that can alter the expression of several types of collagen gene and protein expression and thus may impact on the extracellular matrix and alter prostate cell progression and invasion (Hurst et al., 2008). Other authors affirm that the effect is due to methylselenol, a metabolite active in a study carried out in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model by oral administration of MeSeCys (J. Zhang et al., 2010). This hypothesis has been reinforced and completed in 2011 with the inclusion of new metabolites, the α -keto acids analogues of MeSeCys (Pinto et al., 2011). Related to selenomethionine (SeMet) (Figure 3) one of the mechanism that is gaining interest is the HDAC inhibition by metabolites of SeMet accompanied of redox signaling proteins modulation (J.I. Lee et al., 2009). Too, in combination with genistein induced growth arrest with modulation of expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) (Kumi-Diaka et al., 2010). On the other hand, this compound has been employed in order to reduce the toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), an abundant plasticizer environmental contaminant that causes alterations in endocrine and spermatogenic functions mediated by induction of reactive oxygen species (ROS) and activation of nuclear p53 and p21 proteins in LNCaP cells. The SeMet supplementation reduced ROS production with modulation of intracellular redox status that is related to response against testicular toxicity (Erkekoglu et al., 2011). If we consider the possibility of combination between SeMet and other compound for modulating PC development the results are drug dependent. So, SeMet

and alpha-tocopherol do not inhibit prostate carcinogenesis in the testosterone plus estradiol treated NBL rat model (Ozten et al., 2010). However, the selected combination of silymarin and SeMet significantly reduced two markers of lipid metabolism known associated with PC progression (Vidlar et al., 2010). In order to improve the activity and safety inorganic and organic hybrid nanoparticles are potentially useful in biomedicine, mainly for tumor treatments (Choi et al., 2010). Se nanoparticles are safer compared with SeMet isolated and was observed an inhibition of the growth of prostate LNCaP cancer cells partially through caspases mediated apoptosis, Akt kinase modulation and by disrupting AR (Kong et al., 2011).

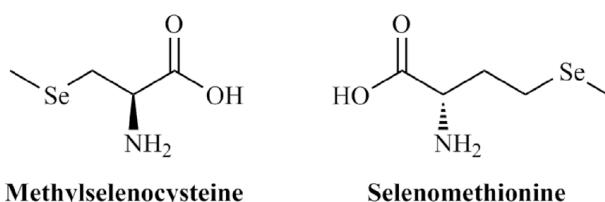


Fig. 3. Methylselenocysteine and selenomethionine structures.

2.3 Selenocyanate derivatives

The first selenocyanate described was 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate (*p*-XSC) (Figure 4). The most recent studies postulate that this compound is capable of altering cofilin-2, single-stranded mitochondrial DNA binding protein, chaperonin 10, nucleoside diphosphate kinase 6 and chain A Horf 6 human peroxidase enzyme in LNCaP cells and in its androgen independent clone (AI) (R. Sinha et al., 2008). Too, this compound can induce apoptosis, inhibits AR expression and decreases Akt phosphorylation (Facompre et al., 2010). Other organic selenocyanates have emerged during the last years. So phenylalkyl isoselenocyanates (Figure 4), isosteric selenium analogues of naturally occurring phenylalkyl isothiocyanates, have shown a reduction in tumor size associated to apoptosis. The structure activity relationship studies concluded that an increase in the alkyl chain length is critical for the activity being $n = 4$, named ISC-4, the optimal (Sharma et al., 2008). In 2011, these same authors have reported that ISC-4 activates prostate apoptosis response protein 4 (Par-4) (Sharma et al., 2011). As a continuation of the synthesis of novel alkyl selenocyanates in 2010 was described the synthesis of substituted naphthalimide based organoselenocyanates (Figure 4) with the alkyl chain length $n = 5$ and investigated their systematic toxicity profile in mice by consideration changes in body weight, hepatotoxicity and nephrotoxicity resulting less toxic than other selenium forms but retaining the efficacy (Roy et al., 2010). Numerous studies have been conducted to elucidate the mechanism underlying the antitumor effects associated with cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibitors. However, this mechanism has not yet been clearly defined. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to retard the progression of PC in men and NSAIDs have been used in clinical trials for prostate cancer. Celecoxib (Celebrex), a specific COX-2 inhibitor, reduces prostate tumors in experimental models mainly through cell cycle regulation and angiogenesis. However, the growth inhibitory properties of Celecoxib may be COX-2 independent. Considering this possible effect a novel strategy

has been proposed based on to combine selenium and COX-2 inhibitor. Considering that sulfonamide moiety and pyrazole ring are important for the proapoptotic activity of Celecoxib against PC, the Selenocoxyib-1 (Figure 4) was synthesized. The structural modifications introduced were the replacement of the trifluoromethyl group by methyleneselenocyanate fragment and the elimination of the methyl group. The study carried out against PAIII cells derived from a metastatic prostate tumor that arose spontaneously in a Lobund-Wistar (LW) rat. In addition, human metastatic prostate cancer cells, PC-3M, were tested for antitumor effect of Selenocoxyib-1 *in vitro*. Selenocoxyib-1 induced apoptosis in a dose-dependent manner in the PAIII cells and resulted more effective against PC than Celecoxib (Desai et al., 2010a). Other modulations have been introduced maintaining the methyl group in order to obtain Selenocoxyib-2 (Figure 4) but it has not been studied as antitumoral yet (Desai et al., 2010b).

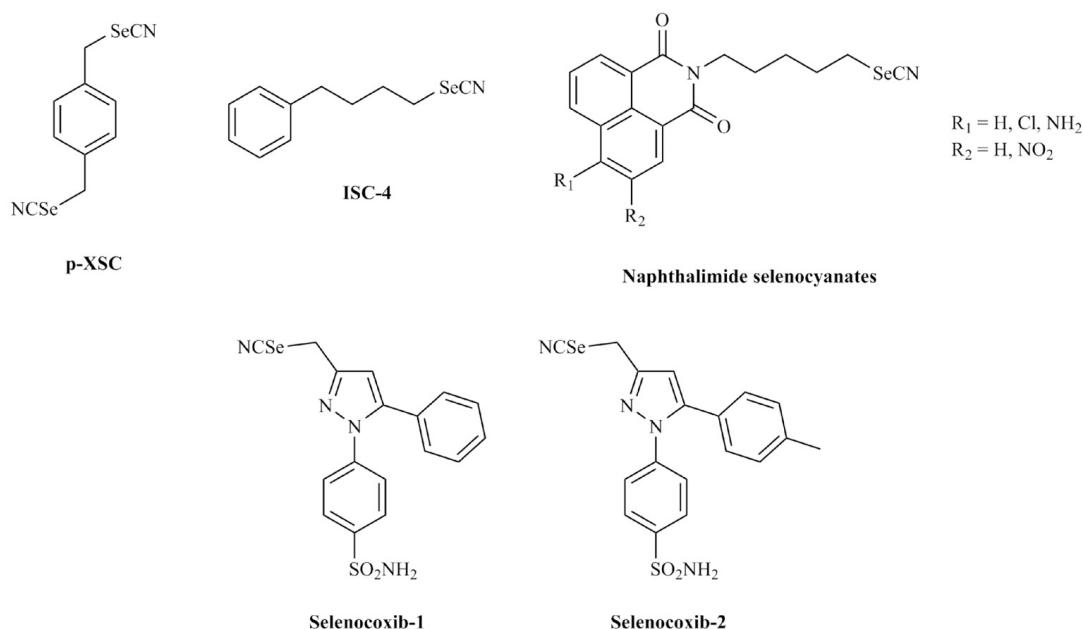


Fig. 4. Chemical structures for selenocyanate derivatives.

2.4 Heterocycles containing selenium

Ebselen (Figure 5) is one of the most relevant heterocyclic compounds derived from selenium. Ebselen is a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound that attenuates the H₂O₂ level. In this process a hydroxylamine spin trap reacts with oxygen-centered radicals, including superoxide. It was seen that this compound blocked the expression of the disintegrin and metalloprotease ADAM9 in LNCaP or C4-2 PC cells through inhibition of ROS production (Sung et al., 2006). In other studies Ebselen was used as an external agent for reverting biochemical processes such as glycolysis. For example, ABC transporters like P-glycoprotein (P-gp/ABCB1), that are membrane proteins responsible for the transport of toxic compounds out of non-malignant cells and tumor

tissue can be modified in their expression by coincubation with ebselen (Wartenberg et al., 2010). Too, it has been used for protecting PC-3 cells against apoptosis induction provoked by curcumin, a potent anticancer agent (Hilchie et al., 2010). On the other hand, ebselen has been reported as a covalent inactivator of α -methylacyl coenzyme A racemase (AMACR), a metabolic enzyme whose overexpression has been shown to be a diagnostic indicator of prostatic adenocarcinoma and other solid tumors and has been employed as reference drug for screening of approximately 5000 unique compounds as AMACR inhibitors (Wilson et al., 2011). In structural relation with ebselen is the organoselenium compound 1,2-bis-[1,2-benzisoselenazolone-3(2H)-ketone]ethane (BBSKE) (Figure 5), which has shown an inhibitory effect on the growth of a variety of human cancer cells, provokes S phase arrest accompanied by increases in the protein levels of cyclin A, E and p21 and decreases in levels of cyclin B1, D1 and Cdk4 (Shi et al., 2003a, 2003b). A recent study carried out in rats affirms that the metabolites of BBSKE can act as antitumoral agents (Zhou et al., 2010). Too, in association with cisplatin increases the sensitivity of the colon cancer cell line LoVo towards cisplatin via regulation of G₁ phase and reversal of G₂/M phase arrest (Fu et al., 2011). The formulation as copolymer micelles allows the accumulation into tumor efficiently due to an increase in water solubility (M. Liu et al., 2010).

D-501036, 2,5-bis(5-hydroxymethyl-2-selenienyl)-3-hydroxymethyl-N-methylpyrrole (Figure 5), has been identified as a novel antineoplastic agent with a broad spectrum of antitumoural activity against several human cancer cells and has an IC₅₀ value in the nanomolar range. This compound induces cell death associated with the DNA damage-mediated induction of ataxia telangiectasia-mutated activation without interfering with topoisomerase-I and topoisomerase-II function (Juang et al., 2007). Another mechanism that has been proposed for the activity of D-501036 is angiogenesis inhibition. Although anti-angiogenesis strategies have generated a great deal of enthusiasm for therapeutic applications, it is still unknown whether these systems would be feasible for prevention. The possibility of interfering very early in tumour progression by modulating the cancer angiogenic switch is appealing, though there is increasing evidence for close correlation between inflammation, the micro-environment and tumour-associated neo-angiogenesis causing the adverse outcomes of prostate cancer (Araldi et al., 2008).

In 2010, a new series of heterocyclic organoselenium compounds were synthesized and evaluated as possible chemopreventive agents in human prostate cancer LNCaP cells. Two of this 3-selena-1-dethiacephem derivatives (Figure 5) strongly activated nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/ antioxidant response element (ARE) signaling that regulate expression of phase II antioxidant and detoxifying enzymes such as glutathione peroxidase (GPX), γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), heme oxygenase-1 (HO-1), NADPH quinone oxidoreductase (NQO-1), and glutathione S-transferase (GST) expression. These two compounds also possessed a potent antioxidant activity. Furthermore, both compounds were capable of inhibiting cell growth via cell cycle arrest. Related to structure activity relationship the presence of the exo-olefin (carbon–carbon double bond) as well as the aliphatic substitution at the imine part is critical for these compounds to activate Nrf2/ARE signaling (Terazawa et al., 2010). Other interesting derivatives are 2-substituted selenazolidine-4(R)-carboxylic acids (Figure 5). There are numerous studies that concern the induction of a protective hepatic enzyme related to glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase and it seemed of interest to evaluate these compounds in PC cells (El-Sayed et al., 2007, Poerschke & Moos 2011).

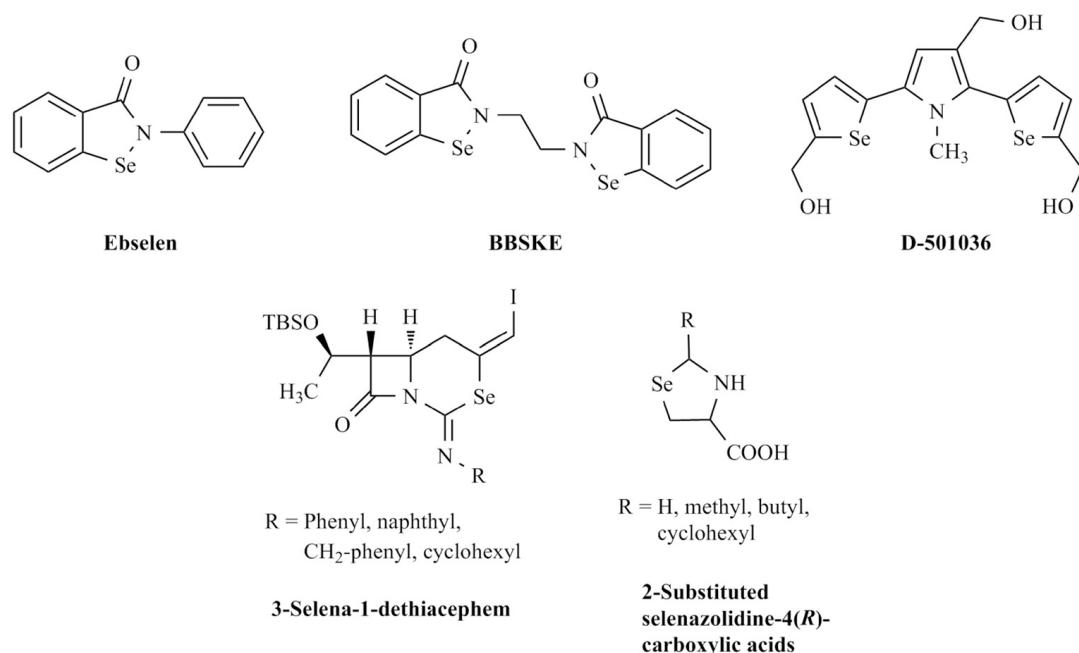


Fig. 5. Chemical structures for heterocycles containing selenium.

2.5 Selenide and diselenide derivatives

The selenide function is present in a lot of organoselenium compounds. Many of the above described derivatives possess this type of bond (i.e. MeSeCys, SeMet,_n). One compound does not described in the above sections is *p*-xylylbis(methylselenide) (*p*-XMS) (Figure 6), a organoselenium compound that modifies the growth, secretion of PSA and the intracellular redox status and genomic profiles (Pinto et al., 2007). Too, the selenide function is present linked to nucleosides. The natural nucleosides may be used as Se-carriers. The synthesis and antitumor activity of novel nucleosides derivatized from uridine and thymidine (Figure 6), with a selenomethyl group at various positions has been described. In general, the activity against PC cells is position-dependent. Compounds with the selenomethyl group in position 5' are more active than the corresponding in 2' or 3'. The probable explanation is that it is easier to metabolize the Se-nucleoside containing the primary selenomethyl than the secondary selenomethyl, thereby generating more methylselenol (Lin et al., 2009). The natural products continue to be a rich source of new promising substances for cancer therapy. Sesquiterpene lactones (SQLs) are a class of naturally occurring plant terpenoids of Asteraceae family, known for their various biological activities such as cytotoxicity against different tumor cell lines. Many authors have linked this activity mainly to the α -methylene- γ -lactone functionality, which is prone to react with suitable nucleophiles, e.g., sulfhydryl groups of cysteine, in a Michael addition mechanism. These reactions are nonspecific, leading to the inhibition of a large number of enzymes or factors involved in key biological in spite of it is well known, however, that the α -methylene- γ -lactone moiety is not an absolute requirement for cytotoxicity. In this context emerge other interesting compounds such as the alpha-santonin derivatives (Figure 6) a sesquiterpene lactone isolated from *Artemisia santonica*. The compounds with higher activity showed as common structural

feature the presence of an alpha-methylidene-gamma-butyrolactone moiety in their structures (Arantes et al., 2009). This hypothesis has been corroborated in other tumoral cell lines. In addition, the bioactive α -santonin derivatives are selective against cancer cells (Arantes et al., 2010).

It is well established that various human diseases, including PC, are associated with a disturbed intracellular redox balance and oxidative stress (OS). Se based agents (Figure 6) turn the oxidizing redox environment present in certain cancer cells into a lethal cocktail of reactive species that push these cells over a critical redox threshold and ultimately kill them through apoptosis. The main advantage is that this kind of toxicity is highly selective: normal, healthy cells remain largely unaffected, since changes to their naturally low levels of oxidizing species produce little effect though the biochemical pathways triggered by these agents need to be studied in more detail such as redox modulator like cysteine-containing Bcl proteins, which control apoptosis at an early stage, certain caspases, which execute apoptotic mechanisms further downstream, are also redox sensitive (Jamier et al., 2010).

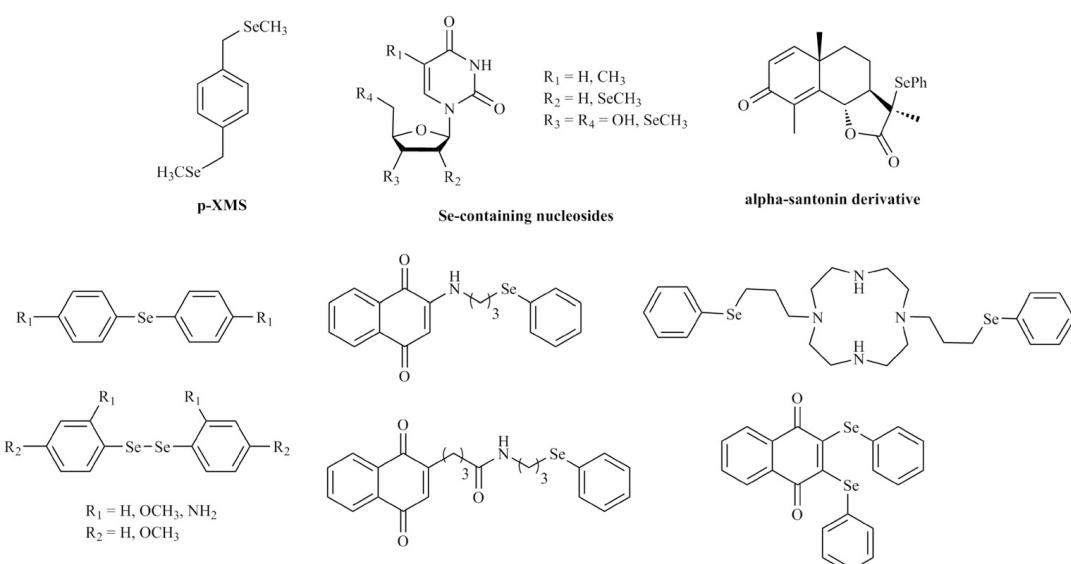


Fig. 6. Chemical structures for selenide and diselenide derivatives.

2.6 Selenium and metal complexes

Selenium- and sulfur-containing compounds have been widely studied as potential antioxidants for the prevention or reduction of oxidative DNA damage and the organoselenium compounds are of particular interest because they appear to be more bioavailable relative to inorganic Se compounds. The Se and sulfur antioxidant activity has been explained using copper-mediated DNA damage studies and UV-vis spectroscopy that have allowed identifying a copper coordination through a novel metal bond. For this reason has been described the synthesis of relevant copper selone complexes with tris(pyrazolyl)methane or tris(pyrazolyl)borate ligands (Figure 7) (Kimani et al., 2010). The determination of redox potential for Cu-Selone complexes indicated that Se coordination to copper in biological systems may prevent the reduction of Cu^{2+} by NADH required for the catalytic formation of damaging hydroxyl radical.

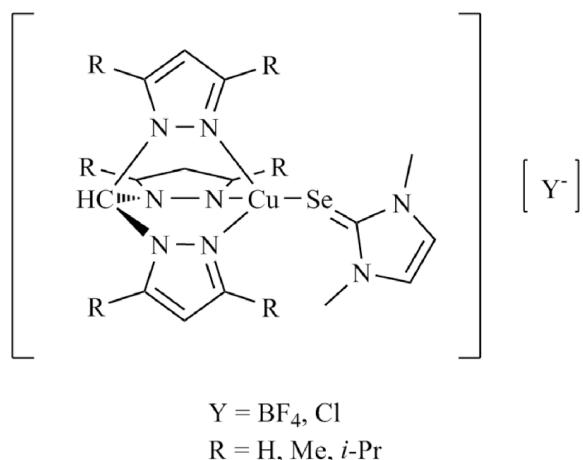


Fig. 7. Chemical structure for Cu-Selone complexes. Reprinted with permission from Kimani et al., 2010. Copyright 2010 American Chemical Society.

2.7 A case study: Novel selenoderivatives as cytotoxic agents and apoptosis inducers in prostate cancer cells

In the last four years, several articles have been published by our research group related to the design, synthesis and biological evaluation of novel compounds containing Se as cytotoxic agents and apoptosis inducers. In addition, mounting evidence suggests that selenium (Se) works by inhibiting important early steps in carcinogenesis in a variety of experimental models and the anticancer activity is dependent on the chemical form of selenium. Se occurs in both organic and inorganic forms. Based on these findings we envisaged a new investigation that involves the synthesis of new compounds that incorporate the Se-containing moiety.

