



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
Y  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR,  
FISIOLOGÍA, GENÉTICA E INMUNOLOGÍA

***Programa de Doctorado:***  
Obtención, Preparación y Evaluación Biológica  
de Fármacos de Origen Marino y Terrestre  
(Programa Interdepartamental)

**Título**

**EVALUACIÓN DE POTENCIALES COMPUESTOS  
ANTILEUCÉMICOS NATURALES Y SEMISINTÉTICOS**

**La Doctoranda**

**El Director**

**El Director**

**Olga Burmistrova**

**Dr. Francisco Estévez  
Rosas**

**Dr. José Quintana  
Aguar**

**Las Palmas de Gran Canaria, a 4 de abril de 2013**





UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular,  
Fisiología, Genética e Inmunología

Francisco Estévez Rosas, Catedrático y José Quintana Aguiar, Profesor Titular, ambos del Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología Genética e Inmunología, como directores del trabajo presentado en esta memoria:

CERTIFICAN: Que la memoria titulada “*Evaluación de potenciales compuestos antileucémicos naturales y semisintéticos*” ha sido realizada por la Licenciada en Química Olga Burmistrova, bajo nuestra dirección en las dependencias de este Departamento durante los años 2007-2013.

AUTORIZAN: La defensa de la presente Memoria, dado que reúne los requisitos de calidad necesarios para constituir la Tesis Doctoral, que la citada Licenciada presenta para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria en el Programa de los Departamentos de Química y Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología titulado Obtención, Preparación y Evaluación Biológica de Fármacos de Origen Marino y Terrestre.

Las Palmas de Gran Canaria, abril de 2013

Fdo. Francisco Estévez Rosas

Fdo. José Quintana Aguiar



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, Dr. Francisco Estévez Rosas y Dr. José Quintana Aguiar, por su ayuda y dedicación en el trabajo diario, por estar dispuestos siempre para aclarar mis dudas y por tolerar mi horario de trabajar un poco especial.

Muchas gracias a mis compañeros del laboratorio Sara, Gledy, Fernando, Mayte, Mercedes y Elisa, por haberme acompañado durante estos años, por su ayuda, por los pequeños y grandes favores.

Gracias a mis amigos de Gran Canaria, en especial a Nayra Guerra, por hacerme sentir como en casa. Nayra, gracias por el apoyo, por compartir conmigo los momentos buenos y malos, nuestras aventuras y nuestras tristezas.

Y sobre todo gracias a mi familia, sin ellos no hubiera sido posible. Por apoyarme siempre, psicológicamente y materialmente, por tener tanta paciencia conmigo. Este trabajo está dedicado a ellos.

Дорогие мои родители и братишка, спасибо вам за поддержку, моральную и материальную. Без вас все это было бы невозможно. Я, наконец-то, пришла к финишу, спасибо за ваше терпение. Эта кандидатская целиком посвящается вам. Надеюсь, вы мной гордитесь.

Quiero hacer extensivo mi agradecimiento a la Fundación Canaria Universitaria de Las Palmas por la concesión de una beca de investigación para la realización de una parte del trabajo que aquí se presenta.



## ÍNDICE

---





# ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Tratamiento del cáncer.	13
1.2. Flavonoides.	14
1.3. Abietanos diterpénicos.	15
1.4. Inhibición de la proliferación celular. Inducción de la parada del ciclo celular.	16
1.5. Apoptosis.	19
1.5.1. Caspasas.	21
1.5.2. Vía extrínseca. Receptores de la muerte.	23
1.5.3. Vía intrínseca o vía mitocondrial. Proteínas de la familia Bcl-2.	25
1.5.4. Estrés oxidativo y apoptosis.	29
1.5.5. Lisosomas y Retículo Endoplasmático (ER) en apoptosis.	29
1.6. Vía de señalización de las proteín-quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).	31
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAL Y MÉTODOS	43
3.1. Agentes farmacológicos.	43
3.2. Productos y material.	44
3.3. Modelo experimental.	47
3.3.1. Cultivo de células leucémicas humanas HL-60 y Molt-3, y células de linfoma histiocítico humano U937.	48
3.3.2. Cultivo de células de melanoma humanas SK-MEL-1.	47
3.3.3. Cultivo de células MCF-7.	48
3.3.4. Cultivo de células HL-60 transfectadas con el gen humano Bcl-x <sub>L</sub> y con el vector control, y de células U937 que	48

