

# Elisidepsin es un compuesto antitumoral de origen marino que causa muerte celular por necrosis relacionada con el contenido lipídico de las líneas celulares tumorales

Susana Esteban Rubio<sup>1,2\*</sup>, José Manuel Molina Guijarro<sup>2</sup>

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2 PharmaMar S.A., 28770 Colmenar Viejo, Madrid, España.

## Resumen

Elisidepsin es un compuesto sintético producido por PharmaMar S.A, derivado de un compuesto natural de origen marino. Tiene propiedades antitumorales gracias a que posee una gran actividad citotóxica. Produce una muerte rápida en células tumorales, asociada a la perturbación de la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que provoca un cambio osmótico que da lugar a una serie de alteraciones morfológicas y fisiológicas características de una muerte celular por necrosis. Su mecanismo de acción parece estar relacionado con la composición de la bicapa lipídica, ya que se observan cambios en el contenido lipídico de una línea celular resistente al compuesto. Además, se ha demostrado la unión específica del compuesto a un determinado grupo de lípidos perteneciente al contenido lipídico total de la línea celular sensible al tratamiento con Elisidepsin, lo que puede contribuir a identificar cuál es la diana de acción de dicho citotóxico.

**Palabras clave:** Elisidepsin, citotoxicidad, permeabilidad de membrana, necrosis

**Cita:** Esteban S, Otros Autores, Molina JM (2014) Elisidepsin es un compuesto antitumoral de origen marino que causa muerte celular por necrosis relacionada con el contenido lipídico de las líneas celulares tumorales. *Dianas* 3(1): e20140908. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140908URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Editores:** María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

**Recibido:** 27 de junio de 2014

**Copyright:** © 2014 Susana Esteban Rubio et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

\*E-mail: susana.rubio91@gmail.com



## Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el cáncer, la diabetes, las enfermedades respiratorias y las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayor causa de mortalidad en el mundo y suponen un gran coste para los sistemas de salud públicos [1]. Por ello, el descubrimiento de nuevas moléculas que permitan controlar de manera efectiva estas patologías, supone un reto de gran importancia. Es aquí, donde actualmente la biotecnología marina está adquiriendo una relevancia cada vez mayor. El 70% de la superficie terrestre está constituida por océanos en los que se puede encontrar una alta biodiversidad [1, 2]. Muchos organismos marinos viven en hábitats complejos expuestos a condiciones extremas, lo que hace necesario el desarrollo de mecanismos de adaptación, que conllevan la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios, no presentes en otros organismos [1]. Estas sustancias bioactivas pueden poseer actividades bioquímicas susceptibles de ser explotadas como terapias frente a distintas patologías, incluido el cáncer [2]. Actualmente, más de 22000 nuevas moléculas marinas han sido publicadas en la literatura [3], mostrando nuevos mecanismos de acción y propiedades farmacológicas favorables [2]. Por tanto, podemos concluir que la exploración del ambiente marino representa una herramienta interesante para la búsqueda de nuevas moléculas con grandes potenciales terapéuticos [3].

En este trabajo se ha empleado un compuesto denominado Elisidepsin, propiedad de la empresa biofarmacéutica PharmaMar S.A. Elisidepsin (Irvalec®, PM02734; Figura 1) es un ciclodepsipéptido sintético relacionado estructuralmente con Kahalalide F (KF), un antitumoral aislado del molusco hawaiano *Elysia rufescens* [4,5]. KF tiene una alta actividad citotóxica frente a distintas muestras tumorales y líneas celulares derivadas de distintos tipos de tumores sólidos, como carcinomas de próstata, mama, pulmón no microcítico, ovario y colon [6].