2.7.1 Structures and biological results

Initially, the rationale behind the design of these compounds was to maintain molecular symmetry, a structural property that is frequently present in cytotoxic and pro-apoptotic drugs (Sanmartín et al., 2006). The structures synthesised correspond to molecules with a central nucleus made up of an alkyl imidothiocarbamate (alkyl isothiourea) or alkyl imidoselenocarbamate (alkyl isoselenourea) connected by a carbonyl group on each side to two identical lateral aromatic or heteroaromatic rings mono, bi or polycyclics (Figure 8). The sulfur and selenium substituents were varied (methyl, ethyl, benzyl and isopropyl) to determine the effect of the alkyl chain length and the ramifications that this has on the activity (Plano et al., 2007, Ibáñez et al., 2011). The best results in PC-3 were obtained for the compound with X = Se, Y = C, R = CH₃ and R' = 4-CH₃. This compound was the most potent ($\text{IC}_{50} = 1.85 \mu\text{M}$) and was 4.5 times more active than standard methylseleninic acid ($\text{IC}_{50} = 8.38 \mu\text{M}$) and 7.3 times more active than etoposide ($\text{IC}_{50} = 13.6 \mu\text{M}$), an agent used in the treatment of PC. In addition, the novel compound was less toxic than the reference and apoptotic inducer in MCF-7 and CCRF-CEM. For the heteroaromatic rings thienyl and quinolinyl were the most interesting. During the course of our work a great number of different structural classes of selenocompounds were reported (Sanmartín et al., 2008). For

this reason, and in order to improve the potency of our compounds, we decided to introduce some structural modifications. Among these modifications was the preparation of new compounds with related structures based on aryl and heteroaroyl selenylacetic acid derivatives (Figure 8). The most promising derivatives against PC-3 cancer cells were the corresponding phenyl, 3,5-dimethoxyphenyl and benzyl with TGI values of 6.8, 4.0 and 2.9 μM (Sanmartín et al., 2009). Too, there is current interest in heterocyclic compounds that contain a Se atom in the ring. Bearing this fact in mind, and as a continuation of our previous work, we proposed the synthesis 1,2,5-selenadiazolo[3,4-*d*]pyridines and 1,2,5-benzoselenadiazolo derivatives (Figure 8). The most promising molecule was a pyridine derivative (Plano et al., 2010b). Other explored structures were compounds with selenocyanate and diselenide moieties. Moreover, we evaluated their antioxidant-prooxidant properties so as their cytotoxic activities against PC-3 resulting eighteen of the fifty-nine compounds evaluated more potent than etoposide (Plano et al., 2010a). Taking into account that oxidation state for Se is related to antitumoral effect we have synthesized and evaluated an original series consisting of a small group of compounds which possess Se in the +4 states oxidation instead of Se +2 (Figure 8) (Plano et al., 2010a).

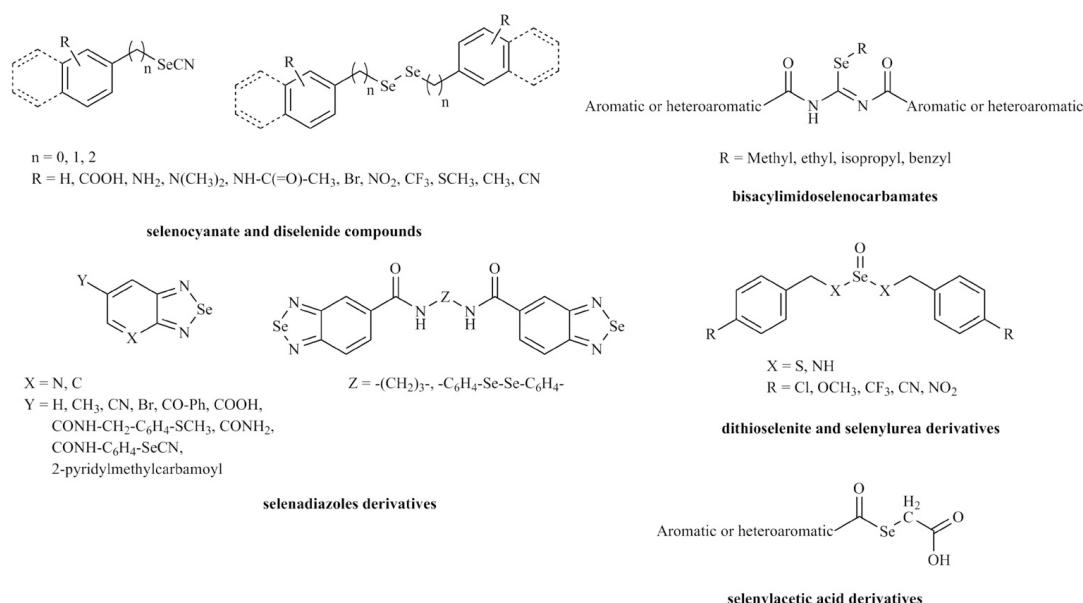


Fig. 8. Selenoderivatives obtained and evaluated by our research group.

Considering that Se has been associated with an anticancer effect via the modulation of some kinase such as Akt (J.H. Lee et al., 2008) some of these compounds have been studied as kinase modulators. Some of them modulate CK1A and GS3Ka expression and a weak modification in ErB4, GS3Ka and PKCA was detected (unpublished results).

The preliminary results from the biological screening of these novel compounds are very encouraging and these systems could offer an excellent framework in this field and may

ultimately lead to discovery of potent antitumour agent. Thus, the search for new drugs with Se continues to be a great challenge in medical science.

3. Conclusion

It is clear from the studies discussed above that Se compounds do have effects on growth, cell cycle and apoptosis and that such compounds offer great promise as anticancer and apoptotic agents in many tumoral processes, mainly for PC. In this chapter we have summarized information on more than twenty eight structures that contain Se – most of which were published in the last three years – and possess cytotoxic activity against PC. This list of compounds and references is by no means exhaustive and merely hints at the hundreds of other citations due to the ever increasing amount of work carried out in this field. As a result of these studies, Se derivatives are rapidly emerging as valid chemotherapeutic agents. However, various organic and inorganic selenium compounds used in some studies have produced variable results when they are tested in animal models and human subjects and more investigations are urgently needed in order to ascertain the safety in their use. We have included some structures that have not yet been evaluated in prostate cancer cells because we believe that the study of these compounds would be of interest. Although several possible mechanisms have been proposed to explain the anticancer and apoptotic properties of selenium compounds, the results described here suggest the following preliminary considerations:

1. The chemical form is a determinant factor for the activity and the metabolism is required for anticarcinogenic activity.
2. The effect of some selenium compounds mainly depends on the dose and the oxidation state of selenium. For inorganic selenium compounds the +4 oxidation state gives the highest anticarcinogenic properties and for organic selenium compounds the activity is mainly observed for the +2 oxidation state.
3. The existence of diverse responses for the same chemical structure suggests several mechanisms of action. For example, sodium selenite induced apoptosis by redox processes, decreased HDAC activity, increased of PTEN activity. The expectation of a broad therapeutic benefit from agents that target only one member of either pathway may be overly simplistic due to the complex interrelated network governing apoptosis.
4. Experimental evidence shows that molecular symmetry, as a broad concept, could be a positive factor for cancer prevention and apoptosis (sodium selenite, methylseleninic acid, *p*-XSC, *p*-XMS, BBSKE). The importance of molecular symmetry in cytotoxic and pro-apoptotic activities was reported by us in 2006. Recently, we described a new series of symmetrical organoselenium compounds that are potent as cytotoxic agents in prostate cancer cells.

This class of compound offers a great deal of promise to broaden significantly the horizons of modern apoptosis and anticancer drug discovery for the potential treatment of prostate cancer. Animal data, epidemiological data, and intervention trials have shown a clear role for selenium derivatives in both the prevention of specific cancers and antitumourigenic effects in postinitiation phases of cancer through apoptosis induction. Accordingly, in recent years there has been substantial interest directed toward the synthesis of selenium-containing derivatives that could be used as cytotoxic, cancer chemopreventive and apoptotic agents. However, a great deal of further research is needed to unravel the precise manner in which selenium compounds act.

4. Acknowledgment

The authors wish to express their gratitude to the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (SAF 2009-07744) for financial support.

5. References

- Abdullah R, *et al.* (2011) Molecular targets of selenium in prostate cancer prevention (Review). *International Journal of Oncology*, Vol.39, No.2, (August 2011), pp. 301-309, ISSN 1019-6439.
- Algotar AM, *et al.* (2011) Dose-dependent effects of selenized yeast on total selenium levels in prostatic tissue of men with prostate cancer. *Nutrition and Cancer*, Vol.63, No.1, (December 2010), pp. 1-5, ISSN 0163-5581.
- Aly M, Wiklund F, & Grönberg H (2011) Early detection of prostate cancer with emphasis on genetic markers. *Acta Oncologica*, Vol.50, No.S1, (June 2011), pp. 18-23, ISSN 0284-186X.
- Araldi EMV, *et al.* (2008) Natural and synthetic agents targeting inflammation and angiogenesis for chemoprevention of prostate cancer. *Current Cancer Drug Targets*, Vol.8, No.2, (March 2008), pp. 146-155, ISSN 1568-0096.
- Arantes FFP, *et al.* (2010) Synthesis of novel alpha-santonin derivatives as potential cytotoxic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.45, No.12, (December 2010), pp. 6045-6051, ISSN 0223-5234.
- Arantes FFP, *et al.* (2009) Synthesis and cytotoxic activity of alpha-santonin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.44, No.9, (September 2009), pp. 3739-3745, ISSN 0223-5234.
- Berggren M, *et al.* (2009) Sodium selenite increases the activity of the tumor suppressor protein, PTEN, in DU-145 prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer*, Vol.61, No.3, (May-June 2009), pp. 322-331, ISSN 0163-5581.
- Choi HS, *et al.* (2010) Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, Vol.5, No.1, (January 2010), pp. 42-47, ISSN 1748-3387.
- Colloca G & Venturino A (2011) The evolving role of familial history for prostate cancer. *Acta Oncologica*, Vol.50, No.1, (January 2011), pp. 14-24, ISSN 0284-186X.
- Corcoran NM, *et al.* (2010) Open-label, phase I dose-escalation study of sodium selenate, a novel activator of PP2A, in patients with castration-resistant prostate cancer. *British Journal of Cancer*, Vol.103, No.4, (August 2010), pp. 462-468, ISSN 0007-0920.
- Dennert G, *et al.* (2011) Selenium for preventing cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Vol.5, Article Number.CD005195, ISSN 1469-493X.
- Desai D, *et al.* (2010a) Synthesis and antitumor properties of selenocoxib-1 against rat prostate adenocarcinoma cells. *International Journal of Cancer*, Vol.127, No.1, (July 2010), pp. 230-238, ISSN 1097-0215.
- Desai D, *et al.* (2010b) Synthesis and evaluation of the anti-inflammatory properties of selenium-derivatives of celecoxib. *Chemico-Biological Interactions*, Vol.188, No.3, (December 2010), pp. 446-456, ISSN 0009-2797.
- El-Sayed WM, Hussin WA, & Franklin MR (2007) The antimutagenicity of 2-substituted selenazolidine-4-(R)-carboxylic acids. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.627, No.2, (March 2007), pp. 136-145, ISSN 1383-5718.

- Erkekoglu P, et al. (2011) Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food and Chemical Toxicology*, Vol.49, No.7, (July 2011), pp. 1565-1571, ISSN 0278-6915.
- Facompre ND, et al. (2010) 1,4-Phenylenebis(methylene)selenocyanate, but not selenomethionine, inhibits androgen receptor and Akt signaling in human prostate cancer cells. *Cancer Prevention Research*, Vol.3, No.8, (August 2010), pp. 975-984, ISSN 1940-6207.
- Fairweather-Tait SJ, et al. (2011) Selenium in human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, Vol.14, No.7, (April 2011), pp. 1337-1383, ISSN 1523-0864.
- Ferlay J, Parkin DM, & Steliarova-Foucher E (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*, Vol.46, No.4, (March 2010), pp. 765-781, ISSN 0959-8049.
- Ferris-i-Tortajada J, et al. (2011) Constitutional risk factors in prostate cancer. *Actas Urológicas Españolas*, Vol.35, No.5, (May 2011), pp. 282-288, ISSN 0210-4806.
- Freitas M, et al. (2011) Combined effect of sodium selenite and docetaxel on PC3 metastatic prostate cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.408, No.4, (May 2011), pp. 713-719, ISSN 0006-291X.
- Fu JN, et al. (2011) Thioredoxin reductase inhibitor ethaselen increases the drug sensitivity of the colon cancer cell line LoVo towards cisplatin via regulation of G1 phase and reversal of G2/M phase arrest. *Investigational New Drugs*, Vol.29, No.4, (August 2011), pp. 627-636, ISSN 0167-6997.
- Gazi MH, et al. (2007) Sodium selenite inhibits interleukin-6-mediated androgen receptor activation in prostate cancer cells via upregulation of c-Jun. *Clinica Chimica Acta*, Vol.380, No.1-2, (May 2007), pp. 145-150, ISSN 0009-8981.
- Gjertson CK & Albertsen PC (2011) Use and assessment of PSA in prostate cancer. *Medical Clinics of North America*, Vol.95, No.1, (January 2011), pp. 191-200, ISSN 0025-7125.
- Gundimeda U, et al. (2008) Locally generated methylseleninic acid induces specific inactivation of protein kinase C isoforms relevance to selenium-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, Vol.283, No.50, (December 2008), pp. 34519-34531, ISSN 0021-9258.
- Hilchie AL, et al. (2010) Curcumin-induced apoptosis in PC3 prostate carcinoma cells is caspase-independent and involves cellular ceramide accumulation and damage to mitochondria. *Nutrition and Cancer*, Vol.62, No.3, pp. 379-389, ISSN 0163-5581.
- Hurst R, et al. (2008) Se-methylselenocysteine alters collagen gene and protein expression in human prostate cells. *Cancer Letters*, Vol.269, No.1, (September 2008), pp. 117-126, ISSN 0304-3835.
- Husbeck B, et al. (2006) Inhibition of androgen receptor signaling by selenite and methylseleninic acid in prostate cancer cells: two distinct mechanisms of action. *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol.5, No.8, (August 2006), pp. 2078-2085, ISSN 1535-7163.
- Ibáñez E, et al. (2011) Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio- and alkylseleno-imidocarbamates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.46, No.1, (January 2011), pp. 265-274, ISSN 0223-5234.
- Jamier V, Ba LA, & Jacob C (2010) Selenium- and tellurium-containing multifunctional redox agents as biochemical redox modulators with selective cytotoxicity. *Chemistry-a European Journal*, Vol.16, No.36, (September 2010), pp. 10920-10928, ISSN 0947-6539.

- Juang S-H, et al. (2007) D-501036, a novel selenophene-based triheterocycle derivative, exhibits potent in vitro and in vivo antitumoral activity which involves DNA damage and ataxia telangiectasia-mutated nuclear protein kinase activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol.6, No.1, (January 2007), pp. 193-202, ISSN 1535-7163.
- Kassam S, et al. (2011) Methylseleninic acid inhibits HDAC activity in diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, (In press), DOI 10.1007/s00280-011-1649-1, ISSN 0344-5704.
- Kimani MM, Brumaghim JL, & VanDerveer D (2010) Probing the antioxidant action of selenium and sulfur using Cu(I)-chalcogenone tris(pyrazolyl)methane and -borate complexes. *Inorganic Chemistry*, Vol.49, No.20, (October 2010), pp. 9200-9211, ISSN 0020-1669.
- Knudsen BS & Vasioukhin V (2010) Mechanisms of prostate cancer initiation and progression. *Advances in Cancer Research*, Vol. 109, pp. 1-50, ISSN 0065-230X.
- Kong L, et al. (2011) The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis. *Biomaterials*, (In press), DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.05.032, ISSN 0142-9612.
- Kumi-Diaka J, et al. (2010) Genistein-selenium combination induces growth arrest in prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, Vol.13, No.4, (August 2010), pp. 842-850, ISSN 1096-620X.
- Lee JH, et al. (2008) A novel activation-induced suicidal degradation mechanism for Akt by selenium. *International Journal of Molecular Medicine*, Vol.21, No.1, (January 2008), pp. 91-97, ISSN 1107-3756.
- Lee JI, et al. (2009) Alpha-keto acid metabolites of naturally occurring organoselenium compounds as inhibitors of histone deacetylase in human prostate cancer cells. *Cancer Prevention Research*, Vol.2, No.7, (July 2009), pp. 683-693, ISSN 1940-6207.
- Li GX, et al. (2008) Superior in vivo inhibitory efficacy of methylseleninic acid against human prostate cancer over selenomethionine or selenite. *Carcinogenesis*, Vol.29, No.5, (May 2008), pp. 1005-1012, ISSN 0143-3334.
- Lin L, et al. (2009) Facile synthesis and anti-tumor cell activity of Se-containing nucleosides. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids*, Vol.28, No.1, (January 2009), pp. 56-66, ISSN 1525-7770.
- Liu M, et al. (2010) Preparation of tri-block copolymer micelles loading novel organoselenium anticancer drug BBSKE and study of tissue distribution of copolymer micelles by imaging in vivo method. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol.391, No.1-2, (May 2010), pp. 292-304, ISSN 0378-5173.
- Liu SA, et al. (2010) Telomerase as an important target of androgen signaling blockade for prostate cancer treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol.9, No.7, (July 2010), pp. 2016-2025, ISSN 1535-7163.
- Lunoe K, et al. (2011) Investigation of the selenium metabolism in cancer cell lines. *Metallomics*, Vol.3, No.2, (February 2010), pp. 162-168, ISSN 1756-5901.
- Nadiminty N & Gao AC (2008) Mechanisms of selenium chemoprevention and therapy in prostate cancer. *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol.52, No.11, (November 2008), pp. 1247-1260, ISSN 1613-4125.

- Ozten N, *et al.* (2010) Selenomethionine and alpha-tocopherol do not inhibit prostate carcinogenesis in the testosterone plus estradiol-treated NBL rat model. *Cancer Prevention Research*, Vol.3, No.3, (March 2010), pp. 371-380, ISSN 1940-6207.
- Pei ZY, *et al.* (2010) Sodium selenite inhibits the expression of VEGF, TGF beta(1) and IL-6 induced by LPS in human PC3 cells via TLR4-NF-(K)B signaling blockage. *International Immunopharmacology*, Vol.10, No.1, (January 2010), pp. 50-56, ISSN 1567-5769.
- Penney KL, *et al.* (2010) A large prospective study of SEP15 genetic variation, interaction with plasma selenium levels, and prostate cancer risk and survival. *Cancer Prevention Research*, Vol.3, No.5, (May 2010), pp. 604-610, ISSN 1940-6207.
- Pinto JT, *et al.* (2011) Chemopreventive mechanisms of alpha-keto acid metabolites of naturally occurring organoselenium compounds. *Amino Acids*, Vol.41, No.1, (June 2011), pp. 29-41, ISSN 0939-4451.
- Pinto JT, *et al.* (2007) Differential effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on biomarkers in androgen responsive and androgen independent human prostate carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, Vol.120, No.7, (April 2007), pp. 1410-1417, ISSN 0020-7136.
- Plano D, *et al.* (2010a) Antioxidant-prooxidant properties of a new organoselenium compound library. *Molecules*, Vol.15, No.10, (October 2010), pp. 7292-7312, ISSN 1420-3049.
- Plano D, *et al.* (2010b) Synthesis and in vitro anticancer activities of some selenadiazole derivatives. *Archiv der Pharmazie*, Vol.343, No.11-12, (November-December 2010), pp. 680-691, ISSN 1521-4184.
- Plano D, *et al.* (2007) Novel potent organoselenium compounds as cytotoxic agents in prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol.17, No.24, (December 2007), pp. 6853-6859, ISSN 0960-894X.
- Poerschke RL & Moos PJ (2011) Thioredoxin reductase 1 knockdown enhances selenazolidine cytotoxicity in human lung cancer cells via mitochondrial dysfunction. *Biochemical Pharmacology*, Vol.81, No.2, (January 2011), pp. 211-221, ISSN 0006-2952.
- Rebsch CM, Penna FJ, & Copeland PR (2006) Selenoprotein expression is regulated at multiple levels in prostate cells. *Cell Research*, Vol.16, No.12, (December 2006), pp. 940-948, ISSN 1001-0602.
- Roy SS, *et al.* (2010) Naphthalimide based novel organoselenocyanates: Finding less toxic forms of selenium that would retain protective efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol.20, No.23, (December 2010), pp. 6951-6955, ISSN 0960-894X.
- Sanmartin C, *et al.* (2009) Synthesis and Pharmacological Screening of Several Aroyl and Heteroaroyl Selenylacetic Acid Derivatives as Cytotoxic and Antiproliferative Agents. *Molecules*, Vol.14, No.9, (September 2009), pp. 3313-3338, ISSN 1420-3049.
- Sanmartin C, Plano D, & Palop JA (2008) Selenium compounds and apoptotic modulation: A new perspective in cancer therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol.8, No.10, (September 2008), pp. 1020-1031, ISSN 1389-5575.
- Sanmartin C, Font M, & Palop JA (2006) Molecular symmetry: A structural property frequently present in new cytotoxic and proapoptotic drugs. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Vol.6, No.6, (January 2006), pp. 639-650, ISSN 1389-5575.