## Índice

expresan niveles elevados del gen humano Bcl-2.	
3.3.5. Células mononucleares de sangre periférica de origen humano.	48
3.3.6. Tratamiento con los compuestos.	49
3.4. Métodos.	50
3.4.1. Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> y estudios de la proliferación celular: MTT.	50
3.4.2. Tinción con el fluorocromo bisbenzimidida.	50
3.4.3. Fragmentación del ADN.	51
3.4.4. Cuantificación de células hipodiploides por citometría de flujo. Cuantificación de la fracción SubG <sub>1</sub> , G <sub>1</sub> , S y G <sub>2</sub> /M mediante el análisis del contenido en ADN.	52
3.4.5. Determinación de las células apoptóticas mediante el análisis de la externalización de fosfatidilserina.	53
3.4.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).	54
3.4.7. Determinación de la actividad caspasa.	54
3.4.8. Inmunodetección de proteínas. Transferencia Western.	55
3.4.9. Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelular.	57
3.4.10. Análisis de la despolarización de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).	58
3.5. Métodos estadísticos.	58
CAPITULO I. Evaluación de la actividad antiproliferativa del heptaacetato de astragalina (AHA).	61
4. RESULTADOS	61
4.1. Los derivados semisintéticos de la quercetina y kaempferol inhiben el crecimiento y la viabilidad de la línea celular de leucemia humana HL-60.	61
4.2. AHA induce apoptosis en células de leucemia mieloide humana.	64
4.3. AHA induce la muerte celular mediada por la activación de	66

caspasas.	
4.4. La mitocondria desempeña un papel importante en la muerte celular inducida por AHA.	69
4.5. AHA activa las proteínas quinasas activadas por mitógenos MAPKs.	71
4.6. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son necesarias para la muerte celular inducida por AHA.	73
5. DISCUSIÓN	75
CAPÍTULO II. Evaluación de la actividad antiproliferativa de los abietanos diterpénicos.	81
6. RESULTADOS	81
6.1. Los abietanos diterpénicos inhiben la viabilidad celular de líneas celulares tumorales de origen humano.	81
6.2. Los abietanos diterpénicos inducen apoptosis en células de leucemia mieloide humana.	88
6.3. Papel de las caspasas en la muerte celular inducida por los abietanos <b>1, 12, 14</b> y <b>15</b> .	91
6.4. Papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por los compuestos <b>1, 12, 14</b> y <b>15</b> .	93
6.5. Los abietanos diterpénicos seleccionados activan las proteínas quinasas activadas por mitógenos MAPKs.	95
6.6. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) no son necesarias para la muerte celular inducida por los abietanos diterpénicos.	97
7. DISCUSIÓN	100
8. CONCLUSIONES	107
9. BIBLIOGRAFÍA	111
10. ANEXO: Publicaciones y comunicaciones a congresos a las que ha dado lugar esta tesis.	121