Estudios in vitro en células de cáncer de mama y de próstata revelan que KF induce oncosis con un patrón característico de permeabilización de la membrana para pequeñas moléculas como el Ioduro de Propidio [7]. El tratamiento con KF de numerosas líneas celulares tumorales provoca la pérdida de la integridad

lisosomal, entrada de calcio, perturbaciones en la conductividad de membrana y formación de vesículas gigantes membranosas lo que desemboca en hinchamiento celular severo [6,8]. Un estudio de microscopía confocal y microscopía electrónica revela que KF induce daño en la mitocondria, en el retículo endoplasmático y en la membrana plasmática, mientras que la membrana nuclear y el DNA no sufren daños [6]. Datos previos indican que KF es un potente antitumoral que induce, predominantemente, muerte celular por necrosis [9]. Se ha comprobado que la muerte inducida por KF es independiente de síntesis de proteínas, independiente de apoptosis mediada por caspasas, e independiente de la actividad de proteasas lisosomales cathepsina B y D [6].

Usando una colección de mutantes de delección de *Saccharomyces cerevisiae*, se demostró que la ausencia funcional de ciertos genes involucrados en tráfico intracelular, funciones mitocondriales, pared celular o síntesis de esfingolípidos, inducía resistencia relativa a Elisidepsin. En concreto, los mutantes en el gen *Scs7*, cuyo homólogo humano es el gen *FA2H* (*sphingolipid fatty acid 2-hydroxylase*), presentaban la máxima resistencia frente a Elisidepsin encontrada. En este mismo sentido, la sobre-expresión del gen *FA2H* en células tumorales humanas, aumentaba significativamente la sensibilidad de las células frente al compuesto [5].

En nuestro estudio, se ha analizado la pérdida de la integridad de membrana que ocurre en un modelo de línea celular tumoral humana tras el tratamiento con Elisidepsin, así como las diferencias existentes en la composición lipídica entre dicha línea celular y una línea celular resistente al compuesto, derivada de la primera.

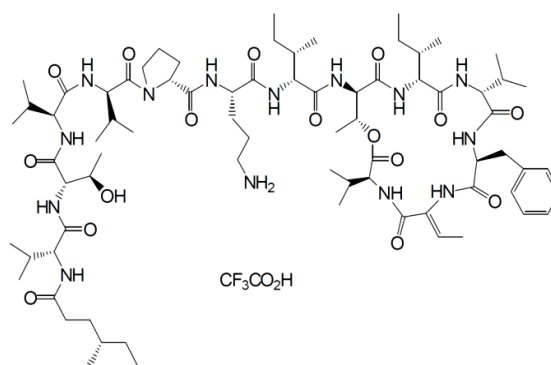


Figura 1.- Estructura química de Elisidepsin.

## Materiales y métodos

### Cultivos celulares

La línea celular humana de carcinoma de colon HCT-116-WT (Wild Type), fue cultivada en medio McCoy's 5A (Sigma-Aldrich). El medio fue suplementado con 10 % de FBS, 1 % L-Glutamina 200 mM (Sigma-Aldrich) y 1 % de Penicilina 100 U/ml y 1 % de Estreptomina 10 mg/ml (Sigma-Aldrich). Las condiciones de cultivo fueron 37 °C, 95 % de humedad relativa y 5 % CO<sub>2</sub>.

El subclon resistente HCT-116-IRV se desarrolló a partir de la línea celular HCT-116-WT mediante la exposición continua, durante aproximadamente 18 meses, a concentraciones crecientes de Elisidepsin, alcanzando como máxima concentración de tratamiento, 100 μM.

### Elisidepsin

Elisidepsin fue sintetizado en PharmaMar y preparado en un stock a 5 mM en DMSO y conservado a -20 °C.

### Ensayos de viabilidad celular

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos e incubadas 24 horas en medio de cultivo libre de tratamiento. Posteriormente, se procedió al tratamiento de las mismas a diferentes concentraciones de Elisidepsin a tiempos de 30 minutos y 72 horas. Para la cuantificación de la viabilidad celular, el medio de cultivo fue eliminado y las células fueron fijadas con glutaraldehído 1 % en PBS, durante 20 minutos.