- Schmid H-P, et al. (2011) Nutritional aspects of primary prostate cancer prevention, In: *Clinical Cancer Prevention*, H-J Senn & F Otto (Eds.), pp. 101-107, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ISSN 978-3-642-10858-7.
- Schröder FH (2010) Prostate cancer around the world. An overview. *Urologic Oncology Seminars and Original Investigations*, Vol.28, No.6, (November-December 2010), pp. 663-667, ISSN 1078-1439.
- Sharma AK, et al. (2011) The Akt inhibitor ISC-4 activates prostate apoptosis response protein-4 and reduces colon tumor growth in a nude mouse model. *Clinical Cancer Research*, (In press), DOI 10.1158/1078-0432, ISSN 1078-0432.
- Sharma AK, et al. (2008) Synthesis and anticancer activity comparison of phenylalkyl isoselenocyanates with corresponding naturally occurring and synthetic isothiocyanates. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol.51, No.24, (December 2008), pp. 7820-7826, ISSN 0022-2623.
- Shi CJ, et al. (2003a) A novel organoselenium compound induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.309, No.3, (September 2003), pp. 578-583, ISSN 0006-291X.
- Shi CJ, et al. (2003b) Induction of apoptosis in prostate cancer cell line PC-3 by BBSKE, a novel organoselenium compound, and its effect in vivo. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, Vol.83, No.22, (November 2003), pp. 1984-1988, ISSN 0253-9624.
- Silberstein JL & Parsons JK (2010) Prostate cancer prevention: concepts and clinical recommendations. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, Vol.13, No.4, (December 2010), pp. 300-306, ISSN 1365-7852.
- Sinha I, et al. (2011) Methylseleninic acid down regulates hypoxia inducible factor-1 α in invasive prostate cancer. *International Journal of Cancer*, (In press), DOI 10.1002/ijc.26141, ISSN 1097-0215.
- Sinha R, et al. (2008) Effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on protein profiling in androgen responsive and androgen independent human prostate cancer cells. *Nutrition and Cancer*, Vol.60, No.2, (March-April 2008), pp. 267-275, ISSN 0163-5581.
- Strophe SA & Andriole GL (2010) Update on chemoprevention for prostate cancer. *Current Opinion in Urology*, Vol.20, No.3, (May 2010), pp. 194-197, ISSN 0963-0643.
- Sung SY, et al. (2006) Oxidative stress induces ADAM9 protein expression in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, Vol.66, No.19, (October 2006), pp. 9519-9526, ISSN 0008-5472.
- Tabassum A, Bristow RG, & Venkateswaran V (2010) Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: A good thing? *Cancer Treatment Reviews*, Vol.36, No.3, (May 2010), pp. 230-234, ISSN 0305-7372.
- Terazawa R, et al. (2010) Identification of organoselenium compounds that possess chemopreventive properties in human prostate cancer LNCaP cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol.18, No.19, (October 2010), pp. 7001-7008, ISSN 0968-0896.
- Tian JQ, Ning SC, & Knox SJ (2010) Sodium selenite radiosensitizes hormone-refractory prostate cancer xenograft tumors buy not intestinal crypt cells in vivo. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, Vol.78, No.1, (September 2010), pp. 230-236, ISSN 0360-3016.
- Vidlar A, et al. (2010) The safety and efficacy of a silymarin and selenium combination in men after radical prostatectomy - a six month placebo-controlled double-blind

- clinical trial. *Biomedical Papers-Olomouc*, Vol.154, No.3, (September 2010), pp. 239-244, ISSN 1213-8118.
- Wang L, et al. (2009) Methyl-selenium compounds inhibit prostate carcinogenesis in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model with survival benefit. *Cancer Prevention Research*, Vol.2, No.5, (May 2009), pp. 484-495, ISSN 1940-6207.
- Wang Z, et al. (2010) Persistent P21Cip1 induction mediates G(1) cell cycle arrest by methylseleninic acid in DU145 prostate cancer cells. *Current Cancer Drug Targets*, Vol.10, No.3, (May 2010), pp. 307-318, ISSN 1568-0096.
- Wartenberg M, et al. (2010) Glycolytic pyruvate regulates P-glycoprotein expression in multicellular tumor spheroids via modulation of the intracellular redox state. *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol.109, No.2, (February 2010), pp. 434-446, ISSN 0730-2312.
- Wilson BAP, et al. (2011) High-throughput screen identifies novel inhibitors of cancer biomarker α -methylacyl coenzyme A racemase (AMACR/P504S). *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol.10, No.5, (May 2011), pp. 825-838, ISSN 1535-7163.
- Xiang N, Zhao R, & Zhong WX (2009) Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, Vol.63, No.2, (January 2009), pp. 351-362, ISSN 0344-5704.
- Xiang N, et al. (2008) Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, Vol.29, No.11, (November 2008), pp. 2175-2181, ISSN 0143-3334.
- Zhang HT, et al. (2010) Activation of FOXO1 is critical for the anticancer effect of methylseleninic acid in prostate cancer cells. *Prostate*, Vol.70, No.12, (September 2010), pp. 1265-1273, ISSN 0270-4137.
- Zhang J, et al. (2011) Mouse prostate proteomes are differentially altered by supranutritional intake of four selenium compounds. *Nutrition and Cancer*, (In press) DOI 10.1080/01635581.2011.563029, ISSN 0163-5581.
- Zhang J, et al. (2010) Proteomic profiling of potential molecular targets of methyl-selenium compounds in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Cancer Prevention Research*, Vol.3, No.8, (August 2010), pp. 994-1006, ISSN 1940-6207.
- Zhou H-y, et al. (2010) LC-MSn analysis of metabolites of 1, 2- bis (1, 2-benzisoselenazolone-3(2H)-ketone) -ethane, a novel anti-cancer agent in rat. *Yaoxue Xuebao*, Vol.45, No.5, (May 2010), pp. 627-631, ISSN 0513-4870.

Hipótesis y planificación

La investigación presentada en esta Memoria se sustenta en la siguiente hipótesis, inspirada en algunos datos encontrados en la bibliografía pero, sobre todo, en la experiencia de nuestro grupo de investigación:

Es de esperar que la asociación estructural en moléculas de nueva síntesis, del elemento selenio bajo distintas funcionalizaciones y el grupo carbamato, completada con la presencia de fragmentos de probada actividad biológica, confiera a dichas moléculas carácter antioxidante y propiedades citotóxicas y antiproliferativas. En el caso de cumplirse esta predicción, los nuevos compuestos serían buenos candidatos para su uso como potenciales quimiopreventivos y/o quimioterápicos en el área oncológica.

Entre la diversidad de posibles funcionalizaciones existentes para el selenio se eligen tres grupos funcionales proyectados en tres series de compuestos (Figura 24). Se atiende de esta forma a los resultados anteriores del grupo de investigación, las posibilidades sintéticas y se hace un intento para sondear los comportamientos biológicos de las distintas formas estructurales de este elemento. Es prioritario recabar información para el establecimiento de relaciones estructura-actividad y profundizar en el conocimiento de los requerimientos necesarios para la actividad. Los grupos selenados seleccionados son: metilselenilo, cianoselenilo y diseleniuro, selección que abarca distintos efectos electrónicos sobre el Se, simple o doble contenido molecular en Se, moléculas con o sin simetría que es un factor estructural ampliamente descrito en cáncer, masas y tamaños moleculares diversos, polaridades muy diferentes en enlaces en los que participa el átomo de Se, desde la nula polarización del enlace Se-Se a un amplio intervalo de valores de polarización en los enlaces Se-CH₃ y Se-CN. Se mantienen en las tres series, dentro de lo posible, los mismos sustituyentes sobre el grupo carbamato, elegidos como se ha indicado por su actividad descrita en este campo.

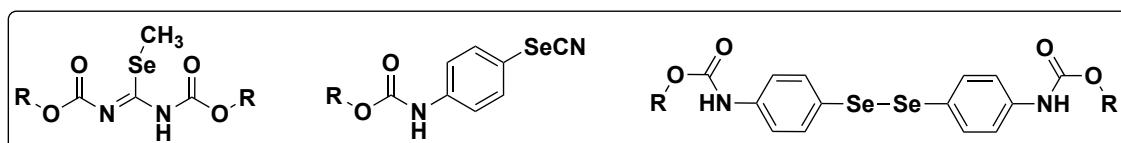


Figura 24: Estructuras generales de los carbamatos selenados diseñados.

El comportamiento terapéutico previsto para estas moléculas se fundamenta en su actuación como prodrogas, es decir, propiciando la liberación del fragmento activo que se producirá tras la fisión o la hidrólisis de la molécula en determinadas condiciones favorables, como el medio acuoso celular. Se propone la introducción del grupo carbamato precisamente para afectar la polaridad global de la molécula, modular la capacidad de fisión o de hidrólisis de la misma y permitir, en última instancia, la liberación al medio de especies radicálicas o iónicas de selenio, responsables de la acción terapéutica.

Esta estrategia de diseño, conocida como Hibridación Molecular, es en la actualidad ampliamente utilizada en el diseño de nuevos fármacos.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de este trabajo de investigación es probar la hipótesis antes planteada a través de su verificación experimental en cuanto a que los carbamatos selenados diseñados son candidatos válidos como potenciales quimiopreventivos y/o quimioterápicos en cáncer al presentar propiedades antioxidantes, citotóxicas y antiproliferativas.

Con el fin de alcanzar este amplio objetivo general, se programan los siguientes objetivos parciales:

1. Diseño, planificación de la síntesis y obtención de los nuevos derivados orgánicos selenados de carbamato.
2. Caracterización estructural inequívoca de los compuestos sintetizados mediante técnicas analíticas instrumentales. Verificación de que el grado de pureza obtenido es el requerido para la posterior realización de pruebas biológicas.
3. Estudio de las propiedades físico-químicas de los compuestos obtenidos, mediante técnicas de análisis térmico, especialmente referidas a su estabilidad química.
4. Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de los nuevos derivados en un panel de líneas celulares tumorales humanas seleccionadas.
5. Determinación de la selectividad *in vitro* de los nuevos derivados, mediante ensayos de viabilidad y proliferación celular en líneas celulares no-tumorales humanas.
6. Establecimiento de las oportunas relaciones estructura-actividad, útiles para la optimización de estructuras líderes y el diseño de nuevos derivados activos.
7. Investigación del mecanismo de acción de los derivados más activos y selectivos en cuanto a los siguientes aspectos:
 - 7.1 Evaluación de la inducción de apoptosis
 - 7.2 Análisis de las alteraciones producidas en el ciclo celular
 - 7.3 Estudio de la influencia que ejercen los compuestos en la célula a nivel transcripcional
8. Aproximación al comportamiento quimiopreventivo que pueden presentar estos compuestos.
 - 8.1 Valoración de su capacidad antioxidante
 - 8.2 Evaluación de la utilidad de suplementar vegetales con carbamatos selenados. Estudio del efecto provocado por esta suplementación en cuanto a características físicas de los vegetales, su composición química y posible resistencia al estrés oxidativo.

Resultados

Capítulo 1

Synthesis and antiproliferative activity of novel methylselenocarbamates.

Romano, B., Font, M., Palop, J. A., Sanmartín, C., & Encio, I. (2014). Synthesis and antiproliferative activity of novel methylselenocarbamates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 674–684. <http://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.076>

Resumen:

Se presenta la síntesis y actividad antiproliferativa de una serie de nuevos derivados carbamato, alifáticos, aromáticos y heteroaromáticos, que contienen en su estructura selenio metilado. Se ha analizado su actividad citotóxica *in vitro* frente un panel de líneas celulares humanas, entre las que se encuentran CCRF-CEM (leucemia linfoblástica), K-562 (leucemia linfocítica), HT-29 (carcinoma de colon), HTB-54 (carcinoma de pulmón), PC-3 (carcinoma de próstata), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), 184B5 (células no malignas derivadas de glándula mamaria) y BEAS-2B (células no malignas derivadas de epitelio bronquial). La mayoría de los compuestos son altamente citotóxicos, con valores de GI₅₀ por debajo de 10 μM en todas las líneas tumorales analizadas. Basándonos en sus parámetros citotóxicos, su índice de selectividad y su perfil ADME, decidimos analizar más a fondo la actividad biológica del derivado, en las líneas celulares CCRF-CEM y HTB-54. Los resultados han mostrado que este compuesto es capaz de inducir apoptosis dependiente del tiempo y la dosis. Se ha detectado a su vez que las caspasas están involucradas en la muerte celular inducida por el compuesto. Además, se ha comprobado que el compuesto induce parada del ciclo celular en la fase G₀/G₁ en las células CCRF-CEM y en la fase G₂/M en las células HTB-54.

Capítulo 2

Influence of novel selenocarbamates on Ap-1 and Egr-1 transcription and expression

Beatriz Romano^{a*}, Oliver G. Rössler^b, Ignacio Encío^c, Claus Jacob^d, Juan Antonio Palop^a, Carmen Sanmartín^a, Gerald Thiel^b

^aDepartamento de Química Orgánica y Farmacéutica, University of Navarra,
Irunlarrea, 1. E-31008 Pamplona, Spain

^bDepartment of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of
Saarland Medical Center, Building 44, D-66421 Homburg, Saarland, Germany

^cDepartamento de Ciencias de la Salud, Universidad Pública de Navarra, Avda.
Barañain s/n, E-31008 Pamplona, Spain

^dDivision of Bioorganic Chemistry, School of Pharmacy, Saarland University, D-
66123 Saarbrücken, Germany

El metilselenol (MeSeH) es uno de los metabolitos de selenio más interesantes, cuya relación con la actividad anticancerosa del selenio ha sido probada. Se han sintetizado nuevos metilselenocarbamatos como prodrogas, buscando una liberación de metilselenol en el citoplasma celular. Tras analizar las propiedades citotóxicas *in vitro* de los nuevos derivados, este estudio constituye una primera aproximación al mecanismo de acción de los nuevos metilselenocarbamatos. Considerando la interacción del selenio con el sistema redox celular, ampliamente descrita, evaluamos la influencia de los compuestos **2** y **12** en la regulación de los factores de transcripción AP-1 y Egr-1, ya que ambos juegan un papel fundamental en la respuesta celular a condiciones de estrés y acumulación de ROS. Con el fin de evaluar la regulación a nivel de la transcripción, usamos lentivirus como vectores de transferencia de genes, para integrar los promotores de los genes de interés en la cromatina de células de carcinoma de pulmón HTB-54. Los resultados preliminares indican que el compuesto **12** induce un incremento en la transcripción de AP-1 y Egr-1 en células HTB-54, que puede estar mediado por Elk-1. El compuesto **12** fue capaz de inducir temporalmente la biosíntesis de Egr-1, presentando un pico de expresión 1 hora después del tratamiento.

Resultados

Influence of novel selenocarbamates on Ap-1 and Egr-1 transcription and expression

Beatriz Romano^{a*}, Oliver G. Rössler^b, Ignacio Encío^c, Juan Antonio Palop^a, Carmen Sanmartín^a, Claus Jacob^d, Gerald Thiel^b

^a*Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, University of Navarra,
Irunlarrea, 1. E-31008 Pamplona, Spain*

^b*Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, University of
Saarland Medical Center, Building 44, D-66421 Homburg, Saarland, Germany*

^c*Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Pública de Navarra, Avda.
Barañain s/n, E-31008 Pamplona, Spain*

^d*Division of Bioorganic Chemistry, School of Pharmacy, Saarland University, D-
66123 Saarbrücken, Germany*

* Beatriz Romano Alvarez

Department of Organic and Pharmaceutical Chemistry
University of Navarra

Irunlarrea 1, E-31008 Pamplona

SPAIN

+34 948 425 600 (Telephone)

+34 948 425 649 (Fax)

e-mail: bromano@alumni.unav.es

Abstract

Methylselenol (MeSeH) is one of the most interesting selenium metabolites and its relation with selenium anticancer activity has been proved. Novel methylselenocarbamates were synthesised as prodrugs, searching for MeSeH release into the cytoplasm. After proving their *in vitro* cytotoxic properties, this study constitutes a first approach to the biological mechanism of action of the novel methylselenocarbamates. Considering the described selenium interaction with the redox system of the cells, we evaluated the influence of the lead compounds **2** and **12** in the regulation of the transcription factors AP-1 and Egr-1, two factors that play a central role in the cellular response to stress conditions and ROS imbalance. To investigate the transcriptional regulation of AP-1 and Egr-1 we used lentiviral gene transfer, integrating with this method promoter/reporter genes into the chromatin of lung carcinoma HTB-54 cells. Results point to transcriptional up-regulation of AP-1 and Egr-1, involving Elk-1 in HTB-54 cells treated with compound **12**. Compound **12** was also able to induce transient Egr-1 biosynthesis, with a peak expression occurring 1 hour after treatment.

Keywords: Methylselenocarbamate, AP-1, Egr-1, Transcription, Expression

Resultados

1. Introduction

Trace element selenium (Se) is fundamental to human health [1–3] and, over the last years, research has focused on determining its beneficial role in cancer prevention and treatment [4–6]. Given that MeSeH has been described as critical metabolite for Se anticancer activity *in vivo* [7–9], the methylated forms that can be metabolized to methylselenol (MeSeH) [10,11] have caught important attention. It has been reported the ability of MeSeH to interact with the redox sensitive genes [12], to inhibit cell proliferation and to cause cell cycle arrest at G₁ phase [13,14]. MeSeH has been also found to induce apoptosis [13].

AP-1 (activation protein-1) is a family of transcription factors with a basic region leucine zipper (b-ZIP) domain. It includes members of the Jun, Fos and activating transcription factor (ATF) subfamilies. All this transcription factors have to form homo- or heterodimerous, before they can bind to the DNA [15]. AP-1 acts like an environmental biosensor, as members of the family are needed to regulate the transcription response to several stress conditions. AP-1 correlates with control of cell proliferation, apoptosis and tumour formation/suppression [16,17]. These important biological activities have been described also for Egr-1 (Early growth response 1), a zinc finger transcription factor encoded by a redox sensitive gene [18]. Egr-1 acts as a convergence point for many signalling cascades, coupling extracellular signals to long-term responses [19].

We have recently reported the synthesis and biological activity of novel methylselenocarbamates [20]. These compounds showed an interesting cytotoxic profile and displayed GI₅₀ values below 10 µM in every tested tumour cell line. Moreover, methyl *N,N'*-bis(propoxycarbonyl)imidoselenocarbamate, was able to induce apoptosis and cell cycle arrest. These results and confirmation that selenocarbamates release MeSeH under physiological conditions [21] encouraged us to further analyse the biological mechanism underlying their cytotoxic effect. With this purpose here we analyse the influence of selenocarbamates **2** and **12** (Figure 1) [20] in the regulation of Ap-1

and Egr-1 transcription and activity in HTB-54 cells expressing promoter/reporter chimeric genes¹.

Figure 1

2. Material and methods

2.1. Chemistry

Compounds were synthesised according to the general method described by our research group [20] with a high grade of purity. Chemical structures for **2** and **12** were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR, MS spectral and elemental analysis.

2.2. Cell culture

Human cell lines were provided by the American Type Culture Collection (ATCC). Highly transfectable HEK293T/17 (human embryonic kidney) cell line was cultured in DMEM medium (Gibco-Life Technologies) supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Lung carcinoma HTB-54 cells were grown in RPMI 1640 medium (Gibco-Life Technologies) supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10 mM HEPES buffer (pH = 7.4) at 37 °C and 5% CO₂. HTB-54 cells were cultured in medium containing 0.05% foetal bovine serum for 24 h before stimulation. Stimulation with 10 µM of **2**, 10 µM of **12** or 10 ng/mL of phorbol-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, Calbiochem # 524400-1), was performed for 24 h, using DMSO as vehicle.

2.3. Lentiviral gene transfer

All lentiviral transfer vectors used in this study are based on plasmids pFUW or pFUWG [22]. The lentiviral transfer vectors pFUW-GAL4-c-Fos and pFUW-GAL4-Elk-1 have been previously described [23]. The viral particles were produced by triple transient transfection of HEK293T/17 cells with the gag-pol-

¹ Compounds references (**2** and **12**) were first described in a previous article [20] and are maintained here since this work is a continuation of this cited one.

Resultados

rev packaging plasmid, the env plasmid encoding VSV glycoprotein and the transfer vector. Transfections were performed by the calcium phosphate coprecipitation procedure, in the presence of 25 µM chloroquine. Viral supernatants were harvested 72 h after transfection, filtered with a 0.45 µm filter, and used to infect HTB-54 cells in the presence of 8 µM polybrene.

2.4. Reporter assays

The lentiviral transfer vectors pFW-c-Fos-luc, c-Jun-luc, pFW-Coll-luc, pFW-Coll-luc Δ Tre, pFW-EBS2⁴-luc, pFW-Egr1.2-luc, pFW-Egr1.1-luc, pFW-Egr1.SRE-luc, pFW-UAS⁵sp1²-luc and pHIV7- β Gal have been described elsewhere [23-26]. HTB-54 cells were infected with recombinant lentiviruses encoding promoter/luciferase reporter genes. HTB-54 cells were cultured in RPMI 0.05% foetal bovine serum for 24 h before the stimulation. Cells were stimulated with 10 µM of **2**, 10 µM of **12** or 10 ng/mL of TPA, using DMSO as vehicle. Cell extracts were obtained using reporter lysis buffer (Promega), and analysed for luciferase activity as previously described [27]. Luciferase activity was normalised to the protein concentration, determined by the BCA method. Results are expressed as the mean ± SD of four replicates.

2.5. Preparation of extracts and Western Blot analysis

Nuclear extracts were obtained as previously described [28]. Then, 15 µg of nuclear protein were separated by SDS-PAGE and the blots were incubated with Egr-1 (Santa Cruz, # sc-189) and HDAC1 (Santa Cruz, # sc-81598), specific antibodies. Immunoreactive bands were detected via enhanced chemiluminescence [29].

3. Results

3.1. X-Gal histochemistry

To assess the feasibility of gene transfer into HTB-54 cells using lentiviral vectors, cells were first infected with a recombinant lentivirus expressing β -galactosidase (Figure 2). More than 80% of the cells expressed β -galactosidase, visualised with X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) histochemistry (not shown). The high infection rate obtained allowed us to continue this study.

Figure 2**3.2. Ap-1 transcriptional activity**

Since AP-1 is found to regulate the transcription response to several stress conditions, we evaluated whether incubation with **2** and **12** had an effect on AP-1 transcription. To measure AP-1 transcriptional activity, a collagenase promoter/luciferase reporter gene containing an AP-1 binding site in the proximal promoter region was used [17]. The collagenase promoter/luciferase reporter gene was inserted into the chromatin of HTB-54 cells using lentiviral gene transfer. A schematic representation of the integrated provirus encoding collagenase promoter/luciferase reporter gene is shown in Figure 3A. After insertion, HTB-54 cells were incubated in serum-reduced medium for 24 h before stimulation with **2** and **12**. Since the AP-1 binding site includes a TPA-responsive element (TRE), to ensure the efficiency of the lentiviral gene transfer TPA was used as a positive control [24,25]. Results showed that **12** increased transcription of the AP-1-responsive reporter gene, but no differences were found when cells were treated with **2** (Figure 3B). Compound **2** was no further analysed as we found lack of AP-1 up-regulation. To analyse the role of the TRE sequence on induction of the collagenase promoter by **12**, Coll Δ TRE, a mutant collagenase promoter lacking the TRE, was also evaluated (Figure 3A). As expected, mutation impaired reporter gene transcription after stimulation of the cells with TPA. However, only small differences were found after stimulation with **12** (Figure 3B), thus suggesting that the TRE does not mediate the collagenase promoter stimulation by **12**.