## **ABREVIATURAS**

---



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA	Heptaacetato de Astragalina
AIF	Factor inductor de apoptosis
Apaf-1	Factor activador de proteasas apoptóticas
ATP	Adenosín trifosfato
Bad	Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2
Bak	Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2
Bax	Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica de la familia Bcl-2
Bcl-x <sub>L</sub>	Proteína anti-apoptótica de la familia Bcl-2
Bid	Proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2
BIR	Dominio de interacción proteína-proteína en las IAPs
CAK	Proteína quinasa activadora de CDK
CCCP	m-Clorofenil-Hidrazona de Carbonil Cianuro
CDK	Proteína quinasa dependiente de ciclina
CKI	Inhibidores de CDK
DD	Dominio de muerte
DED	Dominio efector de muerte
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetra-acético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-N,N'-tetraacético
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
Fas	Receptor de muerte, también llamado Apo1 o CD95R
FasL	Ligando de receptor de muerte Fas
FBS	Suero bovino fetal
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
IC <sub>50</sub>	Concentración de producto que inhibe el crecimiento celular a la mitad
JNK	Proteína quinasa N-terminal de <i>jun</i>
jun	Factor de transcripción de la familia AP-1
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	Proteína quinasa de MAPK
MK	Proteínas quinasa activadas por MAPKs
MKP	Fosfatasas de MAPK

## Abreviaturas

MTT	Bromuro de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
Mu-Phe-HPh-fmk	Inhibidor de catepsina B/L
NAC	N-acetil-L-cisteína
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
p21	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclinas
p38	Proteína quinasa activada por mitógenos p38
p53	Proteína supresora de tumores
PARP	Poli(ADPribosa)polimerasa-1
PBMC	Células mononucleares humanas de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PD98059	Inhibidor de MEK1
PHA	Fitohemaglutinina
PMSF	Fluoruro de metilsulfonilfenilo
Raf	MAP3K
Ras	Proteína G pequeña
RING	Dominio interacción proteína-proteína
RIP	Proteína de interacción con el receptor
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SB203580	Inhibidor de p38
SDS	Dodecil sulfato sódico
Ser	Serina
Smac/DIABLO	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria
SOD	Superóxido dismutasa
SP600125	Inhibidor de JNK
TBST	20 mM Tris-HCl pH7,5, 137 mM NaCl, 0,1% Tween-20
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina
Thr	Treonina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR1	Receptor 1 de TNF
TRADD	Dominio de muerte asociado a TNFR
TRAF2	Factor asociado al receptor de TNF
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
U0126	Inhibidor de MEK1 y MEK2
XIAP	Proteína inhibidora de la apoptosis
z-DEVD-fmk	Inhibidor de caspasa-3/-7
z-IETD-fmk	Inhibidor de caspasa-8
z-LEVD-fmk	Inhibidor de caspasa-4
z-LEHD-fmk	Inhibidor de caspasa-9
z-VAD-fmk	Inhibidor general de caspasas



# INTRODUCCIÓN

---



## **1.1. Tratamiento del cáncer**

A pesar del progreso en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, esta enfermedad sigue siendo la principal causa de muerte: en el año 2008 murieron 7,6 millones de personas por esta causa (13% de todos los fallecimientos). Esta enfermedad es en realidad una patología compleja ya que no existe un solo tipo de cáncer sino muchos tipos de cánceres, es decir, abarca un grupo heterogéneo de más de 200 tipos de tumores malignos. Cada tipo de cáncer posee unas características particulares, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con una etiología, una evolución y un tratamiento específico.

El cáncer se caracteriza por la multiplicación incontrolada de las propias células corporales (resistiendo a las señales exógenas de inhibición del crecimiento, proliferando sin control) y la diseminación dentro del organismo (invasión y metástasis), que es capaz de comprometer la funcionalidad del cuerpo y llegar a producir la muerte. Se produce como consecuencia de la acumulación de múltiples alteraciones o errores en el sistema que la célula usa para regular la proliferación. Así la célula adquiere la capacidad de propagarse de forma indefinida (capacidad de las células para generar sus propias señales mitógenas), en donde se encuentran o bien en zonas diferentes de su localización normal como consecuencia de una pérdida de control de su proliferación, su diferenciación o de la respuesta a las señales que determinan su eliminación controlada por apoptosis [1].

Los productos naturales han sido un recurso importante y exitoso de la investigación de nuevos fármacos antitumorales. La importancia de los compuestos naturales es evidente: desde 1940 hasta 2010 aproximadamente el 50% de las 175

## Introducción

moléculas pequeñas con actividad antitumoral son compuestos naturales o sus derivados directos [2].