Posteriormente, fueron teñidas durante otros 20 minutos con Sulforrodamina B 0,4%. El exceso de colorante se eliminó con ácido acético al 1 % y las placas se dejaron secar a temperatura ambiente. El colorante se extrajo con trizma base 10 mM. La absorbancia de las muestras fue medida a 510 nm en un espectrofotómetro de placas POLARstar Omega (BMG Labtech). Los resultados se expresaron como porcentaje de supervivencia en función de las células no tratadas con Elisidepsin.

## Evaluación del efecto de Elisidepsin por microscopía

Las células HCT-116-WT y HCT-116-IRV se sembraron en las placas adecuadas y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 50 %. Se substituyó el medio de cultivo libre de tratamiento por nuevo medio suplementado con 25 mM de HEPES pH 7,4 y 50 µg/ml de Ioduro de Propidio (IP). Mediante técnicas de microscopía de contraste de fases y fluorescencia, se analizaron los cambios en la morfología celular y la internalización del IP como consecuencia del tratamiento de las células con Elisidepsin a las concentraciones de 10 ó 20 µM.

## Detección de la permeabilización de membrana por fluorimetría

Se sembraron células en placas de 96 pocillos, a alta densidad, para asegurar su confluencia a las 48h de incubación, en medio de cultivo libre de tratamiento. Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se añadió nuevo medio, suplementado con 25mM de HEPES pH 7,4 y 50 µg/ml de IP. Las células se trataron en dicho medio con vehículo sólo (DMSO) o distintas concentraciones de Elisidepsin (1, 5, 10 o 20 µM). La internalización de IP se cuantificó por fluorimetría de placa (ex 531/em 632 nm) durante 60 minutos a 37°C, en un fluorímetro de placas Victor<sup>3</sup> (Wallac). El resultado se representó como valor relativo al control de tratamiento con vehículo.

## Análisis del contenido lipídico

Las células HCT-116-WT y HCT-116-IRV se cultivaron en frascos T162 durante 72h hasta alcanzar un 90% de confluencia, se recogieron y los pellets fueron resuspendidos en el volumen necesario de agua en función de la cantidad de células obtenidas. Para la extracción de lípidos, se sucedieron las siguientes adiciones de volúmenes respecto al volumen total de la suspensión celular, agitándose la mezcla tras cada añadido: 3,75 volúmenes de cloroformo: metanol (1:2); 1,25 volúmenes de cloroformo; 1,25 volúmenes de NaCl 1M. Acto seguido, se centrifugó a 2000 rpm, 10 min. Por último, se recogió la fase orgánica y se evaporó el disolvente por flujo de N<sub>2</sub>. Los lípidos recogidos se almacenaron a -20 °C en atmósfera de N<sub>2</sub>. Para su análisis, se disolvieron en cloroformo:metanol (2:1) y se analizaron por HPTLC.

Para la realización de la HPTLC se utilizó como fase estacionaria placas HPTLC SilicaGel 60 (Merck Millipore) y como fase móvil, cloroformo: metanol (8:2). Junto a las muestras se emplearon los siguientes compuestos, que sirvieron como marcadores lipídicos: 16-β-D-glucoceramida, mezcla de glucoesfingolípidos neutros, D-eritrodihidroesfingosina, ácido oleico y colesterol. El análisis de la separación lipídica se hizo mediante tinción con Tioflavina S 10 µg/ml (acetona:agua, 1:1) (Sigma-Aldrich), mientras que la búsqueda de lípidos glicosilados se determinó con Orcinol-sulfúrico (0,5 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M) (Sigma-Aldrich).

## Determinación de la unión de Elisidepsin a los componentes lipídicos

Se realizó una purificación de fracciones lipídicas de las líneas HCT-116-WT y HCT-116-IRV a partir de una HPTLC preparativa. Posteriormente, se cargó una cantidad equivalente de cada fracción en distintos puntos de una membrana de nitrocelulosa (Whatman). Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo 1% en PBS. A continuación, se procedió a la hibridación con Biotina (6 µM) o Elisidepsin-Biotina (6 µM), durante 1h a T<sup>a</sup> ambiente; seguidamente, se incubó con Estreptavidina-HRP (1:600, stock: 1 mg/ml) (Sigma-Aldrich). Por último, se reveló mediante quimioluminiscencia empleando el reactivo ECL Plus<sup>TM</sup> (GE Healthcare).