Figure 3

Since AP-1 is formed by homo- or heterodimers of c-Jun and c-Fos subfamilies of transcription factors, we then decided to analyse whether treating cells with compound **12** up-regulates c-Jun or c-Fos. With this purpose, HTB-54 cells were infected with lentivirus encoding either a c-Jun or a c-Fos promoter/luciferase reporter gene (Figure 4A). After infection, cells were incubated in serum-reduced medium for 24 h before stimulation with **12**. As

Resultados

shown in Figure 4B, up-regulation of c-Fos was detected after stimulation. Then we used an amplification system to compare c-Fos transcriptional activity before and after stimulation. The amplification was based on a co-infection of a lentivirus encoding a fusion protein of the GAL4 DNA-binding domain and the c-Fos activation domain (Figure 4C) with a lentivirus encoding a GAL4 responsive reporter gene (Figure 4D). Results shown in Figure 4E revealed that the transcription activation potential of c-Fos was significantly increased after stimulation with **12**.

Figure 4

3.3. *Egr-1 promoter activity*

Egr-1 has been related with the transcriptional response to several stress conditions [18]. For instance, ROS has been described to rapidly induce Egr-1 gene expression [19]. Upon this, and considering that MeSeH can interact with the redox system of the cells, we decided to evaluate the influence of compounds **2** and **12** on Egr-1 transcription. To analyse Egr-1 promoter activity in HTB-54 **2**- or **12**-stimulated cells, a chromosomally embedded Egr-1 responsive luciferase reporter gene containing four Egr-1 binding sites (EBS) was used (Figure 5A). As shown in Figure 5B, both compounds, **2** and **12**, were able to induce Egr-1 responsive reporter gene transcription, though compound **12** was more effective.

The human Egr-1 gene promoter contains a TATA box, five serum response elements (SRE), several binding sites for ternary complex factors (Ets) and a cyclic AMP response element (CRE) (Figure 5C). To test the role of these motives in Egr-1 promoter induction by **12**, we inserted Egr-1 promoter/luciferase deletion constructs Egr1.2, Egr1.1 and Egr1SRE into the chromatin of HTB-54 cells using lentiviral gene transfer. As shown in Figures 5C, 5E and 5G, Egr1.2 contains a promoter carrying up to five SRE and one CRE binding sites, while Egr1.1 lacks the distal SREs and Egr1SRE only contains the two proximal SRE of the Egr-1 promoter. As shown in Figures 5D, 5F and 5H, Egr1.2 and Egr1.1 display higher promoter activities than Egr1SRE thus suggesting that the distal SRE and the CRE are involved in Egr-1 up-regulation by compound **12**.

Figure 5

Transcriptional activation of Egr-1 is often preceded by an activation of Elk-1, a member of the Ets family of transcription factors. It has been described that Elk-1 binds to DNA and to the serum response factor (SRF) when phosphorylated [30]. To evaluate whether stimulation of HTB-54 cells with **12** enhances or not Elk-1 transcriptional activity, we used the GAL4 based amplification system described above. With this purpose, HTB-54 cells were co-infected with one lentivirus encoding a fusion protein consisting of the GAL4 DNA-binding domain and the Elk-1 activation domain (Figure 6A) and other lentivirus encoding a GAL4 responsive reporter gene (Figure 4D). After infection, serum-starved cells were stimulated for 24 h with **12** and luciferase activity was determined in cell extracts. Obtained results (Figure 6B) revealed that stimulation enhanced the transcription activation potential of Elk-1.

Figure 6

Moreover, to test whether compound **12** also increased Egr-1 biosynthesis, HTB-54 cells were stimulated with 10 µM of compound **12**, nuclear cell extracts were prepared at different time points and subjected to Western-Blot analysis. Results (Figure 7) revealed that Egr-1 expression levels, undetectable in the absence of stimulation, were highly increased after stimulation with **12**. Well in agreement with literature and with the idea that Egr-1 is an early response gene, results also show that Egr-1 up-regulation was transient with a peak expression after 1 hour stimulation.

Figure 7

4. Discussion

This study aims to analyse whether AP-1 and Egr-1 transcription was affected in lung cancer cells treated with novel methylselenocarbamates designed as prodrugs. We have previously reported that these compounds display an interesting cytotoxic profile and, also, that the lead compound (**2**) was able to

Resultados

induce apoptosis and cell cycle arrest. Besides, their ability to release MeSeH has also been proved [21]. Since MeSeH is an active selenium metabolite that interacts with the redox system of the cells [12], oxidative stress is a likely explanation for apoptosis induction by **2**.

AP-1 and Egr-1 are two transcription factors involved in the cellular response to different extracellular signals, including stress conditions and ROS imbalance. Here, using lentiviral gene transfer to integrate either the AP-1-responsive collagenase promoter/luciferase reporter gen construct or the AP-1-responsive c-Fos promoter/luciferase reporter gen construct into the chromatin of HTB-54 cells we detected induction of luciferase activity by compound **12** (Figures 3B and 4B). Moreover, when co-infection of the cells with a lentivirus encoding a GAL4-responsive luciferase reporter construct and a lentivirus encoding a GAL4-c-Fos chimaera was carried out, induction of c-Fos transcriptional activity was also detected after stimulation with **12** (Figure 4E). Since c-Fos is a classical constituent of AP-1, taken together these results suggest induction of AP-1 activity by **12**.

Regarding to Egr-1, induction of both Egr-1 promoter (Figure 5D) and Egr-1 activity (Figure 5B) by **12** was also detected in HTB-54 cells. Further analysis of the role of the different motives present in the Egr-1 promoter suggested that a CRE and a distal SRE are involved in Egr-1 up-regulation by compound **12** (Figures 5F and 5H). Up-regulation of Egr-1 transcription is often preceded by activation of Elk-1, a member of the Ets family of transcription factors that binds to the serum response factor (SRF) when phosphorylated. Interestingly, we have also been able to detect induction of Elk-1 transcriptional activity by **12** in HTB-54 cells when co-infecting cells with a lentivirus encoding a GAL4-responsive luciferase reporter construct and a lentivirus encoding a GAL4-Elk-1 chimaera (Figure 6B).

In summary, this study constitutes a first approach to the biological mechanism of action of the novel methylselenocarbamates reported by us [20]. Despite optimization of the protocol concerning incubation times or stimuli concentration among other parameters needs to be done, our results suggest that treatment with **12** promotes an up-regulation of AP-1 and Egr-1 activity in HTB-54 cells. Therefore, we propose that novel methylselenocarbamates may cause ROS

imbalance and oxidative stress in HTB-54 lung cancer cells, thus starting a cellular response that finally drives cells to apoptosis.

Acknowledgements

B. Romano wishes to express her gratitude to The friends of the University of Navarra Inc. for the pre-doctoral fellowship.

References

- [1] Hatfield DL, Tsuji PA, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends Biochem Sci*. 2014 Mar;39(3):112-20.
- [2] Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet*. 2012 Mar 31;379(9822):1256-68.
- [3] Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Oct 18;8(3):160-71. PubMed PMID: 22009156.
- [4] Sanmartín C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):9649-72.
- [5] Chen YC, Prabhu KS, Mastro AM. Is selenium a potential treatment for cancer metastasis? *Nutrients*. 2013 Apr 8;5(4):1149-68.
- [6] Kim JH, Yu J, Alexander V, Choi JH, Song J, Lee HW, Kim HO, Choi J, Lee SK, Jeong LS. Structure-activity relationships of 2'-modified-4'-selenoarabinofuranosyl-pyrimidines as anticancer agents. *Eur J Med Chem*. 2014 Aug 18;83:208-25.
- [7] Sinha I, Null K, Wolter W, Suckow MA, King T, Pinto JT, Sinha R. Methylseleninic acid downregulates hypoxia-inducible factor-1 α in invasive prostate cancer. *Int J Cancer*. 2012 Mar 15;130(6):1430-9.
- [8] Zeng H, Cheng WH, Johnson LK. Methylselenol, a selenium metabolite, modulates p53 pathway and inhibits the growth of colon cancer xenografts in Balb/c mice. *J Nutr Biochem*. 2013 May;24(5):776-80.
- [9] Zhang J, Wang L, Anderson LB, Witthuhn B, Xu Y, Lü J. Proteomic profiling of potential molecular targets of methyl-selenium compounds in the transgenic

Resultados

- adenocarcinoma of mouse prostate model. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Aug;3(8):994-1006.
- [10] Van Rite BD, Krais JJ, Cherry M, Sikavitsas VI, Kurkjian C, Harrison RG. Antitumor activity of an enzyme prodrug therapy targeted to the breast tumor vasculature. *Cancer Invest*. 2013 Oct;31(8):505-10.
- [11] Ren Y, Wang Y, Liu H, Yan H, Chen J, Hou M, Li W, Fan Y, Zhou Q. [Influence of MSA on cell growth and spontaneous metastasis of L9981-Luc lung cancer transplanted model in nude mice by bioluminescence imaging]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2013 Feb;16(2):67-72.
- [12] Fernandes AP, Wallenberg M, Gandin V, Misra S, Tisato F, Marzano C, Rigobello MP, Kumar S, Björnstedt M. Methylselenol formed by spontaneous methylation of selenide is a superior selenium substrate to the thioredoxin and glutaredoxin systems. *PLoS One*. 2012;7(11):e50727.
- [13] Zeng H, Wu M, Botnen JH. Methylselenol, a selenium metabolite, induces cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis via the extracellular-regulated kinase 1/2 pathway and other cancer signaling genes. *J Nutr*. 2009 Sep;139(9):1613-8.
- [14] Wang Z, Jiang C, Lü J. Induction of caspase-mediated apoptosis and cell-cycle G1 arrest by selenium metabolite methylselenol. *Mol Carcinog*. 2002 Jul;34(3):113-20.
- [15] Wagner EF. AP-1--Introductory remarks. *Oncogene*. 2001 Apr 30;20(19):2334-5.
- [16] Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002 May;4(5):E131-6.
- [17] Thiel G, Rössler OG. Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription. *Mol Nutr Food Res*. 2014 Jul;58(7):1402-13. doi: 10.1002/mnfr.201300913. Epub 2014 Apr 22.
- [18] Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol*. 2002 Dec;193(3):287-92.
- [19] Pagel JI, Deindl E. Disease progression mediated by egr-1 associated signaling in response to oxidative stress. *Int J Mol Sci*. 2012 Oct 12;13(10):13104-17.

Resultados

- [20] Romano B, Font M, Encio I, Palop JA, Sanmartín C. Synthesis and antiproliferative activity of novel methylselenocarbamates. *Eur J Med Chem.* 2014 Aug 18;83:674-84.
- [21] Romano B, Palop JA, Sanmartín C, Lizarraga E. Thermal analysis of novel selenocarbamates. *J Therm Anal Calorim.* Submitted.
- [22] Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science.* 2002 Feb 1;295(5556):868-72.
- [23] Kaufmann A, Keim A, Thiel G. Regulation of immediate-early gene transcription following activation of $\text{G}\alpha(q)$ -coupled designer receptors. *J Cell Biochem.* 2013 Mar;114(3):681-96.
- [24] Rössler OG, Henss I, Thiel G. Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 2008 Feb 1;470(1):93-102.
- [25] Müller I, Lipp P, Thiel G. Ca²⁺ signaling and gene transcription in glucose-stimulated insulinoma cells. *Cell Calcium.* 2012 Aug;52(2):137-51.
- [26] Keim A, Müller I, Thiel G. Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer. *J Neurosci Methods.* 2012;206(2):138-42.
- [27] Thiel G, Kaufmann K, Magin A, Lietz M, Bach K, Cramer M. The human transcriptional repressor protein NAB1: expression and biological activity. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Oct 2;1493(3):289-301.
- [28] Kaufmann K, Thiel G. Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J Cell Biochem.* 2002;85(2):381-91.
- [29] Mayer SI, Müller I, Mannebach S, Endo T, Thiel G. Signal transduction of pregnenolone sulfate in insulinoma cells: activation of Egr-1 expression involving TRPM3, voltage-gated calcium channels, ERK, and ternary complex factors. *J Biol Chem.* 2011 Mar 25;286(12):10084-96.
- [30] Thiel G, Mayer SI, Müller I, Stefano L, Rössler OG. Egr-1-A Ca(2+)-regulated transcription factor. *Cell Calcium.* 2010 May;47(5):397-403.

Resultados

Figure 1. Chemical structures of Methyl *N,N'*-bis(propyloxycarbonyl)imidoselenocarbamate (2) and Methyl *N,N'*-bis(benzyloxycarbonyl)imidoselenocarbamate (12).

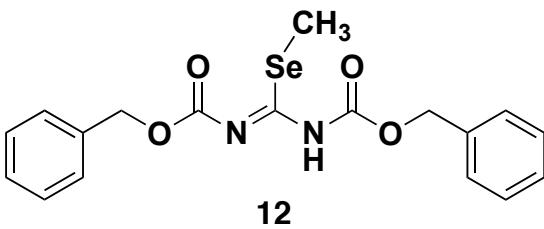
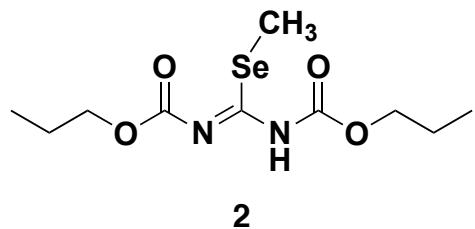


Figure 2. Diagram of the lentiviral transfer vector HIV-7/β-gal. The β-galactosidase coding region is inserted downstream of the CMV promoter/enhancer. The woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) is indicated [26].

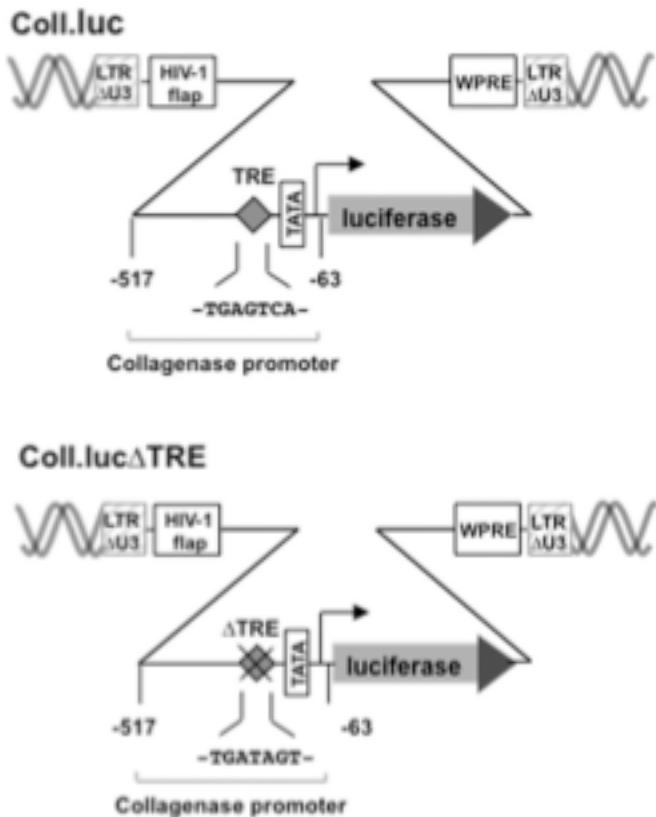


Resultados

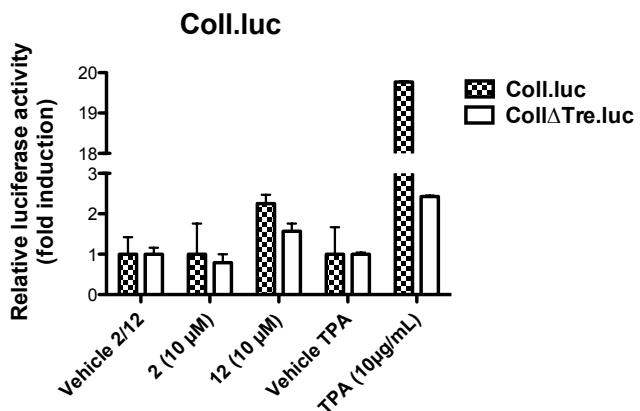
Figure 3. Effect of compounds 2 and 12 on AP-1 transcriptional activity in HTB-54 cells.

(A) Schematic representation of the luciferase reporter gene controlled by human collagenase-promotor, sequence from -517 to +63, containing one TRE or a mutated sequence. The U3 region of the 5' LTR of the transfer vector is deleted. The locations of the WPRE and the HIV flap element are indicated. (B) HTB-54 cells were infected with recombinant lentiviruses encoding collagenase reporter/luciferase reporter gene, containing or not an active TRE.

A



B

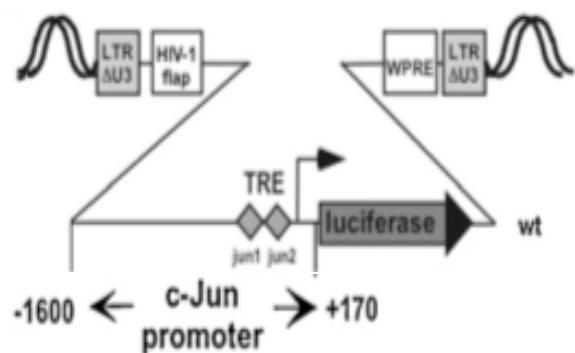


Resultados

Figure 4. Influence of compound 12 on c-Jun and c-Fos transcriptional activity in HTB-54 cells. (A) Schematic representation of the luciferase reporter gene controlled by c-Jun promoter, sequence from -1600 to +170, containing a TPA Response Element (TRE). Luciferase reporter gene controlled by c-Fos promoter, sequence from -711 to +42, containing one Serum Response Elements (SRE) and one c-AMP Response Elements (CRE) is also depicted. The U3 region of the 5' LTR of the transfer vector is deleted. The locations of the WPRE and the HIV flap element are indicated. (B) HTB-54 cells were infected with either a recombinant lentivirus encoding a c-Jun or a c-Fos promoter/luciferase reporter gene. (C) Schematic representation of the modular structure of c-Fos and GAL4-c-Fos (D) Schematic representation of UAS⁵Sp1².luc that contains a luciferase reporter under the control of a minimal promoter, consisting of two Sp1 binding sites, a TATA box and an initiator element. Upstream of the minimal promoter, five GAL4 binding sites (upstream activating sequence, UAS) were inserted. (E) HTB-54 cells were double infected with a recombinant lentivirus encoding a GAL4-responsive luciferase reporter gene and a lentivirus encoding GAL4-c-Fos.

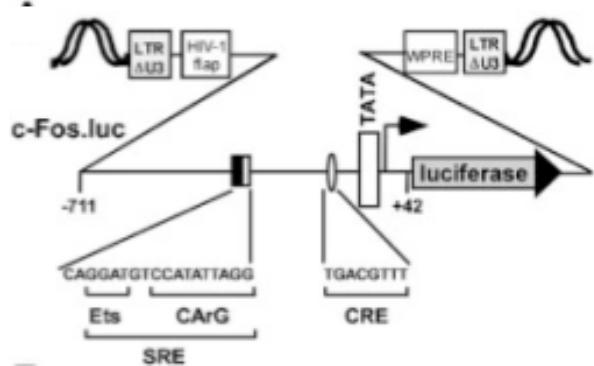
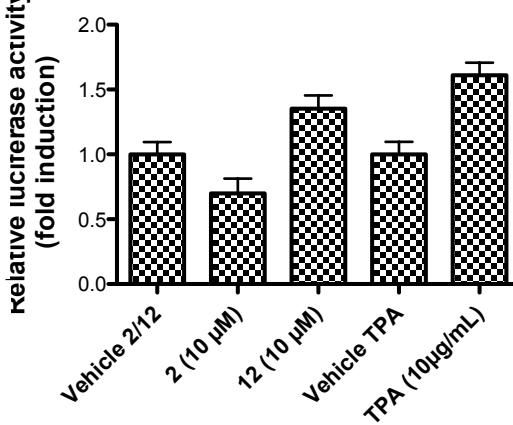
Resultados

A



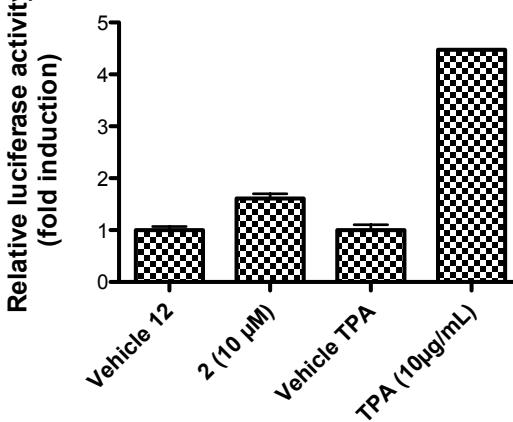
B

c-Jun.luc



Relative luciferase activity (fold induction)

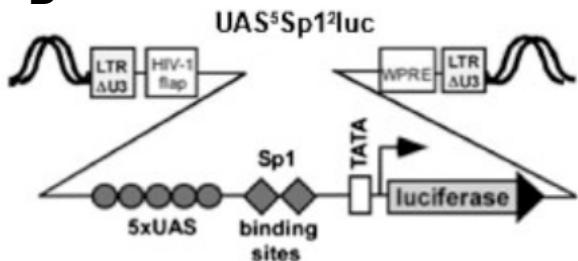
c-Fos.luc



C

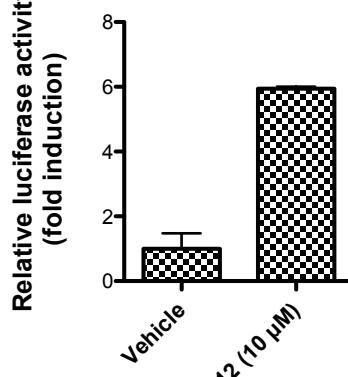


D



E

UAS⁵Sp1².luc/GAL4-c-Fos



Resultados

Figure 5. Influence of compound 12 on transcription of Egr-1 in HTB-54 cells. (A) Reporter plasmid that contains four Egr-1 Binding Sites (EBS). (B) HTB-54 cells were infected with a recombinant lentivirus encoding an EBS24 reporter/luciferase reporter gene. (C) Luciferase reporter gene controlled by Egr-1 promoter, sequence from -492 to +235 of the human EGR-1 gene, containing one CRE, two proximal and three distal SRE. (D) HTB-54 cells were infected with a recombinant lentivirus expressing an Egr-1 reporter/luciferase reporter gene. (E) Luciferase reporter gene controlled by the sequence from -237 to +235 of the Egr-1 promoter, containing one CRE and two proximal SRE. (F) HTB-54 cells were infected with a recombinant lentivirus encoding a luciferase reporter gene controlled by a minimal promoter of Egr-1. (G) Luciferase reporter gene controlled by a minimal promoter consisting of the two proximal SRE of the Egr-1 promoter. (H) Regulation of a SRE controlled reporter gene by stimulation with compound **12**.