### 1.2. Flavonoides.

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, metabolitos secundarios de las plantas. Estos compuestos comparten la estructura de fenilbenzo- $\gamma$ -pirona (C6-C3-C6) y se pueden clasificar en flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y antocianidinas [3] (Figura 1). Son omnipresentes en las plantas y desempeñan muchas funciones como la pigmentación floral, la protección frente a la luz UV y ante herbívoros y la fijación de nitrógeno. Los flavonoides son bastante abundantes en la dieta humana y presentan una toxicidad relativamente baja comparada con otros compuestos activos de plantas, por ejemplo los alcaloides, un grupo de compuestos con un nitrógeno heterocíclico procedente del metabolismo de aminoácidos, que poseen acción fisiológica intensa en los animales aún a bajas dosis, incluyendo efectos psicoactivos (cocaína, morfina, nicotina etc).

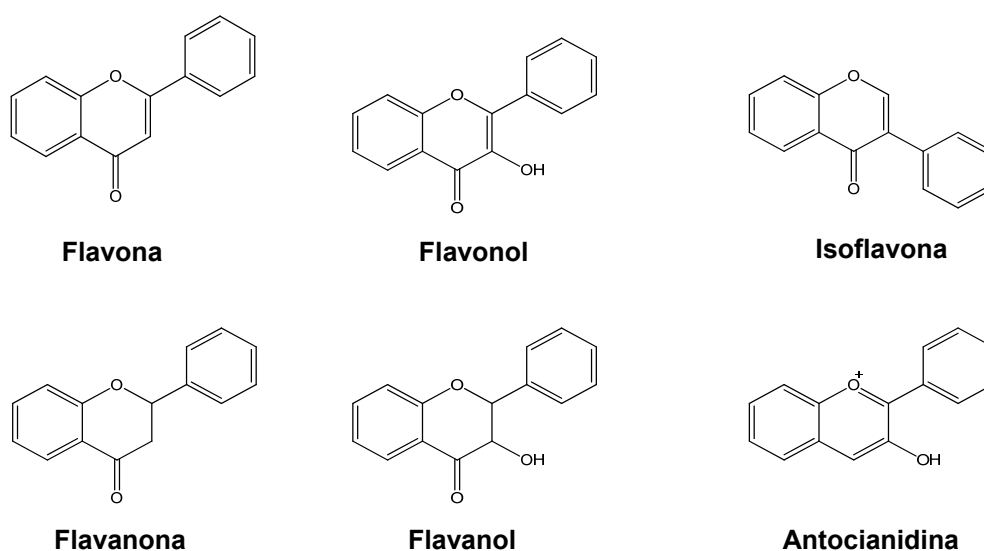


Figura 1. Estructuras de tipos de flavonoides.

Los flavonoides presentan un gran espectro de propiedades biológicas en humanos, entre las que se incluyen propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas, antioxidantes, antitrombóticas, protectoras gástricas y hepáticas, cardiotónicas y anticancerígenas.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una correlación entre el consumo de flavonoides y la disminución del riesgo de cáncer [4]. Estudios experimentales y clínicos indican que los flavonoides poseen efectos importantes en la prevención y tratamiento del cáncer, siendo capaces de interferir en las cuatro etapas de la carcinogénesis: iniciación, promoción, progresión e invasión. Basado en los estudios *in vivo* e *in vitro* muchos mecanismos pueden estar implicados en su acción: inactivación de carcinógenos, antiproliferación, inducción de la parada del ciclo celular, inhibición de la angiogénesis, actividad antioxidante y modulación de la resistencia a fármacos. Estos resultados han estimulado el desarrollo de los flavonoides en los ensayos clínicos humanos.

### **1.3. Abietanos diterpénicos.**

Los abietanos son un grupo de diterpenos, productos secundarios de algunas plantas (Figura 2), característicos del género *Salvia*. Los abietanos diterpénicos presentan gran variedad de actividades biológicas, como antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas y antiulcerosas [5,6,7,8]. Numerosos estudios indican que este grupo de compuestos también posee propiedades citotóxicas en gran variedad de líneas celulares de cáncer [9,10,11].