## Resultados

### Citotoxicidad de Elisidepsin en líneas tumorales humanas

Para estudiar la citotoxicidad de Elisidepsin, las líneas celulares HCT-116-WT y HCT-116-IRV se trataron con Elisidepsin en curvas dosis-respuesta (diluciones seriadas con ratio ½,5), tanto a tiempos cortos (30 minutos) como a tiempos largos (72 horas). La supervivencia celular fue determinada mediante el método de Sulforrodamina B, usando como parámetro de referencia, el valor IC<sub>50</sub>. El valor IC<sub>50</sub> obtenido para cada condición fue: en el caso de la incubación de 30 min, 7,76 µM; mientras que la incubación durante 72 horas dio un valor de 4,58 µM. Como podemos observar en la Figura 2, la línea celular HCT-116-WT es sensible al tratamiento con Elisidepsin, en cambio, la línea celular HCT-116-IRV presenta una resistencia significativa a la actividad citotóxica de Elisidepsin.

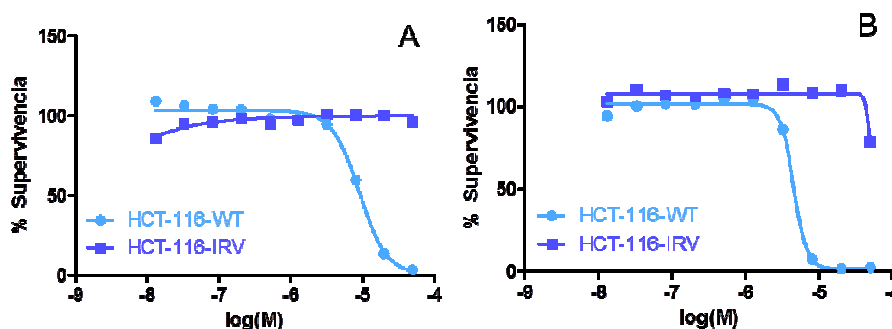


Figura 2.- Citotoxicidad de Elisidepsin. (A) Incubación de 30min. (B) Incubación de 72h. Los resultados se expresan en porcentaje de supervivencia en comparación al control.

### Elisidepsin altera la permeabilidad de membrana causando muerte celular por necrosis

Para evaluar el tipo de muerte celular que provoca Elisidepsin en las células sensibles al tratamiento, se procedió a incubar las células junto al compuesto citotóxico y se observaron por microscopía de contraste de fases y de fluorescencia. Las células fueron tratadas con una concentración de 10  $\mu$ M de Elisidepsin y se observó que la línea sensible HCT-116-WT sufrió una muerte rápida, asociada a una pérdida de la integridad de membrana que provocó grandes cambios morfológicos (Figura 3) como la generación de vesículas y deformación celular. En cambio, la línea celular HCT-116-IRV no mostró cambios morfológicos aparentes con el tratamiento con Elisidepsin (10  $\mu$ M).