Resultados

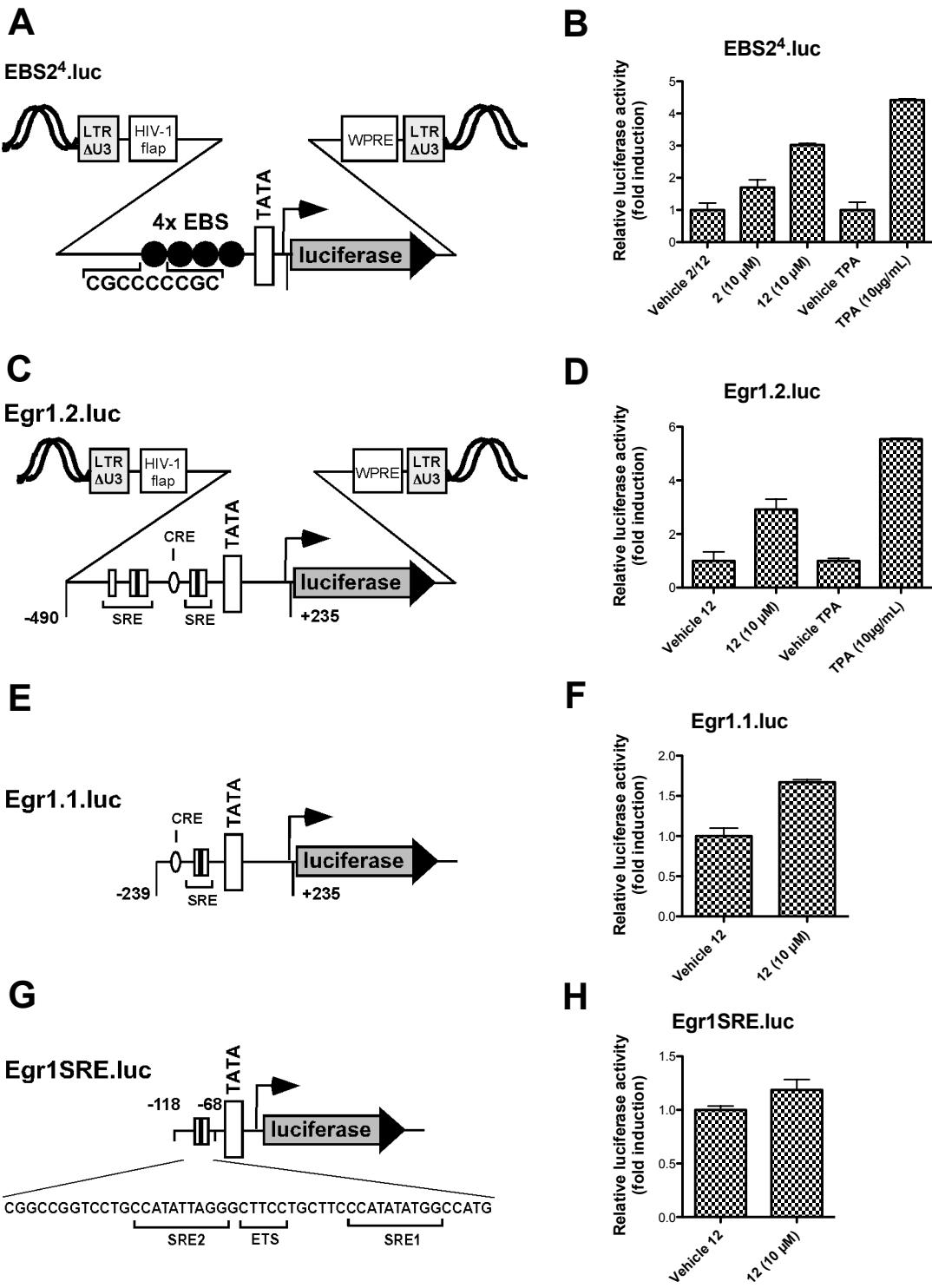
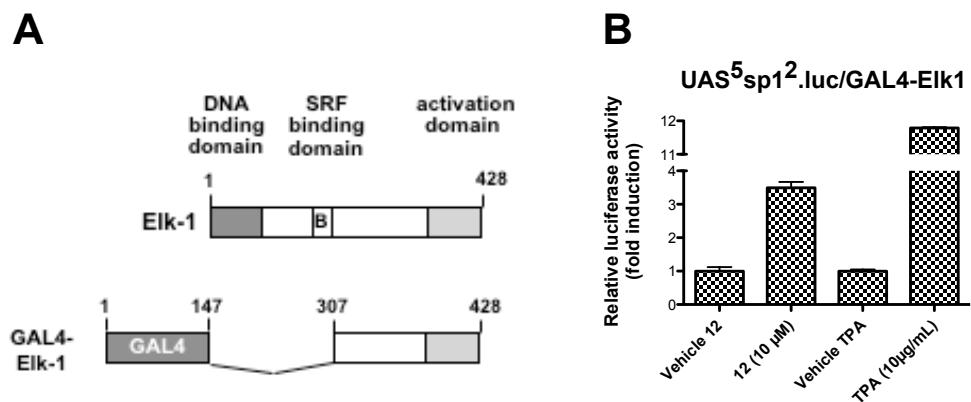
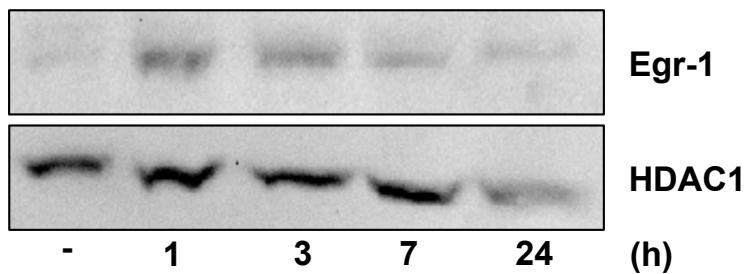


Figure 6. Transcriptional activation potential of Elk-1 is stimulated by compound 2 in HTB-54 cells. (A) Schematic representation of the modular structure of Elk-1 and GAL4-Elk1. (B) HTB-54 cells were double infected with a recombinant lentivirus encoding a GAL4-responsive luciferase reporter gene and a lentivirus encoding GAL4-Elk1.



Resultados

Figure 7. Compound 12 stimulates the biosynthesis of Egr-1 in HTB-54 cells. Egr-1 expression was analysed by immunoblotting. HDAC1 was used as loading control. DMSO was used as negative control (vehicle). Serum-starved HTB-54 cells were treated with 10 μ M of compound **12** for 1, 3, 7 and 24 hours.



Capítulo 3

Mycorrhizal inoculation affected growth, mineral composition, proteins and sugars in lettuces biofortified with organic or inorganic selenocompounds.

Sanmartín, C., Garmendia, I., Romano, B., Díaz, M., Palop, J. A., & Goicoechea, N. (2014). Mycorrhizal inoculation affected growth, mineral composition, proteins and sugars in lettuces biofortified with organic or inorganic selenocompounds. *Scientia Horticulturae*, 180, 40–51.

Resumen:

La inoculación de las lechugas con hongos micorrícos puede aumentar su valor nutricional. Sin embargo, se desconoce el papel de los hongos micorrícos-arbusculares (HMA) en la biofortificación de lechugas con selenio. Nosotros hemos analizado la capacidad de dos cultivares de lechuga, inoculadas o no con HMA, para acumular selenio en las hojas, tras la administración de selenito de sodio o compuestos organoselenados de nueva síntesis. El selenito de sodio fue el compuesto más eficaz para incrementar los niveles de selenio en las hojas, pero provocó una disminución de macronutrientes, micronutrientes y proteínas en uno de los cultivares. Si bien la inoculación con HMA redujo la acumulación de selenio en las hojas, las plantas inoculadas presentaron mayor contenido en minerales, proteínas y/o azúcares, en relación a los controles suplementados con selenio pero no inoculados con HMA. La inoculación con HMA puede afectar negativamente a la biofortificación con selenio, pero podría ser adecuada para el cultivo de lechugas en suelos seleníferos. Por último, la administración del imidoselenocarbamato mejoró la eficacia de los HMA para favorecer el crecimiento de las plantas de lechuga en invernadero, así como para aumentar los niveles de proteínas y azúcares en las hojas de este cultivo.

Capítulo 4

In vitro radical scavenging and cytotoxic activity of novel hybrid selenocarbamates

Romano, B., Plano, D., Encío, I., Palop, J. A., & Sanmartín, C. (2015). In vitro radical scavenging and cytotoxic activities of novel hybrid selenocarbamates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 1716–1727.

Resumen:

Se presenta la síntesis de 30 nuevos derivados selenocianato y diseleniuro que contienen en su estructura el grupo carbamato, y la determinación biológica de sus propiedades citotóxicas y antioxidantes. La actividad citotóxica de los nuevos compuestos se ha analizado *in vitro* frente un panel de líneas celulares humanas, entre las que se encuentran CCRF-CEM (leucemia linfoblástica), HT-29 (carcinoma de colon), HTB-54 (carcinoma de pulmón), PC-3 (carcinoma de próstata), MCF-7 (adenocarcinoma de mama), 184B5 (células no malignas derivadas de glándula mamaria) y BEAS-2B (células no malignas derivadas de epitelio bronquial). La mayoría de los compuestos mostraron una alta actividad antiproliferativa, con valores de GI₅₀ menores que 10 µM en las células MCF-7 CCRF-CEM y PC-3. Las propiedades antioxidantes de los nuevos selenocompuestos fueron confirmadas por medio de técnicas que determinan la capacidad de secuestrar radicales libres de DPPH y ABTS.

Basándonos en la actividad peroxidasa de la selenoenzima glutatióperoxidasa (GPx), se analizó la capacidad de reducir peróxidos en presencia de tioles de los compuestos **1a**, **2e** y **2h**. Los resultados sugieren que la acción antioxidante del compuesto **1a** puede mimetizar la actividad GPx. Los parámetros citotóxicos, la actividad antioxidante y el perfil ADME destacan el compuesto **1a** como un candidato prometedor para el desarrollo de nuevos fármacos.

Capítulo 5

Thermal analysis of novel selenocarbamates

Romano, B., Palop, J., Sanmartín, C., & Lizarraga, E. (2016). Thermal analysis of novel selenocarbamates. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 123(3), 1951.

Resumen:

El elemento traza selenio y sus metabolitos están siendo valorados en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a la prevención y el tratamiento de cáncer. Con este objetivo, nuestro grupo de investigación ha presentado recientemente la síntesis de diversas series de nuevos selenocarbamatos. En este artículo se presenta el análisis térmico de los nuevos compuestos, llevado a cabo por técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC en sus siglas en inglés) y análisis termogravimétrico (TGA). Se propone que la inestabilidad térmica de ciertos derivados está relacionada con la liberación de metabolitos activos, que en última instancia son responsables de las buenas actividades citotóxicas mostradas por los compuestos.

Discusión

Nota: El Apéndice 1 (pág. 289) recoge la relación de compuestos presentados en esta memoria, con las referencias utilizadas en los distintos artículos que constituyen los capítulos centrales. Para facilitar la lectura de la discusión y las conclusiones, se han utilizado dichas referencias en lugar de los nombres químicos de los compuestos.

El cáncer continúa en la actualidad siendo un problema de salud pública a nivel mundial. Si bien las tasas globales de mortalidad van disminuyendo, resultado de los programas de prevención y detección precoz, se prevé que las muertes anuales relacionadas con el cáncer sigan en niveles inaceptables en las próximas décadas.

A la vez que avanza el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que inician el proceso de oncogénesis, se describen nuevas dianas terapéuticas que, en el mejor supuesto, podrían estar presentes únicamente en las células malignas, conduciendo en un futuro al desarrollo de medicamentos más específicos y eficaces. Hay que destacar que, ya en los últimos años, la calidad de vida del paciente oncológico ha mejorado considerablemente con el desarrollo de nuevos tratamientos, conocidos como terapias dirigidas, más selectivos y que, por tanto, presentan menos efectos secundarios indeseables.

Es importante mencionar que estos avances en los cambios celulares que inician el proceso de carcinogénesis también permiten diseñar estrategias de prevención. Se conoce la importancia de la dieta en el desarrollo de esta enfermedad y se ha constatado que dietas ricas en frutas y verduras pueden prevenir el comienzo de este proceso. Este hecho está relacionado con el elevado contenido de sustancias antioxidantes presentes en este grupo de alimentos, que pueden colaborar con los mecanismos celulares en la protección de daños en el ADN, punto clave de inicio en la transformación de una célula normal hacia célula cancerosa.

Como se ha comentado ya en esta Memoria, el selenio es uno de los elementos más interesantes por sus comprobadas acciones quimiopreventiva y quimioterápica ampliamente descritas. Considerado en un principio como un elemento tóxico, se descubrió que forma parte del código genético y está presente en el organismo humano formando parte de las selenoproteínas, relacionadas con el mantenimiento redox celular. La publicación de un estudio epidemiológico, que relacionaba regiones cuyos suelos son ricos en selenio, con baja prevalencia de cáncer, hizo crecer el interés por este elemento. Se han programado diversos estudios para valorar la eficacia de la suplementación de selenio en la prevención del cáncer, siendo destacable el NPCT (*Nutritional Prevention of Cancer Trial*), en el que se confirmó una disminución en la prevalencia de cáncer de próstata del 60 % en el grupo que fue tratado con un suplemento de selenio.

Una amplia revisión bibliográfica de los compuestos de selenio biológicamente activos, tanto de origen natural como sintético, nos ha conducido al diseño racional de compuestos híbridos de selenio conteniendo también un grupo carbamato, presente en numerosos fármacos, con el objetivo de obtener nuevas entidades químicas con

Discusión

potenciales actividades quimiopreventiva y/o quimioterápica. La búsqueda bibliográfica, así como la experiencia previa del equipo, han conducido al diseño de tres series para su estudio paralelo, en las que el selenio se presenta en la forma química de grupo metilselenourea, selenocianato y diseleniuro respectivamente (Figura 24).

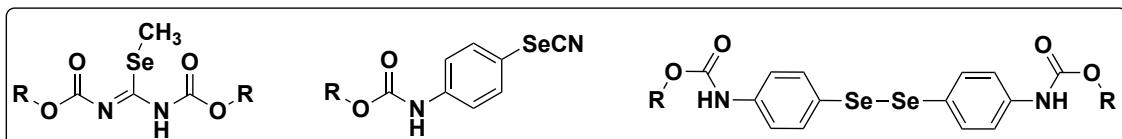


Figura 24: Estructuras generales de los nuevos carbamatos selenados.

La presencia del grupo carbamato en todas las series propuestas tiene una justificación múltiple: aumento de la polaridad de la molécula; actuación como conexión entre el grupo central selenado y los extremos activos, de forma que se aumente la accesibilidad química del grupo selenado y, por último, permitir la hidrólisis o fisión de los compuestos, liberando especies aniónicas o radicálicas que puedan actuar como pro-fármacos. En las tres series se han introducido los mismos grupos considerados activos en la *O*-sustitución de la función carbamato, restos alifáticos, aromáticos o heteroaromáticos, con el fin de explorar la influencia de esta zona de la molécula en la actividad biológica ejerciendo acción moduladora. Se han sintetizado siguiendo este diseño quince compuestos para cada serie, añadiendo uno más a la serie de metilselenourea, en la que se ha podido aislar un derivado mono-sustituido (**16**).

Los procedimientos de síntesis se han conseguido optimizar de modo que presentan cuatro etapas como máximo y las condiciones de reacción que se emplean en la mayoría de las reacciones son suaves, sin recurrir a catalizadores costosos y sin ser necesarias condiciones de presión o temperatura extremas, lo que permite calificar al proceso sintético de eficiente en términos económicos y de tiempo. Una vez desarrollada la síntesis y con anterioridad a la realización de pruebas biológicas, todos los derivados han sido inequívocamente caracterizados mediante técnicas analíticas instrumentales de espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas cuando ha resultado necesario; mediante microanálisis elemental se ha comprobado que todos los compuestos poseen el grado de pureza requerido para la realización de pruebas biológicas.

Tal y como se ha tenido en cuenta desde el propio diseño de las moléculas, es deseable que los derivados se comporten como pro-fármacos, lo que implica que éstos presenten la suficiente estabilidad durante el transporte de manera que pueden llegar inalterados a la célula pero que, una vez en el ámbito celular, puedan sufrir procesos de fisión o hidrólisis conducentes a la liberación de fragmentos activos. En un intento de evaluación de la estabilidad de los compuestos, se determinaron algunas de sus características térmicas, mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). La interpretación de los datos obtenidos muestra una mayor estabilidad para los compuestos tipo selenocianato y diseleniuro (**1a-o** y **2a-o**), sin apreciarse grandes diferencias al comparar estas dos series. Los compuestos *Se*-

metilselenourea (**1-16**), menos estables en general, presentan mayor variabilidad entre ellos. Los compuestos con *O*-sustitución alifática del grupo carbamato (**1-6**) se muestran como los más inestables y presentan una etapa degradativa por debajo de 100 °C, que puede atribuirse a la pérdida de un metilo. Ante la sospecha, basada en su estructura, de que estos compuestos pudiesen liberar en el interior celular metilselenol, uno de los metabolitos del selenio más activos en un mecanismo de acción ampliamente descrito, se diseñó un estudio para el seguimiento de esta posible liberación usando técnicas de cromatografía gaseosa con detección de masas (GC-MS). En condiciones favorables de hidrólisis, los compuestos de la serie *Se*-metilselenourea analizados producen la liberación de metilselenol, que se oxida posteriormente a diseleniuro de dimetilo detectado en GS-MS, resultado que apoya nuestra hipótesis de que los compuestos sintetizados puedan actuar como pro-drogas.

La actividad citotóxica de todos los derivados sintetizados se ha evaluado en un panel representativo de líneas celulares tumorales, que incluye tumores líquidos, sólidos y dependientes de hormonas: adenocarcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de colon (HT-29), leucemia T-linfoblástica (CCRF-CEM), carcinoma de próstata (PC-3) y carcinoma de pulmón (HTB-54). Los compuestos **1-16** se han ensayado además en una línea celular de leucemia linfocítica (K-562), que resultó ser la línea celular más resistente a la acción de los compuestos, por lo que decidimos no evaluar en estas células los compuestos **1a-o** y **2a-o**. De los cuarenta y seis compuestos sintetizados, hasta cuarenta y cinco presentan valores de GI₅₀ inferiores a 10 µM en alguna de las líneas celulares tumorales humanas ensayadas de donde se puede concluir que es remarcable la capacidad antiproliferativa de estos compuestos. En general, la línea celular de leucemia T-linfoblástica CCRF-CEM resulta la más sensible al tratamiento con los derivados carbamatos selenados. Una primera aproximación a la relación estructura-actividad muestra que los derivados que contienen el grupo *Se*-metilselenourea (**1-16**) poseen un mayor poder antiproliferativo, en comparación con sus análogos selenocianato y diseleniuro, en todas las líneas celulares ensayadas, presentando todos los compuestos valores de GI₅₀ menores que 10 µM en al menos tres de las líneas celulares tumorales analizadas.

En las líneas celulares leucemia T-linfoblástica (CCRF-CEM) y adenocarcinoma de pulmón (HTB-54), la mayoría de los compuestos de estructura *Se*-metilselenourea (**1-16**) presentan valores inferiores a 10 µM en los tres parámetros citotóxicos evaluados, mostrando especialmente una gran capacidad antiproliferativa. De acuerdo con los resultados de análisis térmico y GS-MS presentados, la mayor actividad citotóxica de los compuestos **1-16** podría deberse a la liberación de metilselenol tras la hidrólisis de las moléculas en el medio acuoso celular. Esta idea se sustenta en que los compuestos que mayor cantidad de metilselenol liberan, de forma prolongada en el tiempo, **2** y **3**, son además dos de los compuestos más citotóxicos y antiproliferativos.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los mayores problemas de los quimioterápicos en uso es la existencia de efectos adversos sobre las células sanas, es decir, falta de especificidad en la actuación exclusiva sobre las células tumorales. Aunque también es cierto que, por las características dramáticas de la enfermedad, no

Discusión

debería excluirse un potente antineoplásico por el hecho de no ser selectivo. Sin embargo, como una aproximación a este problema, parece procedente la valoración de la toxicidad de un fármaco potencial en líneas celulares no tumorales. Se han investigado comportamientos de los compuestos presentados en esta Memoria sobre líneas sanas de mama (184B5) y de pulmón (BEAS-2B), para evaluar el índice de selectividad (SI) *in vitro* y considerarlo como un parámetro importante para la selección de líderes. El análisis de estos datos muestra que los compuestos **1-16** presentan selectividad *in vitro* en pulmón, siendo los compuestos **2** ($SI_{GI50} = 11$, $SI_{TGI} = 9$, $SI_{LC50} = 8$) y **12** ($SI_{GI50} = 5$, $SI_{TGI} = 7$, $SI_{LC50} = 8$) los más selectivos. También en este aspecto, como en otros datos descritos hasta el momento, se pone de manifiesto la superioridad terapéutica de los compuestos de la serie *Se*-metilselenourea al compararlos con las otras series desarrolladas.