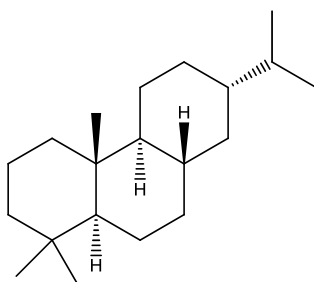


Figura 2. Estructura general de abietanos diterpénicos.

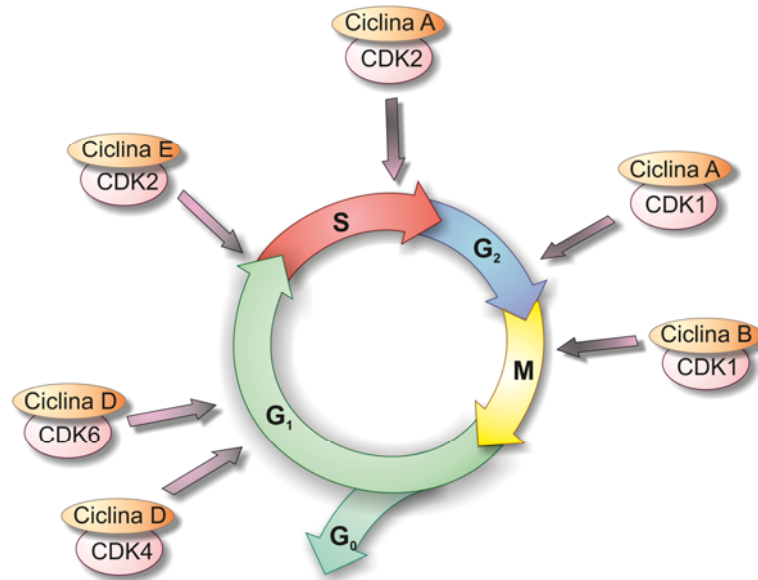
La taxodona, así como su derivado oxidado taxodiona, se encuentran en *Taxodium distichum*, *Rosmarinus officinalis* y en varias especies del género *Salvia*. Estos compuestos aislados inicialmente de *Taxodium distichum* (ciprés calvo), así como sus actividades antitumorales, fueron descubiertos en 1968 [12]. Más recientemente, se estudió la actividad citotóxica de la taxodiona aislada de *Salvia hypargeia* en determinadas líneas celulares [13]. Aunque existen indicios de que los abietanos diterpénicos poseen propiedades citotóxicas, su mecanismo de acción y su potencial antitumoral no han sido explorados.

#### 1.4. Inhibición de la proliferación celular. Inducción de la parada del ciclo celular.

El ciclo celular de una célula eucariota consta de cuatro fases (Figura 3) [14]:

- En la fase  $G_1$  la célula está creciendo y preparándose para la síntesis de ADN.
- En la fase S se produce la duplicación de ADN.
- En la fase  $G_2$  la célula se prepara para la mitosis.
- Y finalmente, en la fase M (mitosis) las células se separan en dos células hijas.

Las células en fase  $G_1$  antes de empezar la preparación para la replicación del ADN pueden entrar en fase de descanso  $G_0$  (células quiescentes).



*Figura 3. Regulación del ciclo celular.* El paso a través del punto de restricción de  $G_1$  es controlado por complejos de CDK4 y CDK6 con ciclinas del tipo D. Más adelante en  $G_1$  es controlado por complejos CDK2/ciclina E, que se requieren para el paso de  $G_1$  a S. Los complejos CDK2/ciclina A se requieren para la progresión de la fase S y los complejos CDK1/ciclina B dirigen el paso de  $G_2$  a M.