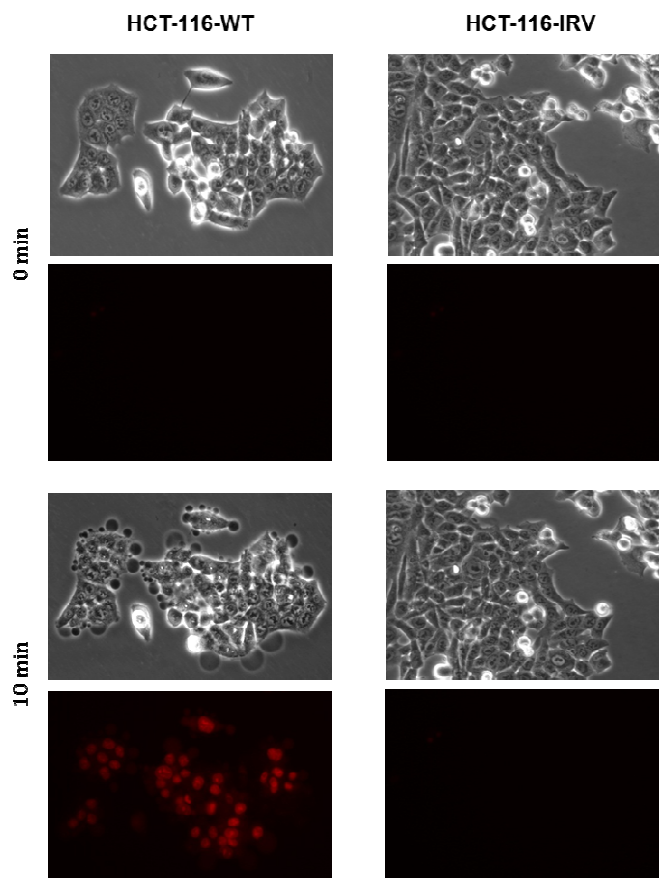


Figura 3.- Análisis microscópico de los efectos de Elisidepsin sobre la morfología celular y permeabilidad de membrana. Las células HCT-116-WT y HCT-116-IRV fueron tratadas con Elisidepsin 10  $\mu$ M durante 10 min en presencia de IP. Las células sensibles al compuesto mostraron cambios morfológicos en las imágenes de contraste de fases (paneles superiores) y tinción nuclear por IP en las imágenes de microscopía de fluorescencia (paneles inferiores).

La permeabilidad celular se valoró por medio de análisis fluorimétrico, realizando una cinética de incorporación de IP y mediante el uso de microscopía de fluorescencia. Como se ve en la Figura 3 las células sensibles sufrieron una incorporación severa de IP, mientras que en las células resistentes no se aprecia ninguna tinción nuclear. Esto se corresponde con el mantenimiento de la estabilidad de membrana y muestra que Elisidepsin no ejerció ningún efecto en la línea celular resistente, HCT-116-IRV. Por otro lado, la cinética de permeabilización (Figura 4) mostró el efecto negativo que Elisidepsin (principalmente

a las concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) indujo sobre la estabilidad de la membrana celular en la línea celular HCT-116-WT, dando lugar a la pérdida de la integridad de membrana, desde los primeros minutos de tratamiento, que persiste de manera continua hasta que ocurre el 100 % de muerte celular. Sin embargo, la línea celular resistente a Elisidepsin, HCT-116-IRV, no incorpora IP a ninguna concentración tras 60 minutos de tratamiento.

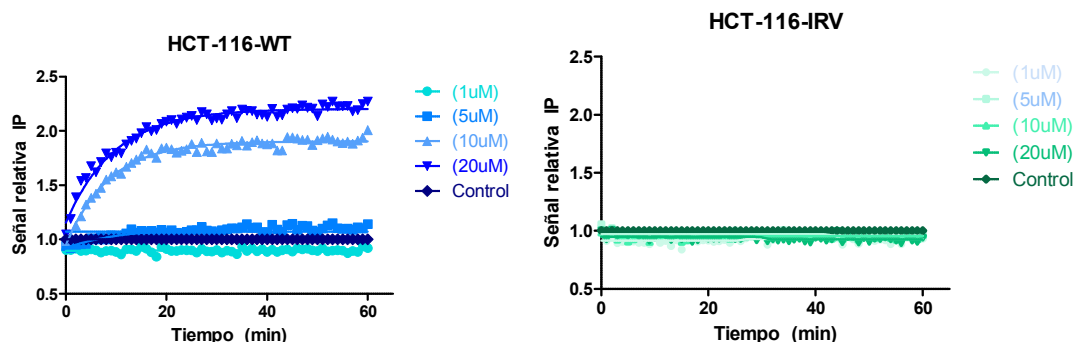


Figura 4.- Cinética de permeabilización de membrana por adquisición de IP. Evaluación realizada por fluorimetría de placa en tiempo real (min) (ex 531/ em 632nm).