Con el fin de realizar una primera aproximación al mecanismo de acción por el cual los compuestos **1-16** ejercen su acción citotóxica se seleccionaron los compuestos más activos y selectivos, siendo estos los referidos como **2** y **12**, y las líneas celulares que resultaron más sensibles a la acción de estos compuestos, CCRF-CEM y HTB-54. Tomando como referencia la capacidad anticancerosa descrita para el metilselenol, se procedió a la valoración de la influencia de estos compuestos en el desarrollo del ciclo celular y la inducción de apoptosis. Los resultados del estudio del ciclo celular muestran que el compuesto **2** es capaz de bloquear el ciclo celular, en la fase G_0/G_1 en células CCRF-CEM, y en la fase G_2/M en células HTB-54. Además, el compuesto **2** induce un proceso de muerte celular apoptótica dependiente de caspasas en células CCRF-CEM y HTB-54, que es función de la concentración y del tiempo de exposición al compuesto.

Considerando que el arresto del ciclo celular y la inducción de apoptosis constituyen la consecuencia final de la acción de estos compuestos, se decidió evaluar el efecto de **2** y **12** en la transcripción y actividad de AP-1 y Egr-1. Estos dos factores de transcripción están ligados a la respuesta celular a condiciones de estrés y acumulación de ROS, por lo que se propone que puedan estar involucrados en las primeras etapas de la acción citotóxica de los derivados *Se*-metilselenourea. Los primeros resultados apuntan a un incremento en la transcripción y actividad transcripcional de AP-1 y Egr-1 en las células HTB-54 tratadas con **12**. El tratamiento de las células con **12** también aumenta los niveles de expresión de Egr-1, cuyos niveles basales son indetectables, tras 1 hora de incubación. Este tiempo de respuesta concuerda con los datos de la bibliografía y sugiere que la respuesta de Egr-1 al tratamiento es rápida, poniendo en marcha la cascada de señalización que finalmente termina con la inducción de apoptosis. La profundización posterior en este aspecto de la investigación, tendría como objetivo la confirmación de estos datos iniciales y la determinación temporal de toda la vía de señalización.

Una segunda idea reflejada en la hipótesis que activó desde el principio este trabajo de investigación, es la de esperar que la asociación estructural en moléculas de nueva síntesis, del elemento selenio bajo distintas funcionalizaciones y el grupo carbamato, completada con la presencia de fragmentos de probada actividad biológica, confiriese a dichas moléculas carácter antioxidante y, en caso de cumplirse esta

predicción, los nuevos compuestos podrían ser candidatos para su uso como potenciales quimiopreventivos.

Tomando como base la importante actuación redox de las selenoproteínas en el funcionamiento del organismo humano, puede admitirse que la acción antioxidante de un compuesto selenado podría ser un buen indicio de su comportamiento como quimiopreventivo. Con este objetivo presente, se procedió al análisis como antioxidantes de los compuestos que contienen grupos cianoselanilo y diseleniuro, **1a-o** y **2a-o**, grupos cuya actividad antioxidante ha sido ampliamente descrita, mediante dos técnicas colorimétricas. Ambas técnicas determinan la capacidad de los compuestos de secuestrar radicales libres del medio. Todos los compuestos analizados fueron capaces de eliminar, radicales libres, destacando en esta acción los compuestos diseleniuro. La mayor capacidad antioxidante mostrada por los derivados **2a-o** podría deberse a la ruptura homolítica del enlace Se-Se de los mismos, que podría liberar radicales libres selenados estables capaces de reaccionar con los radicales presentes en el medio, mimetizando la captación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otro lado, considerando la acción de las selenoenzimas Glutation peroxidasa (GPxs), se quiso valorar si la acción antioxidante de estos compuestos podría seguir un mecanismo de eliminación de peróxidos similar al de estas enzimas. Los resultados de este estudio sugieren que el compuesto **1a** puede reducir peróxidos siguiendo un mecanismo de acción catalítico similar al de las GPx.

Teniendo en cuenta los estudios que relacionan áreas geográficas con un mayor contenido natural de selenio en suelo, con una menor prevalencia de cáncer, se diseñó un estudio de biofortificación de vegetales con selenocompuestos inorgánicos y orgánicos de nueva síntesis en colaboración con un grupo de investigación de Fisiología Vegetal. La administración del compuesto *N,N'-bis(4-fluorofenoxy carbonyl) imidoselenocarbamato de metilo* (compuesto **11**), elegido por su contenido en fluor, elemento presente en múltiples fertilizantes, en plantas de lechuga inoculadas con hongos micorrícos-arbusculares (HMA) provocó una mejora de la eficacia de dichos HMA para favorecer el crecimiento de las plantas de lechuga en invernadero, así como para aumentar los niveles de proteínas y azúcares en hoja de este cultivo. Conociendo el papel fundamental que juega la dieta en el desarrollo del cáncer y el auge en el mercado de los alimentos funcionales, se presenta esta experiencia como una primicia en el prometedor campo del desarrollo de terapias quimiopreventivas relacionadas con la alimentación.

En resumen, en el marco de una línea de investigación en el área del cáncer, se han diseñado tres nuevas series de compuestos, aparentemente dispares entre ellas pero respondiendo a unos parámetros estructurales comunes que se han previsto como farmacóforos: presencia del elemento selenio, uso de un link carbamato y sustituyentes variados que permiten modulación, si bien, se han asociado en formas químicas diferentes en las tres series. Este diseño dirigido permite esperar en hipótesis comportamientos y actividades interesantes en el área oncológica aunque sea a nivel muy preliminar.

Discusión

Resuelta la síntesis y preparado un número suficiente de compuestos de cada serie con los requerimientos biológicos adecuados para su ensayo, se han explorado sus posibilidades biológicas de actuación. Los resultados muestran que, según sus estructuras, unos compuestos han presentado un interesante carácter antioxidante, otros se comportan como agentes antiproliferativos potentes en distintas líneas celulares tumorales y algunos muestran citotoxicidad con valores de alta actividad.

Además, se ha realizado algún sondeo en cuanto a mecanismos de acción y se han valorado posibilidades de actuación en enriquecimiento de alimentación funcional de algún compuesto.

Basándose en estos resultados, el trabajo realizado, además de elevar a categoría de tesis la hipótesis de partida, ha permitido al grupo:

1. Realizar una modesta aportación al conocimiento en un área tan sensible como es el cáncer.
2. Extraer valiosas conclusiones sobre la relación estructura-actividad que abren prometedoras vías de continuidad en el grupo.
3. Completar la formación para la investigación de la doctoranda.
4. Contribuir al desarrollo de la química de un elemento de tan alto potencial biológico como es el selenio.
5. Y desarrollar una investigación ampliamente multidisciplinar de forma integrada.

Por todo lo cual, se consideran alcanzados los objetivos deseables para una Tesis Doctoral en Química Médica.

Conclusiones

El desarrollo de este proyecto de investigación y los resultados experimentales obtenidos han dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. La hipótesis de partida, consistente en atribuir carácter antioxidante y propiedades citotóxicas y antiproliferativas a moléculas orgánicas híbridas que contengan en su estructura elemento selenio y grupo carbamato, se ha cumplido.
2. Se ha confirmado la viabilidad de los esquemas de síntesis química propuestos para la obtención de los compuestos objetivo, aunque los rendimientos obtenidos no han sido altos.
3. Para la identificación inequívoca de estos nuevos compuestos han resultado eficaces las técnicas instrumentales habituales de espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Todos los compuestos se han conseguido con el grado de pureza requerido para la realización de pruebas biológicas fiables y reproducibles.
4. Las técnicas de Análisis Térmico aplicadas permiten atribuir una mayor estabilidad a los derivados conteniendo grupos cianoselanilo y diseleniuro que a los *Se*-metilselenourea. La inestabilidad de estos últimos es atribuible a la fragmentación de la molécula, que conlleva a la liberación de metilselenol. Esta liberación se ha podido comprobar mediante análisis por cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas.
5. De los cuarenta y seis compuestos sintetizados, cuarenta y cinco han presentado valores de GI₅₀ inferiores a 10 μM en alguna de las seis líneas celulares tumorales humanas en las que se ha valorado la citotoxicidad, corroborando la hipótesis planteada.
6. Los derivados que contienen el grupo metilselanilo (**1-16**) poseen un mayor poder citotóxico, en comparación con sus análogos cianoselanilo y diseleniuro, en todas las líneas celulares ensayadas, presentando todos los compuestos valores de GI₅₀ menores que 10 μM en al menos tres de las líneas celulares tumorales analizadas. En las líneas celulares CCRF-CEM y HTB-54, la mayoría de los compuestos **1-16** han presentado valores menores que 10 μM en todos los parámetros citotóxicos, mostrando una gran acción antiproliferativa.
7. La valoración de la selectividad, realizada *in vitro* en líneas celulares no tumorales, arroja unos resultados prometedores para los compuestos **1-16**, no encontrando selectividad en los compuestos **1a-o**, **2a-o**. Los índices de selectividad (SI) en las líneas de pulmón han permitido seleccionar dos compuestos líderes, el compuesto **2** y el compuesto **12**, con índices de selectividad comprendidos entre 5 y 11.
8. La mayor actividad citotóxica de los compuestos, unida a la selectividad que presentan *in vitro* en pulmón, pone de manifiesto la superioridad terapéutica de los compuestos que contienen el núcleo metilselanilo. El compuesto metil *N,N'*-bis(propoxicarbonil)imidoselenocarbamato (**2**) con actividad citotóxica y selectividad altas, es además el derivado que libera mayor cantidad de

Conclusiones

metilselenol de forma prolongada en el tiempo, corroborando la hipótesis planteada en este trabajo de que la hidrólisis de la molécula libera el fragmento activo.

9. El compuesto metil *N,N'*-bis(propoxicarbonil)imidoselenocarbamato induce un proceso de muerte celular apoptótica en células de leucemia y cáncer de pulmón, dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al compuesto. Además, en células HTB-54, se ha demostrado que están involucradas las caspasas en este proceso de muerte celular. Asimismo, dicho compuesto es capaz de bloquear el ciclo celular, en la fase G₀/G₁ en células CCRF-CEM, y en la fase G₂/M en células HTB-54.

10. El compuesto metil *N,N'*-bis(benziloxicarbonil)imidoselenocarbamato induce un aumento en la transcripción de AP-1 y Egr-1, mediado por Elk-1. Se ha comprobado que a nivel de proteína, **12** induce la biosíntesis de Egr-1, de forma temporal, con un pico de expresión 1 hora después del tratamiento.

11. Las propiedades antioxidantes de los derivados cianoselanilo y diseleniuro, valoradas como mecanismo quimiopreventivo, han sido confirmadas. La mayor capacidad antioxidante ha sido mostrada por los derivados diseleniuro y puede deberse a la ruptura homolítica del enlace Se-Se.

12. En una investigación colateral sobre el comportamiento de estos nuevos derivados selenados, se ha podido establecer que la administración como nutriente del compuesto metil *N,N'*-bis(4-fluorofenoxicarbonil)imidoselenocarbamato en dos cultivares de lechuga en crecimiento, inoculadas con hongos micorrílicos-arbusculares (HMA) mejora la eficacia de dichos HMA favoreciendo el crecimiento de las plantas en invernadero, así como aumentando los niveles de proteínas y azúcares en hoja de este cultivo.

Bibliografía

Abdel-Hafez ShH. Selenium containing heterocycles: synthesis, anti-inflammatory, analgesic and anti-microbial activities of some new 4-cyanopyridazine-3(2H)selenone derivatives. *Eur J Med Chem.* 2008 Sep;43(9):1971-7. PubMed PMID: 18242782.

Afanas'ev I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. *Aging Dis.* 2014 Feb;5(1):52-62. PubMed PMID: 24490117; PubMed Central PMCID: PMC3901614.

Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz MH, Iqbal Z. Role of selenium in male reproduction - a review. *Anim Reprod Sci.* 2014 Apr;146(1-2):55-62. PubMed PMID: 24613013.

Al-Zoobi L, Salti S, Colavecchio A, Jundi M, Nadiri A, Hassan GS, El-Gabalawy H, Mourad W. Enhancement of Rituximab-induced cell death by the physical association of CD20 with CD40 molecules on the cell surface. *Int Immunol.* 2014 Aug;26(8):451-65. PubMed PMID: 24894009.

American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2010.* Atlanta: American Cncer Society. 2010.

Ashton K, Hooper L, Harvey LJ, Hurst R, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2009 Jun;89(6):2025S-2039S. PubMed PMID: 19420095.

Ashworth A, Hudson TJ. Genomics: Comparisons across cancers. *Nature.* 2013 Oct 17;502(7471):306-7. PubMed PMID: 24132284.

Baquedano Y, Moreno E, Espuelas S, Nguewa P, Font M, Gutierrez KJ, Jiménez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartín C. Novel hybrid selenosulfonamides as potent antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* 2014 Mar 3;74:116-23. PubMed PMID: 24448421.

Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Oct;5(10):792-804. PubMed PMID: 15459660.

Bauer G. Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells. *Anticancer Res.* 2014 Apr;34(4):1467-82. PubMed PMID: 24692674.

Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J Reprod Fertil.* 1996 Mar;106(2):291-7. PubMed PMID: 8699413.

Benton D, Cook R. Selenium supplementation improves mood in a double-blind crossover trial. *Psychopharmacology (Berl).* 1990;102(4):549-50. PubMed PMID: 2096413.

Bhattacharya A, Seshadri M, Oven SD, Tóth K, Vaughan MM, Rustum YM. Tumor vascular maturation and improved drug delivery induced by methylselenocysteine leads to therapeutic synergy with anticancer drugs. *Clin Cancer*

Bibliografía

Res. 2008 Jun 15;14(12):3926-32. PubMed PMID: 18559614; PubMed Central PMCID: PMC2504718.

Bhattacharya A. Methylselenocysteine: a promising antiangiogenic agent for overcoming drug delivery barriers in solid malignancies for therapeutic synergy with anticancer drugs. Expert Opin Drug Deliv. 2011 Jun;8(6):749-63. PubMed PMID: 21473705; PubMed Central PMCID: PMC3111097.

Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, Leschik-Bonnet E, Müller MJ, Oberritter H, Schulze M, Stehle P, Watzl B. Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. Eur J Nutr. 2012 Sep;51(6):637-63. PubMed PMID: 22684631; PubMed Central PMCID: PMC3419346.

Bolanos-Garcia VM. Formation of multiprotein assemblies in the nucleus: the spindle assembly checkpoint. Int Rev Cell Mol Biol. 2014;307:151-74. PubMed PMID: 24380595.

Bonelli L, Camoriano A, Ravelli P, Missale G, Bruzzi P, Aste H. Reduction of the incidence of metachronous adenomas of the large bowel by means of antioxidants: A double blind randomized trial. Special Publication - Royal Society of Chemistry. 1999;240:451-455.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. Lancet Oncol. 2012 Aug;13(8):790-801. PubMed PMID: 22658655.

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. Swiss Med Wkly. 2012 Aug 17;142:w13659. PubMed PMID: 22903797.

Brigelius-Flohé R, Kipp AP. Selenium in the redox regulation of the Nrf2 and the Wnt pathway. Methods Enzymol. 2013;527:65-86. PubMed PMID: 23830626.

Brozmanová J, Mániková D, Vlčková V, Chovanec M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. Arch Toxicol. 2010 Dec;84(12):919-38. PubMed PMID: 20871980.

Byrns CN, Pitts MW, Gilman CA, Hashimoto AC, Berry MJ. Mice lacking selenoprotein P and selenocysteine lyase exhibit severe neurological dysfunction, neurodegeneration, and audiogenic seizures. J Biol Chem. 2014 Apr 4;289(14):9662-74. PubMed PMID: 24519931; PubMed Central PMCID: PMC3975015.

Chakraborty P, Roy SS, Sk UH, Bhattacharya S. Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by oral administration of diphenylmethyl selenocyanate. Free Radic Res. 2011 Feb;45(2):177-87. PubMed PMID: 20942565.

Chen J. An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). Asia Pac J Clin Nutr. 2012;21(3):320-6. PubMed PMID: 22705420.

Chen X, Yang G, Chen J, Chen X, Wen Z, Ge K. Studies on the relations of selenium and Keshan disease. *Biol Trace Elem Res.* 1980 Jun;2(2):91-107. PubMed PMID: 24272892.

Chen YC, Prabhu KS, Mastro AM. Is selenium a potential treatment for cancer metastasis?. *Nutrients.* 2013 Apr 8;5(4):1149-68. PubMed PMID: 23567478; PubMed Central PMCID: PMC3705340.

Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010 Mar 15;48(6):749-62. PubMed PMID: 20045723; PubMed Central PMCID: PMC2823977.

Clague J, Bernstein L. Physical activity and cancer. *Curr Oncol Rep.* 2012 Dec;14(6):550-8. PubMed PMID: 22945451; PubMed Central PMCID: PMC3490043.

Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Lesher JL Jr, Park HK, Sanders BB Jr, Smith CL, Taylor JR. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin A randomized controlled trial Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA.* 1996 Dec 25;276(24):1957-63. PubMed PMID: 8971064.

Combs GF Jr, Gray WP. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther.* 1998 Sep;79(3):179-92. PubMed PMID: 9776375.

Crampsie MA, Pandey MK, Desai D, Spallholz J, Amin S, Sharma AK. Phenylalkyl isoselenocyanates vs phenylalkyl isothiocyanates: thiol reactivity and its implications. *Chem Biol Interact.* 2012 Oct 25;200(1):28-37. PubMed PMID: 22982772; PubMed Central PMCID: PMC3480549.

Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2013 Sep 7;382(9895):889-99. PubMed PMID: 23618600.

Das JK, Sarkar S, Hossain SU, Chakraborty P, Das RK, Bhattacharya S. Diphenylmethyl selenocyanate attenuates malachite green induced oxidative injury through antioxidation & inhibition of DNA damage in mice. *Indian J Med Res.* 2013 Jun;137(6):1163-73. PubMed PMID: 23852297; PubMed Central PMCID: PMC3734721.

De P, Hasmann M, Leyland-Jones B. Molecular determinants of trastuzumab efficacy: What is their clinical relevance?. *Cancer Treat Rev.* 2013 Dec;39(8):925-34. PubMed PMID: 23562214.

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med.* 2002 Aug 15;347(7):472-80. PubMed PMID: 12181401.

Bibliografía

Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, Blackstein ME, Shah MH, Verweij J, McArthur G, Judson IR, Heinrich MC, Morgan JA, Desai J, Fletcher CD, George S, Bello CL, Huang X, Baum CM, Casali PG. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2006 Oct 14;368(9544):1329-38. PubMed PMID: 17046465.

Dentice M, Marsili A, Zavacki A, Larsen PR, Salvatore D. The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jul;1830(7):3937-45. PubMed PMID: 22634734; PubMed Central PMCID: PMC3670672.

Dhillon S. Bevacizumab combination therapy: a review of its use in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer. *BioDrugs.* 2013 Aug;27(4):375-92. PubMed PMID: 23728884.

Domínguez-Álvarez E, Plano D, Font M, Calvo A, Prior C, Jacob C, Palop JA, Sanmartín C. Synthesis and antiproliferative activity of novel selenoester derivatives. *Eur J Med Chem.* 2014 Feb 12;73:153-66. PubMed PMID: 24389510.

Dong Y, Lisk D, Block E, Ip C. Characterization of the biological activity of gamma-glutamyl-Se-methylselenocysteine: a novel, naturally occurring anticancer agent from garlic. *Cancer Res.* 2001 Apr 1;61(7):2923-8. PubMed PMID: 11306469.

Drake EN. Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant. *Med Hypotheses.* 2006;67(2):318-22. PubMed PMID: 16574336.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2001 Apr 5;344(14):1031-7. PubMed PMID: 11287972.

Dumont JE, Corvilain B, Contempre B. The biochemistry of endemic cretinism: roles of iodine and selenium deficiency and goitrogens. *Mol Cell Endocrinol.* 1994 Apr;100(1-2):163-6. PubMed PMID: 7520008.

Dung TT, Kim SC, Yoo BC, Sung GH, Yang WS, Kim HG, Park JG, Rhee MH, Park KW, Yoon K, Lee Y, Hong S, Kim JH, Cho JY. (5-Hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)methyl 6-hydroxynaphthalene-2-carboxylate, a kojic acid derivative, inhibits inflammatory mediator production via the suppression of Syk/Src and NF-κB activation. *Int Immunopharmacol.* 2014 May;20(1):37-45. PubMed PMID: 24583147.

El-Bayoumy K. The negative results of the SELECT study do not necessarily discredit the selenium-cancer prevention hypothesis. *Nutr Cancer.* 2009;61(3):285-6. PubMed PMID: 19373601.

El-Bayoumy K, Sinha R. Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach. *Mutat Res.* 2005 Dec 11;591(1-2):224-36. PubMed PMID: 16099479.