#### Diferencias en el contenido lipídico de las células resistentes a Elisidepsin

Para la determinación de posibles diferencias entre las dos líneas celulares se llevó a cabo una separación de los lípidos de ambas mediante HPTLC. Como se ve en la Figura 5A y 5B, los patrones de bandas se diferencian en la región central, donde se pueden observar 4 fracciones lipídicas diferentes en el caso de la línea celular WT (Figura 5A), mientras que sólo se distinguen 2 de estas fracciones en el caso de las resistentes. Por comparación con la migración de marcadores lipídicos utilizados como patrón, las fracciones de interés presentaron una migración, en la HPTLC, similar al de la 16- $\beta$ -D-Glucoceramida y a la de dos glucoesfingolípidos. Por otro lado, en la Figura 5 D y E se muestra la detección de glúcidos en las HPTLCs mediante tinción con orcinol-sulfúrico, pudiendo observar que las fracciones diferenciales entre ambas líneas celulares, se corresponden con lípidos glicosilados.

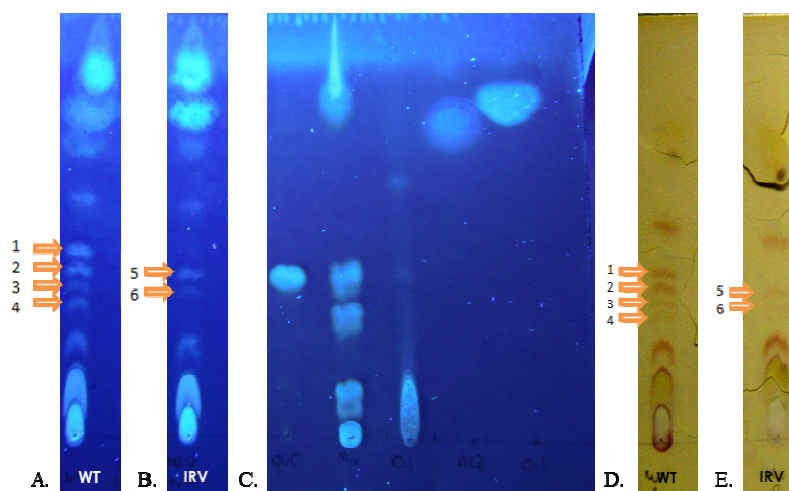


Figura 5.- Análisis del contenido lipídico por HPTLC. Las imágenes muestran dos tipos de tinción: tinción de lípidos con Tioflavina S (A, extracto lipídico de HCT-116-WT; B, extracto lipídico de HCT-116-IRV; C, marcadores lipídicos, de izquierda a derecha: 16- $\beta$ -D-Glucoceramida, mezcla de glucoesfingolípidos neutros, D-eritrodihidroesfingosina, ácido oleico y colesterol) o tinción de glúcidos con Orcinol sulfúrico (D, extracto de HCT-116-WT; E, extracto de HCT-116-IRV). Las flechas indican las fracciones lipídicas que muestran diferencias entre las líneas celulares HCT-116-WT y HCT-116-IRV.

#### Elisidepsin se une de forma específica a una fracción lipídica

Debido a las diferencias en la composición lipídica entre la línea celular sensible y resistente, se realizó un ensayo de hibridación en membrana con un derivado de Elisidepsin marcado con biotina para evaluar si existía interacción de este compuesto con alguna de las fracciones lipídicas. Como se observa en la Figura 6, existe una unión específica del compuesto con la fracción 4 de la línea celular HCT-116-WT.

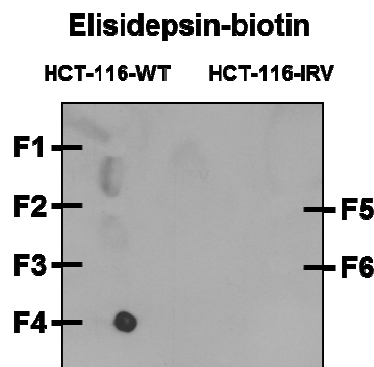


Figura 6.- Interacción de Elisidepsin-biotina con fracciones lipídicas seleccionadas de HCT-116-WT y HCT-116-IRV.