El-Bayoumy K, Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res.* 2004 Jul 13;551(1-2):181-97. PubMed PMID: 15225592.

Emami S, HosseiniMehr SJ, Taghdisi SM, Akhlaghpour S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 Jan 1;17(1):45-8. PubMed PMID: 17049858.

Emmert SW, El-Bayoumy K, Das A, Sun YW, Amin S, Desai D, Aliaga C, Richie JP Jr. Induction of lung glutathione and glutamylcysteine ligase by 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and its glutathione conjugate: role of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2. *Free Radic Biol Med.* 2012 May 15;52(10):2064-71. PubMed PMID: 22542796; PubMed Central PMCID: PMC3475320.

Facompre ND, Sinha I, El-Bayoumy K, Pinto JT, Sinha R. Remarkable inhibition of mTOR signaling by the combination of rapamycin and 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate in human prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2012 Nov 1;131(9):2134-42. PubMed PMID: 22307455; PubMed Central PMCID: PMC3398165.

Facompre ND, El-Bayoumy K, Sun YW, Pinto JT, Sinha R. 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, but not selenomethionine, inhibits androgen receptor and Akt signaling in human prostate cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010 Aug;3(8):975-84. PubMed PMID: 20606040; PubMed Central PMCID: PMC2923922.

Farmer P, Frenk J, Knaul FM, Shulman LN, Alleyne G, Armstrong L, Atun R, Blayney D, Chen L, Feachem R, Gospodarowicz M, Gralow J, Gupta S, Langer A, Lob-Levyt J, Neal C, Mbewu A, Mired D, Piot P, Reddy KS, Sachs JD, Sarhan M, Seffrin JR. Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: a call to action. *Lancet.* 2010 Oct 2;376(9747):1186-93. PubMed PMID: 20709386.

Fernandes AP, Wallenberg M, Gandin V, Misra S, Tisato F, Marzano C, Rigobello MP, Kumar S, Björnstedt M. Methylselenol formed by spontaneous methylation of selenide is a superior selenium substrate to the thioredoxin and glutaredoxin systems. *PLoS One.* 2012;7(11):e50727. PubMed PMID: 23226364; PubMed Central PMCID: PMC3511371.

Fernández-Herrera MA, Sandoval-Ramírez J, Sánchez-Sánchez L, López-Muñoz H, Escobar-Sánchez ML. Probing the selective antitumor activity of 22-oxo-26-selenocyanocholestan derivatives. *Eur J Med Chem.* 2014 Mar 3;74:451-60. PubMed PMID: 24487193.

Fiegl M, Stauder R, Steurer M, Mian M, Hopfinger G, Brychtova Y, Skrabs C, Zabernigg A, Schmid F, Haslbaur F, Winder G, Walder A, Lang A, Voskova D, Greil R, Mayer J, Gastl G, Austrian Collaborative Study Group on Alemtuzumab in Chronic Lymphocytic Leukemia, in cooperation with The Czech Leukemia Study Group for Life, CELL. Alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia: final results of a large observational multicenter study in mostly pretreated patients. *Ann Hematol.* 2014 Feb;93(2):267-77. PubMed PMID: 24292560.

Bibliografía

- Fischer JL, Mihelc EM, Pollok KE, Smith ML. Chemotherapeutic selectivity conferred by selenium: a role for p53-dependent DNA repair. *Mol Cancer Ther.* 2007 Jan;6(1):355-61. PubMed PMID: 17237294.
- Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. Farmacología Humana 5^a Edición. Elsevier 2008.
- Font M, Lizarraga E, Ibáñez E, Plano D, Sanmartín C, Palop JA. Structural variations on antitumour agents derived from bisacylimidoselenocarbamate A proposal for structure-activity relationships based on the analysis of conformational behaviour. *Eur J Med Chem.* 2013 Aug;66:489-98. PubMed PMID: 23831811.
- Font M, Zuazo A, Ansó E, Plano D, Sanmartín C, Palop JA, Martínez-Irujo JJ. Novel structural insights for imidoselenocarbamates with antitumoral activity related to their ability to generate methylselenol. *Bioorg Med Chem.* 2012 Sep 1;20(17):5110-6. PubMed PMID: 22863528.
- Friedenreich CM, Neilson HK, Lynch BM. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *Eur J Cancer.* 2010 Sep;46(14):2593-604. PubMed PMID: 20843488.
- Gammelgaard B, Gabel-Jensen C, Stürup S, Hansen HR. Complementary use of molecular and element-specific mass spectrometry for identification of selenium compounds related to human selenium metabolism. *Anal Bioanal Chem.* 2008 Apr;390(7):1691-706. PubMed PMID: 18180909.
- Ghose A, Fleming J, Harrison PR. Selenium and signal transduction: roads to cell death and anti-tumour activity. *Biofactors.* 2001;14(1-4):127-33. PubMed PMID: 11568449.
- Ghosh P, Roy SS, Chakraborty P, Ghosh S, Bhattacharya S. Effects of organoselenium compound 2-(5-selenocyanato-pentyl)-benzo[de]isoquinoline 1,3-dione on cisplatin induced nephrotoxicity and genotoxicity: an investigation of the influence of the compound on oxidative stress and antioxidant enzyme system. *Biometals.* 2013 Feb;26(1):61-73. PubMed PMID: 23108958.
- Guan Q, Cheng Z, Ma X, Wang L, Feng D, Cui Y, Bao K, Wu L, Zhang W. Synthesis and bioevaluation of 2-phenyl-4-methyl-1,3-selenazole-5-carboxylic acids as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2014 Aug 6;85C:508-516. PubMed PMID: 25113879.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230.
- Harthill M. Review: micronutrient selenium deficiency influences evolution of some viral infectious diseases. *Biol Trace Elem Res.* 2011 Dec;143(3):1325-36. PubMed PMID: 21318622.
- Hatfield DL, Gladyshev VN. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol.* 2002 Jun;22(11):3565-76. PubMed PMID: 11997494; PubMed Central PMCID: PMC133838.

Hawkes WC, Hornbostel L. Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit. *Biol Psychiatry*. 1996 Jan 15;39(2):121-8. PubMed PMID: 8717610.

Hayes P, Knaus UG. Balancing reactive oxygen species in the epigenome: NADPH oxidases as target and perpetrator. *Antioxid Redox Signal*. 2013 May 20;18(15):1937-45. PubMed PMID: 23126619.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):770-6. PubMed PMID: 11048727.

Hidemitsu T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res*. 2001 Apr 1;61(7):3071-6. PubMed PMID: 11306489.

Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Apr 1;16(7):705-43. PubMed PMID: 21955027; PubMed Central PMCID: PMC3277928.

Ibáñez E, Stoedter M, Hofmann PJ, Plano D, Calvo A, Nguewa PA, Palop JA, Sanmartín C, Schomburg L. Structure- and cell-specific effects of imidoselenocarbamates on selenoprotein expression and activity in liver cells in culture. *Metalomics*. 2012 Dec;4(12):1297-307. PubMed PMID: 23147262.

Ibáñez E, Agliano A, Prior C, Nguewa P, Redrado M, González-Zubeldia I, Plano D, Palop JA, Sanmartín C, Calvo A. The quinoline imidoselenocarbamate EI201 blocks the AKT/mTOR pathway and targets cancer stem cells leading to a strong antitumor activity. *Curr Med Chem*. 2012;19(18):3031-43. PubMed PMID: 22455594.

Ibáñez E, Plano D, Font M, Calvo A, Prior C, Palop JA, Sanmartín C. Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio- and alkylseleno-imidocarbamates. *Eur J Med Chem*. 2011 Jan;46(1):265-74. PubMed PMID: 21115210.

Ip C, Thompson HJ, Zhu Z, Ganther HE. In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer Res*. 2000 Jun 1;60(11):2882-6. PubMed PMID: 10850432.

Jackson MI, Combs GF Jr. Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 Nov;11(6):718-26. PubMed PMID: 18827575.

Jeong LS, Tosh DK, Choi WJ, Lee SK, Kang YJ, Choi S, Lee JH, Lee H, Lee HW, Kim HO. Discovery of a new template for anticancer agents: 2'-deoxy-2'-fluoro-4'-selenoarabinofuranosyl-cytosine (2'-F-4'-seleno-ara-C). *J Med Chem*. 2009 Sep 10;52(17):5303-6. PubMed PMID: 19691349.

Bibliografía

Jiang C, Wang Z, Ganther H, Lü J. Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2002 Oct;1(12):1059-66. PubMed PMID: 12481429.

Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MD, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013 Oct 17;502(7471):333-9. PubMed PMID: 24132290; PubMed Central PMCID: PMC3927368.

Kassam S, Goenaga-Infante H, Maharaj L, Hiley CT, Juliger S, Joel SP. Methylseleninic acid inhibits HDAC activity in diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Sep;68(3):815-21. PubMed PMID: 21519842.

Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 2004 Nov 18;432(7015):316-23. PubMed PMID: 15549093.

Kawamata H, Tachibana M, Fujimori T, Imai Y. Differentiation-inducing therapy for solid tumors. *Curr Pharm Des.* 2006;12(3):379-85. PubMed PMID: 16454751.

Keating GM. Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Drugs.* 2010 Jul 30;70(11):1445-76. PubMed PMID: 20614951.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57. PubMed PMID: 4561027; PubMed Central PMCID: PMC2008650.

Kim A, Oh JH, Park JM, Chung AS. Methylselenol generated from selenomethionine by methioninase downregulates integrin expression and induces caspase-mediated apoptosis of B16F10 melanoma cells. *J Cell Physiol.* 2007 Aug;212(2):386-400. PubMed PMID: 17348006.

Kim JH, Yu J, Alexander V, Choi JH, Song J, Lee HW, Kim HO, Choi J, Lee SK, Jeong LS. Structure-activity relationships of 2'-modified-4'-selenoarabinofuranosyl-pyrimidines as anticancer agents. *Eur J Med Chem.* 2014 Aug 18;83:208-25. PubMed PMID: 24956556.

Klein EA. Selenium and vitamin E cancer prevention trial. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Dec;1031:234-41. PubMed PMID: 15753149.

Köhrle J. Pathophysiological relevance of selenium. *J Endocrinol Invest.* 2013 Nov;36(10 Suppl):1-7. PubMed PMID: 24419053.

Krishnegowda G, Prakasha Gowda AS, Tagaram HR, Carroll KF, Irby RB, Sharma AK, Amin S. Synthesis and biological evaluation of a novel class of isatin analogs as dual inhibitors of tubulin polymerization and Akt pathway. *Bioorg Med Chem.* 2011 Oct 15;19(20):6006-14. PubMed PMID: 21920762; PubMed Central PMCID: PMC3235409.

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 2003 May 30;300(5624):1439-43. PubMed PMID: 12775843.

Ladomery M. Aberrant alternative splicing is another hallmark of cancer. *Int J Cell Biol*. 2013;2013:463786. PubMed PMID: 24101931; PubMed Central PMCID: PMC3786539.

Lamberto I, Plano D, Moreno E, Font M, Palop JA, Sanmartín C, Encío I. Bisacylimidoselenocarbamates cause G2/M arrest associated with the modulation of CDK1 and Chk2 in human breast cancer MCF-7 cells. *Curr Med Chem*. 2013;20(12):1609-19. PubMed PMID: 23432582.

Last K, Maharaj L, Perry J, Strauss S, Fitzgibbon J, Lister TA, Joel S. The activity of methylated and non-methylated selenium species in lymphoma cell lines and primary tumours. *Ann Oncol*. 2006 May;17(5):773-9. PubMed PMID: 16469755.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, Cuchillo Foix CM. Lehninger principios de bioquímica 5^a ed. Ediciones Omega 2009.

Letavayová L, Vlcková V, Brozmanová J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology*. 2006 Oct 3;227(1-2):1-14. PubMed PMID: 16935405.

Li GX, Lee HJ, Wang Z, Hu H, Liao JD, Watts JC, Combs GF Jr, Lü J. Superior in vivo inhibitory efficacy of methylseleninic acid against human prostate cancer over selenomethionine or selenite. *Carcinogenesis*. 2008 May;29(5):1005-12. PubMed PMID: 18310093; PubMed Central PMCID: PMC3312608.

Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008 Oct 20;27(48):6194-206. PubMed PMID: 18931687.

Li Z, Carrier L, Belame A, Thiagarajah A, Salvo VA, Burow ME, Rowan BG. Combination of methylselenocysteine with tamoxifen inhibits MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice through elevated apoptosis and reduced angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Nov;118(1):33-43. PubMed PMID: 18855134.

Lippman SM, Klein EA, Goodman PJ, Lucia MS, Thompson IM, Ford LG, Parnes HL, Minasian LM, Gaziano JM, Hartline JA, Parsons JK, Bearden JD 3rd, Crawford ED, Goodman GE, Claudio J, Winquist E, Cook ED, Karp DD, Walther P, Lieber MM, Kristal AR, Darke AK, Arnold KB, Ganz PA, Santella RM, Albanes D, Taylor PR, Probstfield JL, Jagpal TJ, Crowley JJ, Meyskens FL Jr, Baker LH, Coltman CA Jr. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2009 Jan 7;301(1):39-51. PubMed PMID: 19066370; PubMed Central PMCID: PMC3682779.

Liu C, Liu H, Li Y, Wu Z, Zhu Y, Wang T, Gao AC, Chen J, Zhou Q. Intracellular glutathione content influences the sensitivity of lung cancer cell lines to methylseleninic acid. *Mol Carcinog*. 2012 Apr;51(4):303-14. PubMed PMID: 21520298.

Bibliografía

Liu J, Rozovsky S. Contribution of selenocysteine to the peroxidase activity of selenoprotein S. *Biochemistry*. 2013 Aug 20;52(33):5514-6. PubMed PMID: 23914919; PubMed Central PMCID: PMC3809988.

Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA, Portolés A, Velázquez,. Manual de Farmacología Basica y clínica. Médica Panamericana 2012.

Lothrop AP, Snider GW, Ruggles EL, Patel AS, Lees WJ, Hondal RJ. Selenium as an electron acceptor during the catalytic mechanism of thioredoxin reductase. *Biochemistry*. 2014 Feb 4;53(4):654-63. PubMed PMID: 24422500; PubMed Central PMCID: PMC3957198.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kasseebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012 Dec 15;380(9859):2095-128. PubMed PMID: 23245604.

Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox*

Signal. 2011 Oct 1;15(7):1957-97. PubMed PMID: 21087145; PubMed Central PMCID: PMC3159114.

Luchese C, Stangerlin EC, Gay BM, Nogueira CW. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. Ecotoxicol Environ Saf. 2009 Jan;72(1):248-54. PubMed PMID: 18678407.

Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat Rev Cancer. 2009 Mar;9(3):153-66. PubMed PMID: 19238148.

Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nat Rev Cancer. 2001 Dec;1(3):222-31. PubMed PMID: 11902577.

Mason EF, Rathmell JC. Cell metabolism: an essential link between cell growth and apoptosis. Biochim Biophys Acta. 2011 Apr;1813(4):645-54. PubMed PMID: 20816705; PubMed Central PMCID: PMC3010257.

McKelvey SM, Horgan KA, Murphy RA. Chemical form of selenium differentially influences DNA repair pathways following exposure to lead nitrate. J Trace Elem Med Biol. 2014 Jun 20;PubMed PMID: 25023848.

McKenzie RC, Rafferty TS, Beckett GJ. Selenium: an essential element for immune function. Immunol Today. 1998 Aug;19(8):342-5. PubMed PMID: 9709500.

Melo MT, de Oliveira IM, Grivicich I, Guecheva TN, Saffi J, Henriques JA, Rosa RM. Diphenyl diselenide protects cultured MCF-7 cells against tamoxifen-induced oxidative DNA damage. Biomed Pharmacother. 2013 May;67(4):329-35. PubMed PMID: 23540282.

Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, Schreck RE, Abrams TJ, Ngai TJ, Lee LB, Murray LJ, Carver J, Chan E, Moss KG, Haznedar JO, Sukbuntherng J, Blake RA, Sun L, Tang C, Miller T, Shirazian S, McMahon G, Cherrington JM. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. Clin Cancer Res. 2003 Jan;9(1):327-37. PubMed PMID: 12538485.

Michaelis M, Gralla O, Behrends T, Scharpf M, Endermann T, Rijntjes E, Pietschmann N, Hollenbach B, Schomburg L. Selenoprotein P in seminal fluid is a novel biomarker of sperm quality. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jan 17;443(3):905-10. PubMed PMID: 24361887.

Mohsenzadegan M, Mirshafiey A. The immunopathogenic role of reactive oxygen species in Alzheimer disease. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2012 Sep;11(3):203-16. PubMed PMID: 22947905.

Mondello C, Scovassi AI. Apoptosis: a way to maintain healthy individuals. Subcell Biochem. 2010;50:307-23. PubMed PMID: 20012589.

Bibliografía

Moodie R, Stuckler D, Monteiro C, Sheron N, Neal B, Thamarangsi T, Lincoln P, Casswell S, Lancet NCD Action Group. Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. *Lancet.* 2013 Feb 23;381(9867):670-9. PubMed PMID: 23410611.

Moreno E, Plano D, Lamberto I, Font M, Encio I, Palop JA, Sanmartín C. Sulfur and selenium derivatives of quinazoline and pyrido[2,3-d]pyrimidine: synthesis and study of their potential cytotoxic activity in vitro. *Eur J Med Chem.* 2012 Jan;47(1):283-98. PubMed PMID: 22104973.

Mortenson ED, Fu YX. Anti-HER2/Neu passive-aggressive immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2014 Jan 1;3(1):e27296. PubMed PMID: 24605268; PubMed Central PMCID: PMC3935925.

Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, Li JZ, Bello CL, Theuer CP, George DJ, Rini BI. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006 Jan 1;24(1):16-24. PubMed PMID: 16330672.

Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 May;8(5):379-93. PubMed PMID: 17426725.

Nadiminty N, Gao AC. Mechanisms of selenium chemoprevention and therapy in prostate cancer. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Nov;52(11):1247-60. PubMed PMID: 18727008.

Naik HR, Naik HS, Naik TR, Naika HR, Gouthamchandra K, Mahmood R, Ahamed BM. Synthesis of novel benzo[h]quinolines: wound healing, antibacterial, DNA binding and in vitro antioxidant activity. *Eur J Med Chem.* 2009 Mar;44(3):981-9. PubMed PMID: 18722035.

Nascimento V, Alberto EE, Tondo DW, Dambrowski D, Detty MR, Nome F, Braga AL. GPx-Like activity of selenides and selenoxides: experimental evidence for the involvement of hydroxy perhydroxy selenane as the active species. *J Am Chem Soc.* 2012 Jan 11;134(1):138-41. PubMed PMID: 22136421.

Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ.* 2008 Aug 1;400(1-3):115-41. PubMed PMID: 18657851.

Nogueira CW, Rocha JB. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol.* 2011 Nov;85(11):1313-59. PubMed PMID: 21720966.

Ohta Y, Suzuki KT. Methylation and demethylation of intermediates selenide and methylselenol in the metabolism of selenium. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 Jan 15;226(2):169-77. PubMed PMID: 17988700.

Orian L, Toppo S. Organochalcogen peroxidase mimetics as potential drugs: a long story of a promise still unfulfilled. *Free Radic Biol Med.* 2014 Jan;66:65-74. PubMed PMID: 23499840.

Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Mar 14;1602(1):73-87. PubMed PMID: 11960696.

Pagel JI, Deindl E. Disease progression mediated by egr-1 associated signaling in response to oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2012 Oct 12;13(10):13104-17. PubMed PMID: 23202940; PubMed Central PMCID: PMC3497314.

Penney KL, Li H, Mucci LA, Loda M, Sesso HD, Stampfer MJ, Ma J. Selenoprotein P genetic variants and mRNA expression, circulating selenium, and prostate cancer risk and survival. *Prostate.* 2013 May;73(7):700-5. PubMed PMID: 23129481; PubMed Central PMCID: PMC3640488.

Pinto JT, Sinha R, Papp K, Facompre ND, Desai D, El-Bayoumy K. Differential effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on biomarkers in androgen responsive and androgen independent human prostate carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2007 Apr 1;120(7):1410-7. PubMed PMID: 17205524.

Piovan L, Milani P, Silva MS, Moraes PG, Demasi M, Andrade LH. 20S proteasome as novel biological target for organochalcogenanes. *Eur J Med Chem.* 2014 Feb 12;73:280-5. PubMed PMID: 24463395.

Pirker R. EGFR-directed monoclonal antibodies in non-small cell lung cancer. *Target Oncol.* 2013 Mar;8(1):47-53. PubMed PMID: 23300028.

Plano D, Sanmartín C, Moreno E, Prior C, Calvo A, Palop JA. Novel potent organoselenium compounds as cytotoxic agents in prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007 Dec 15;17(24):6853-9. PubMed PMID: 17964158.

Plano D, Ibáñez E, Calvo A, Palop JA, Sanmartín C. Novel library of selenocompounds as kinase modulators. *Molecules.* 2011 Jul 27;16(8):6349-64. PubMed PMID: 21796074.

Plano D, Baquedano Y, Moreno-Mateos D, Font M, Jiménez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartín C. Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* 2011 Aug;46(8):3315-23. PubMed PMID: 21571403.

Plano D, Moreno E, Font M, Encío I, Palop JA, Sanmartín C. Synthesis and in vitro anticancer activities of some selenadiazole derivatives. *Arch Pharm (Weinheim).* 2010 Nov;343(11-12):680-91. PubMed PMID: 21110339.

Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb).* 2011 Apr;3(4):279-96. PubMed PMID: 21340093; PubMed Central PMCID: PMC3130501.

Polyzos A. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with

Bibliografía

metastatic renal cell carcinoma and various other solid tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008 Feb;108(3-5):261-6. PubMed PMID: 17945482.

Rakesh P, Singh HB, Jasinski JP, Golen JA. Synthesis, structure and reactivity of [o-(2,6-diisopropylphenyliminomethyl)phenyl]selenenyl selenocyanate (RSeSeCN) and related derivatives. *Dalton Trans.* 2014 Jul 7;43(25):9431-7. PubMed PMID: 24671344.

Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Neuzil J, Saavedra E, Moreno-Sánchez R. The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy. *Mol Aspects Med.* 2010 Apr;31(2):145-70. PubMed PMID: 20206201.

Ramachandran K, Navarro L, Gordian E, Das PM, Singal R. Methylation-mediated silencing of genes is not altered by selenium treatment of prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 2007 Mar-Apr;27(2):921-5. PubMed PMID: 17465221.

Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* 2012 May;24(5):981-90. PubMed PMID: 22286106; PubMed Central PMCID: PMC3454471.

Rayman MP. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br J Nutr.* 2008 Aug;100(2):254-68. PubMed PMID: 18346308.

Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet.* 2012 Mar 31;379(9822):1256-68. PubMed PMID: 22381456.

Rayman MP. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc.* 2005 Nov;64(4):527-42. PubMed PMID: 16313696.

Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000 Jul 15;356(9225):233-41. PubMed PMID: 10963212.

Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Aug;66(15):2457-78. PubMed PMID: 19399585; PubMed Central PMCID: PMC2866081.

Reilly C. Selenium in food and health, second edition. Springer 2006.

Ren Y, Wang Y, Liu H, Yan H, Chen J, Hou M, Li W, Fan Y, Zhou Q. [Influence of MSA on cell growth and spontaneous metastasis of L9981-Luc lung cancer transplanted model in nude mice by bioluminescence imaging]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2013 Feb;16(2):67-72. PubMed PMID: 23425897.

Roseni Mundstock Dias G, Medeiros Golombieski R, de Lima Portella R, Pires do Amaral G, Antunes Soares F, Teixeira da Rocha JB, Wayne Nogueira C, Vargas Barbosa N. Diphenyl Diselenide Modulates Gene Expression of Antioxidant Enzymes in the Cerebral Cortex, Hippocampus and Striatum of Female Hypothyroid Rats. *Neuroendocrinology.* 2014 Jul 7;PubMed PMID: 25012258.

Roy SS, Chakraborty P, Bhattacharya S. Intervention in cyclophosphamide induced oxidative stress and DNA damage by a flavonyl-thiazolidinedione based organoselenocyanate and evaluation of its efficacy during adjuvant therapy in tumor bearing mice. *Eur J Med Chem.* 2014 Feb 12;73:195-209. PubMed PMID: 24412495.

Rudolf E, Rudolf K, Cervinka M. Selenium activates p53 and p38 pathways and induces caspase-independent cell death in cervical cancer cells. *Cell Biol Toxicol.* 2008 Apr;24(2):123-41. PubMed PMID: 17610029.

Ryan-Harshman M, Aldoori W. The relevance of selenium to immunity, cancer, and infectious/inflammatory diseases. *Can J Diet Pract Res.* 2005 Summer;66(2):98-102. PubMed PMID: 15975198.

Sanmartín C, Font M, Palop JA. Molecular symmetry: a structural property frequently present in new cytotoxic and proapoptotic drugs. *Mini Rev Med Chem.* 2006 Jun;6(6):639-50. PubMed PMID: 16787374.

Sanmartín C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2012;13(8):9649-72. PubMed PMID: 22949823; PubMed Central PMCID: PMC3431821.

Sanmartín C, Plano D, Domínguez E, Font M, Calvo A, Prior C, Encio I, Palop JA. Synthesis and pharmacological screening of several aroyl and heteroaroyl selenylacetic acid derivatives as cytotoxic and antiproliferative agents. *Molecules.* 2009 Sep 1;14(9):3313-38. PubMed PMID: 19783927.

Sanmartín C, Plano D, Font M, Palop JA. Kinase regulation by sulfur and selenium containing compounds. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011 May;11(4):496-523. PubMed PMID: 21395545.

Sanmartín C, Plano D, Palop JA. Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini Rev Med Chem.* 2008 Sep;8(10):1020-31. PubMed PMID: 18782054.

Sappey C, Legrand-Poels S, Best-Belpomme M, Favier A, Rentier B, Piette J. Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type 1 activation after oxidative stress. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994 Nov;10(11):1451-61. PubMed PMID: 7888200.

Scholz CW, Pinto A, Linkesch W, Lindén O, Viardot A, Keller U, Hess G, Lastoria S, Lerch K, Frigeri F, Arcamone M, Stroux A, Frericks B, Pott C, Pezzutto A. (90)Yttrium-ibritumomab-tiuxetan as first-line treatment for follicular lymphoma: 30 months of follow-up data from an international multicenter phase II clinical trial. *J Clin Oncol.* 2013 Jan 20;31(3):308-13. PubMed PMID: 23233718.

Schomburg L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2011 Oct 18;8(3):160-71. PubMed PMID: 22009156.

Bibliografía

- Schrauzer GN, White DA, Schneider CJ. Cancer mortality correlation studies--III: statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg Chem.* 1977;7(1):23-31. PubMed PMID: 856291.
- Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem.* 2007 Sep;18(9):567-79. PubMed PMID: 17360173.
- Seo YR, Kelley MR, Smith ML. Selenomethionine regulation of p53 by a ref1-dependent redox mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14548-53. PubMed PMID: 12357032; PubMed Central PMCID: PMC137920.
- Seo YR, Sweeney C, Smith ML. Selenomethionine induction of DNA repair response in human fibroblasts. *Oncogene.* 2002 May 23;21(23):3663-9. PubMed PMID: 12032834.
- Shamberger RJ, Frost DV. Possible protective effect of selenium against human cancer. *Can Med Assoc J.* 1969 Apr 12;100(14):682. PubMed PMID: 5776446; PubMed Central PMCID: PMC1945904.
- Shimada T, Murayama N, Tanaka K, Takenaka S, Guengerich FP, Yamazaki H, Komori M. Spectral modification and catalytic inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, and 2A13 by four chemopreventive organoselenium compounds. *Chem Res Toxicol.* 2011 Aug 15;24(8):1327-37. PubMed PMID: 21732699; PubMed Central PMCID: PMC3156385.
- Sinha I, Null K, Wolter W, Suckow MA, King T, Pinto JT, Sinha R. Methylseleninic acid downregulates hypoxia-inducible factor-1 α in invasive prostate cancer. *Int J Cancer.* 2012 Mar 15;130(6):1430-9. PubMed PMID: 21500193.
- Sinha R, Pinto JT, Facompre N, Kilheffer J, Baatz JE, El-Bayoumy K. Effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on protein profiling in androgen responsive and androgen independent human prostate cancer cells. *Nutr Cancer.* 2008;60(2):267-75. PubMed PMID: 18444160.
- Sk UH, Sharma AK, Ghosh S, Bhattacharya S. Synthesis and biological evaluation of novel spiro 6-methoxytetralin-1,3'-pyrrolidine based organoselenocyanates against cadmium-induced oxidative and hepatic damage in mice. *Eur J Med Chem.* 2010 Aug;45(8):3265-73. PubMed PMID: 20457475.
- Stefanello ST, Prestes AS, Ogunmoyole T, Salman SM, Schwab RS, Brender CR, Dornelles L, Rocha JB, Soares FA. Evaluation of in vitro antioxidant effect of new mono and diselenides. *Toxicol In Vitro.* 2013 Aug;27(5):1433-9. PubMed PMID: 23499633.
- Straliotto MR, Hort MA, Fiúza B, Rocha JB, Farina M, Chiabrando G, de Bem AF. Diphenyl diselenide modulates oxLDL-induced cytotoxicity in macrophage by improving the redox signaling. *Biochimie.* 2013 Aug;95(8):1544-51. PubMed PMID: 23619706.

Taylor EW, Nadimpalli RG, Ramanathan CS. Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins. *Biol Trace Elem Res.* 1997 Jan;56(1):63-91. PubMed PMID: 9152512.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):231-41. PubMed PMID: 18073771.

Thiel G, Cibelli G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. *J Cell Physiol.* 2002 Dec;193(3):287-92. PubMed PMID: 12384981.

Touat-Hamici Z, Legrain Y, Bulteau AL, Chavatte L. Selective Up-regulation of Human Selenoproteins in Response to Oxidative Stress. *J Biol Chem.* 2014 May 23;289(21):14750-61. PubMed PMID: 24706762; PubMed Central PMCID: PMC4031530.

Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology?. *Cell Biochem Funct.* 2011 Aug;29(6):468-80. PubMed PMID: 21773978.

Valdiglesias V, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Arch Toxicol.* 2010 May;84(5):337-51. PubMed PMID: 20033805.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131-49. PubMed PMID: 12814430.

Vineis P, Wild CP. Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet.* 2014 Feb 8;383(9916):549-57. PubMed PMID: 24351322.

Wang K, Liu C, Di CJ, Ma C, Han CG, Yuan MR, Li PF, Li L, Liu YX. Kojic acid protects C57BL/6 mice from gamma-irradiation induced damage. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(1):291-7. PubMed PMID: 24528043.

Wang Z, Hu H, Li G, Lee HJ, Jiang C, Kim SH, Lü J. Methylseleninic acid inhibits microvascular endothelial G1 cell cycle progression and decreases tumor microvessel density. *Int J Cancer.* 2008 Jan 1;122(1):15-24. PubMed PMID: 17847021.

Wang Z, Jiang C, Lü J. Induction of caspase-mediated apoptosis and cell-cycle G1 arrest by selenium metabolite methylselenol. *Mol Carcinog.* 2002 Jul;34(3):113-20. PubMed PMID: 12112305.

Weekley CM, Aitken JB, Finney L, Vogt S, Witting PK, Harris HH. Selenium metabolism in cancer cells: the combined application of XAS and XFM techniques to the problem of selenium speciation in biological systems. *Nutrients.* 2013 May 21;5(5):1734-56. PubMed PMID: 23698165; PubMed Central PMCID: PMC3708347.

Xia Y, Hill KE, Li P, Xu J, Zhou D, Motley AK, Wang L, Byrne DW, Burk RF. Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects. *Am*

Bibliografía

J Clin Nutr. 2010 Sep;92(3):525-31. PubMed PMID: 20573787; PubMed Central PMCID: PMC2921536.

Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. Free Radic Biol Med. 2013 Sep;62:90-101. PubMed PMID: 23200807; PubMed Central PMCID: PMC3744189.

Yao Y, Pei F, Kang P. Selenium, iodine, and the relation with Kashin-Beck disease. Nutrition. 2011 Nov-Dec;27(11-12):1095-100. PubMed PMID: 21967994.

Yin S, Dong Y, Li J, Fan L, Wang L, Lu J, Vang O, Hu H. Methylseleninic acid potentiates multiple types of cancer cells to ABT-737-induced apoptosis by targeting Mcl-1 and Bad. Apoptosis. 2012 Apr;17(4):388-99. PubMed PMID: 22179721.

Yu SY, Zhu YJ, Li WG. Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. Biol Trace Elem Res. 1997 Jan;56(1):117-24. PubMed PMID: 9152515.

Yu YP, Yu G, Tseng G, Cieply K, Nelson J, DeFrances M, Zarnegar R, Michalopoulos G, Luo JH. Glutathione peroxidase 3, deleted or methylated in prostate cancer, suppresses prostate cancer growth and metastasis. Cancer Res. 2007 Sep 1;67(17):8043-50. PubMed PMID: 17804715.

Yuzhalin AE, Kutikhin AG. Inherited variations in the SOD and GPX gene families and cancer risk. Free Radic Res. 2012 May;46(5):581-99. PubMed PMID: 22257147.

Zeng H. Selenium as an essential micronutrient: roles in cell cycle and apoptosis. Molecules. 2009 Mar 23;14(3):1263-78. PubMed PMID: 19325522.

Zeng H, Wu M, Botnen JH. Methylselenol, a selenium metabolite, induces cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis via the extracellular-regulated kinase 1/2 pathway and other cancer signaling genes. J Nutr. 2009 Sep;139(9):1613-8. PubMed PMID: 19625696.

Zeng H, Briske-Anderson M, Wu M, Moyer MP. Methylselenol, a selenium metabolite, plays common and different roles in cancerous colon HCT116 cell and noncancerous NCM460 colon cell proliferation. Nutr Cancer. 2012;64(1):128-35. PubMed PMID: 22171558.

Zeng H, Botnen JH, Briske-Anderson M. Deoxycholic acid and selenium metabolite methylselenol exert common and distinct effects on cell cycle, apoptosis, and MAP kinase pathway in HCT116 human colon cancer cells. Nutr Cancer. 2010;62(1):85-92. PubMed PMID: 20043263.

Zeng H, Cheng WH, Johnson LK. Methylselenol, a selenium metabolite, modulates p53 pathway and inhibits the growth of colon cancer xenografts in Balb/c mice. J Nutr Biochem. 2013 May;24(5):776-80. PubMed PMID: 22841391.

Zhang J, Wang L, Anderson LB, Witthuhn B, Xu Y, Lü J. Proteomic profiling of potential molecular targets of methyl-selenium compounds in the transgenic

adenocarcinoma of mouse prostate model. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010 Aug;3(8):994-1006. PubMed PMID: 20647336.

Zhang W, Zhang R, Wang T, Jiang H, Guo M, Zhou E, Sun Y, Yang Z, Xu S, Cao Y, Zhang N. Selenium inhibits LPS-induced pro-inflammatory gene expression by modulating MAPK and NF-κB signaling pathways in mouse mammary epithelial cells in primary culture. *Inflammation*. 2014 Apr;37(2):478-85. PubMed PMID: 24202549.

Zhang Z, Zhang J, Xiao J. Selenoproteins and selenium status in bone physiology and pathology. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug 10;1840(11):3246-3256. PubMed PMID: 25116856.

Zhao R, Domann FE, Zhong W. Apoptosis induced by selenomethionine and methioninase is superoxide mediated and p53 dependent in human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2006 Dec;5(12):3275-84. PubMed PMID: 17172431; PubMed Central PMCID: PMC1761114.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):260-5. PubMed PMID: 19135222.

Recursos electrónicos

<http://www.cancer.org/>.

<http://www.dkfz.de/en/>.

<http://www.nlm.nih.gov/>

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/>.

<http://www.seom.org>.

<http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/104582-el-cancer-en-espana-2014>.

<http://www.who.int/>.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

Anexo

1. Relación de estructuras sintetizadas en este trabajo de investigación

Ref.	Nombre	Estructura
1	Metil N,N'-bis(ETOXICARBONIL)IMIDOSELENOCARBAMATO	
2	Metil N,N'-bis(POPOXICARBONIL)IMIDOSELENOCARBAMATO	
3	Metil N,N'-bis(BUTOXICARBONIL)IMIDOSELENOCARBAMATO	
4	Metil N,N'-bis(HEXILOXICARBONIL)IMIDOSELENOCARBAMATO	
5	Metil N,N'-bis(ISOBUTOXICARBONIL)IMIDOSELENOCARBAMATO	
6	Metil N,N'-bis(ALILOXICARBONIL)IMIDOSELENOCARBAMATO	
7	Metil N,N'-bis(FENOXICARBONIL)IMIDOSELENOCARBAMATO	
8	Metil N,N'-bis(4-metoxifenoxycarbonil)IMIDOSELENOCARBAMATO	
9	Metil N,N'-bis(4-metilfenoxycarbonil)IMIDOSELENOCARBAMATO	
10	Metil N,N'-bis(4-clorofenoxycarbonil)IMIDOSELENOCARBAMATO	
11	Metil N,N'-bis(4-fluorofenoxycarbonil)IMIDOSELENOCARBAMATO	

Anexo

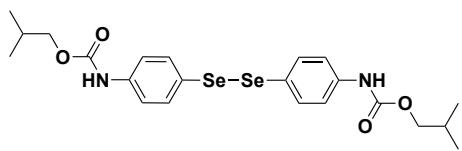
12	<i>Metil N,N'-bis(benziloxicarbonil)imidoselenocarbamato</i>	
13	<i>Metil N,N'-bis(4-nitrobenziloxicarbonil)imidoselenocarbamato</i>	
14	<i>Metil N,N'-bis(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil)imidoselenocarbamato</i>	
15	<i>Metil N-(1,1-dioxobenzo[b]tiofen-2-iloxicarbonil)imidoselenocarbamato</i>	
16	<i>Metil N-(4-metilfenoxicarbonil)imidoselenocarbamato</i>	
1a	<i>Etil N-(4-cianoselenilfenil)carbamato</i>	
1b	<i>Propil N-(4-cianoselenilfenil)carbamato</i>	
1c	<i>Butil N-(4-cianoselenilfenil)carbamato</i>	
1d	<i>Hexil N-(4-cianoselenilfenil)carbamato</i>	
1e	<i>Isobutil N-(4-cianoselenilfenil)carbamato</i>	
1f	<i>Alil N-(4-cianoselenilfenil)carbamato</i>	
1g	<i>Fenil N-(4-cianoselenilfenil)carbamato</i>	
1h	<i>4-Metoxifenil N-(4-cianoselenilfenil)carbamato</i>	

1i	<i>4-Metilfenil N-(4-cianoselenifenil)carbamato hidrochloride</i>	
1j	<i>4-Clorofenil N-(4-cianoselenifenil)carbamato</i>	
1k	<i>4-Fluorofenil N-(4-cianoselenifenil)carbamato</i>	
1l	<i>Benzil N-(4-cianoselenifenil)carbamato</i>	
1m	<i>. 4-Nitrobenzil N-(4-cianoselenifenil)carbamato</i>	
1n	<i>(Fluoren-9-il)metil N-(4-cianoselenifenil)carbamato</i>	
1o	<i>1,1-Dioxobenzo[b]tiofen-2-ilmetil N-(4-cianoselenifenil)carbamato</i>	
2a	<i>Dietil (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato</i>	
2b	<i>Dipropil (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato</i>	
2c	<i>Dibutil (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato</i>	
2d	<i>. Dihexil (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato</i>	

Anexo

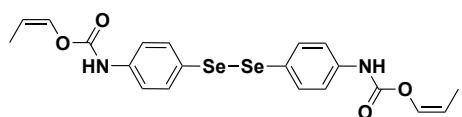
2e

Diisobutil (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato



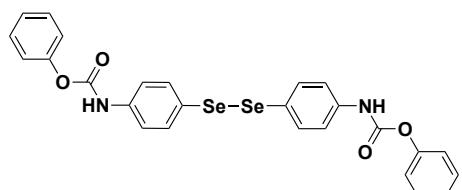
2f

Dialil (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato



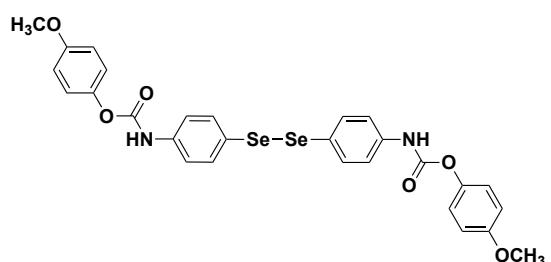
2g

Difenil (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato



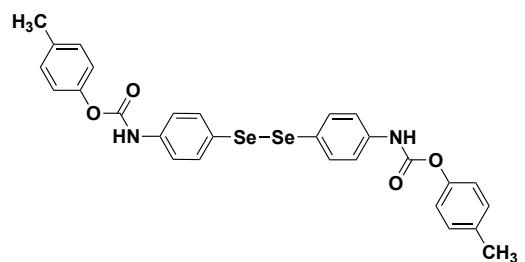
2h

Bis(4-metoxifenil) (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato



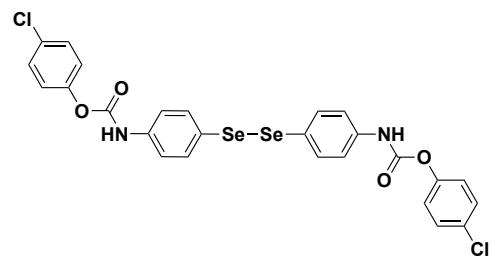
2i

Bis(4-metilfenil) (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato



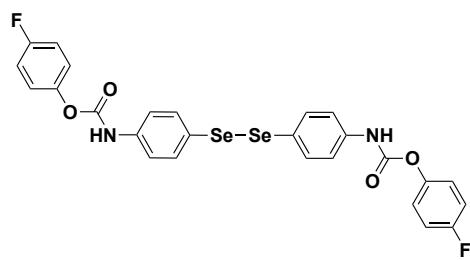
2j

Bis(4-clorofenil) (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato



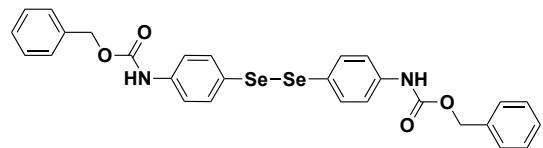
2k

Bis(4-fluorofenil) (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato

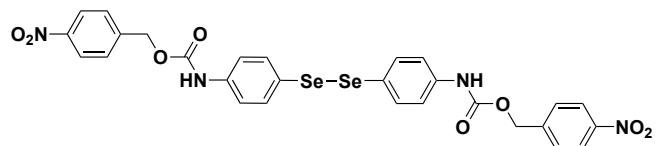


2l

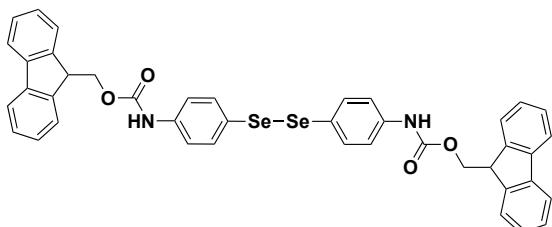
Dibenzil (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato

**2m**

Bis(4-nitrobenzil) (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato

**2n**

Bis[(fluoren-9-il)metil] (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato

**2o**

Bis[(1,1-dioxobenzo[b]tiofen-2-il)metil] (diselenodiildibenceno-4,1-diil)biscarbamato