## Discusión

Elisidepsin es un derivado sintético de un compuesto de origen marino con una potente actividad citotóxica en varios tipos de líneas celulares tumorales [10]. En este trabajo, hemos evaluado los efectos de Elisidepsin en células humanas de carcinoma de colon, resistentes o sensibles a su acción citotóxica. Se ha observado que el tratamiento de las células con concentraciones micromolares induce una rápida muerte en las células sensibles, mientras que cuando se tratan las células resistentes con concentraciones efectivas de Elisidepsin, las células no presentan sensibilidad significativa al compuesto.

El análisis de las curvas de dosis-respuesta nos permite reafirmar, junto a otros estudios, que Elisidepsin necesita llegar a una concentración mínima en la célula para ejercer todo su efecto citotóxico (efecto todo-nada) [4]. A su vez, hemos podido observar que la citotoxicidad del compuesto implica una rápida pérdida de la homeostasis celular que se produce a los pocos minutos del comienzo del tratamiento, ya que los ensayos de viabilidad celular de tiempos largos o cortos, presentan resultados muy similares.

Las alteraciones que Elisidepsin provoca en células humanas sensibles incluyendo hinchamiento celular, pérdida de la integridad de membrana, formación de vesículas, daño en el retículo endoplasmático y mitocondria, sugieren que este compuesto induce cambios en el balance osmótico de la célula [4,5], posiblemente como resultado de daño en la membrana celular [9]. Además, el hecho de que otros orgánulos como los lisosomas no se vean afectados a tiempos cortos de exposición, sugiere que Irvalec actúe inicialmente en la membrana plasmática [4]. Todos estos cambios morfológicos y fisiológicos han sido corroborados por microscopía y por fluorimetría de placa, confirmando la rápida permeabilización de la membrana a moléculas como el IP. Estos procesos son característicos de la muerte celular por necrosis [9]. Además, el estudio de marcadores de apoptosis tuvo resultados negativos, así como el análisis de proteasas lisosomales indicó que su inhibición no protege frente a la actividad citotóxica de Elisidepsin [6].

Se ha comprobado que Elisidepsin interacciona rápidamente con la membrana de las células tumorales causando reestructuración de la bicapa lipídica, alterando su fluidez y sus propiedades fisicoquímicas normales [4]. Sin embargo, aunque Elisidepsin puede interactuar con la bicapa lipídica es improbable que por sí solo forme poros ya que es una molécula de 14 aminoácidos y, en teoría, hace falta un mínimo de 20 para atravesar por completo la membrana [5]. Se ha demostrado, utilizando la técnica de FRET, que a concentraciones citotóxicas, Elisidepsin forma complejos en la membrana, es decir, el compuesto se autoorganiza en la membrana formando estructuras supramoleculares que podrían provocar la ruptura de la integridad de membrana [4]. La rápida permeabilidad catiónica a IP y moléculas grandes como anexina V y LDH sugieren la formación de grandes poros [7].

Por otro lado, se ha visto que la sensibilidad a Elisidepsin depende de los niveles de la hidroxilación de ácidos grasos mediada por FA2H [5]. En modelos de levaduras, la resistencia a Elisidepsin estaba asociada con la deficiencia del gen FA2H, indicando la importancia que tiene la hidroxilación de los ácidos grasos en el mantenimiento de la conformación de la membrana, requerida para la actividad del compuesto [4]. A su vez, en la línea celular HCT-116 se ha observado que la sobreexpresión de FA2H incrementa la sensibilidad a Elisidepsin [5].

Nuestros resultados muestran una unión específica de Elisidepsin a una fracción lipídica concreta (fracción #4) presente en la línea celular HCT-116-WT, fracción que no se encuentra presente en la línea resistente al compuesto, HCT-116-IRV. Esto nos indica que la diana de acción de Elisidepsin en la membrana celular podría ser un lípido idéntico u homólogo en estructura a los lípidos presentes en dicha fracción. Además, el análisis de migración de los marcadores y la presencia de azúcares sugieren que ese lípido puede pertenecer al grupo de glucoesfingolípidos o ceramidas presentes en la membrana plasmática. De esta manera, la generación de la resistencia a Elisidepsin podría haber surgido por una deficiencia en la producción de este tipo de lípidos por parte de las células resistentes.



En conclusión, Elisidepsin muestra una potente actividad citotóxica en la línea celular HCT-116-WT que se desencadena rápidamente. Da lugar a un proceso de muerte por necrosis, marcado por una serie de profundas alteraciones morfológicas que afectan a la mayoría de orgánulos celulares y principalmente a la membrana plasmática. Todo ello parece asociado al contenido lipídico celular que podría marcar la sensibilidad o resistencia al compuesto, en función de la presencia o no de un componente lipídico de la membrana que podría actuar como diana directa de Elisidepsin.

## Agradecimientos

A la Universidad de Alcalá y al Departamento de Biología Celular de PharmaMar S.A.

## Referencias

1. Senthilkumar, K. y Kim, S-K. 2013. Marine Invertebrate Natural Products for Anti-Inflammatory and Chronic Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative medicine*, 2013, Article ID 572859, 10 pages.
2. D'Incalci, M. 2009. The potential impact of marine compounds in the era of targeting therapies. *Marine anticancer compounds in the era of targeted therapies*: 1-18.
3. Petit, K. y Biard, J-F. 2013. Marine Natural Products and Related Compounds as Anticancer Agents: an Overview of their Clinical Status. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13: 603-631.
4. Molina-Guijarro, J. M., Macías, A., García, G., Muñoz, E., García-Fernández, L. F., David, M., Núñez, L., Martínez-Leal, J. F., Moneo, V., Cuevas, L., Lillo, M. P., Villalobos Jorge, C., Valenzuela, C. y Galmarini, C. M. 2011. Irvalec Inserts into the Plasma Membrane Causing Rapid Loss of Integrity and Necrotic Cell Death in Tumor Cells. *PLoS One*, 6 (4).
5. Herrero, A. B., Astudillo, A. M., Balboa, M. A., Cuevas, C., Balsinde, J. y Moreno, S. 2008. Levels of SCS7/FA2H-Mediated Fatty Acid 2-Hydroxylation Determine the Sensitivity of Cells to Antitumor PM02734. *Cancer Res*, 68 (23): 9779-9787.
6. Janmaat, M. L., Rodriguez, J. A., Jimeno, J., Kruyt, F. A. E. y Giaccone, G. 2005. Kahalalide F Induces Necrosis-Like Cell Death that Involves Depletion of ErbB3 and Inhibition of Akt Signaling. *Mol Pharmacol*. 68 (2): 502-510.
7. Swell, J. M., Mayer, I., Langdon, S.P., Smyth, J. F., Jodrell, D. I. y Guichard, S. M. 2005. The mechanism of action of Kahalalide F: Variable cell permeability in human hepatoma cell lines. *Eur J Cancer*. 41: 1637-1644.
8. Serova, M., de Gramont, A., Bieche, I., Riveiro, M. E., Galmarini, C. M., Aracil, M., Jimeno, J., Faivre, S. y Raymond, E. 2013. Predictive Factors of Sensitivity to Elisidepsin, a Novel Kahalalide F-Derived Marine Compound. *Mar. Drugs*, 11: 944-959.
9. Suárez, Y., González, L., Cuadrado, A., Berciano, M., Lafarga, M. y Muñoz, A. 2003. Kahalalide F, a new marine-derived compound, induces oncosis in human prostate and breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2: 863-872.
10. Teixidó, C., Marés, R., Aracil, M., Ramón y Calar, S. y Hernández-Losa, J. 2013. Epithelial-Mesenchymal Transition Markers and HER3 Expression Are Predictors of Elisidepsin Treatment Response in Breast and Pancreatic Cancer Cell Lines. *PLoS One*, 8 (1).