La transición de una fase del ciclo celular a la otra está regulada por diferentes proteínas celulares, entre ellas las más importantes son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Las CDKs son una familia de Ser/Thr proteínas quinasas activadas en determinados puntos específicos del ciclo celular. Los niveles de CDK se mantienen estables durante el ciclo celular, a diferencia de sus proteínas activadoras, las ciclinas. Los niveles de ciclinas aumentan y disminuyen durante el ciclo celular para activar periódicamente sus CDKs correspondientes. Además de la unión con las ciclinas, la actividad de CDK también está regulada por fosforilación en Thr y Tyr por el complejo CDK7-ciclina H, también denominado CAK. Estas

## *Introducción*

fosforilaciones inducen cambios conformacionales y aumentan la afinidad hacia las ciclinas. Las CDKs activas y unidas a ciclinas pueden ser desactivadas por inhibidores de CDK (CKI). La localización intracelular de las proteínas reguladoras del ciclo celular también contribuye a la progresión correcta del ciclo. Existen puntos de control adicionales en cada fase, llamados checkpoints. Como respuesta al daño al ADN, los puntos de control (checkpoints) detienen el ciclo para poder reparar el ADN. Los checkpoints del daño al ADN están antes de que la célula entre en la fase S (checkpoint G<sub>1</sub>/S) o después de la replicación del ADN (checkpoint G<sub>2</sub>/M) y probablemente en las fases S y M. En el checkpoint G<sub>1</sub>/S la detención del ciclo celular depende del factor de transcripción p53. Normalmente los niveles celulares de p53 son bajos, pero el daño al ADN induce la actividad de p53. Este factor de transcripción induce diferentes genes, como por ejemplo p21 y Bax. La proteína p21 es una CKI, que una vez inducida inhibe CDK y detiene el ciclo celular evitando la replicación del ADN dañado.

En el cáncer el control de la división celular está alterado y esto conlleva a una proliferación incontrolada. En células de cáncer se han detectado mutaciones en genes de CDK, en enzimas activadoras de CDK, en CKI, en sustratos de CDK y en proteínas checkpoints [15]. Existen varias estrategias terapéuticas de modulación de la actividad de CDK, como la modulación de los reguladores de la actividad de CDK (estrategia indirecta) o la inhibición de la actividad catalítica de las CDKs (estrategia directa). Las estrategias indirectas incluyen la expresión elevada de CKI, la síntesis de péptidos que imitan los efectos de los CKI, la reducción de los niveles de ciclinas, la modulación del estado de fosforilación de CDK y de sus enzimas reguladoras. Todos los inhibidores de CDK identificados hasta ahora actúan como inhibidores



competitivos de la unión de ATP con CDK. Se han descubierto más de 50 inhibidores específicos de CDK, entre ellos el flavonoide flavopiridol y sus derivados oxoflavopiridol y thiflavopiridol [14].

Los microtúbulos son polímeros dinámicos que desempeñan un papel crucial en muchas funciones celulares como la proliferación y la división celular, la movilidad, la fagocitosis, el transporte y la localización intracelular de orgánulos [16]. Su implicación en la mitosis los convierte en una diana muy atractiva para el desarrollo de fármacos antitumorales. Los agentes anti-microtubulares incluyen a los agentes polimerizantes (paclitaxel y docetaxel) y a los despolimerizantes (vincristina, vinorelbina y estramustina fosfato). Estos agentes inhiben la dinámica de los microtúbulos causando la rotura del huso mitótico, parando el ciclo celular en la fase M e iniciando la apoptosis.

### **1.5. Apoptosis**

Además de la parada del ciclo celular y los mecanismos de reparación, las células dañadas pueden inducir una respuesta apoptótica, o la muerte celular programada. El término apoptosis fue utilizado por la primera vez en la publicación de Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir una forma de la muerte celular distinta morfológicamente [17], aunque algunos componentes del concepto de la apoptosis se describieron anteriormente. La apoptosis desempeña un papel esencial en la supervivencia de los organismos multicelulares y su desarrollo. La desregulación de este proceso puede causar enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes y muchos tipos de cáncer.

Durante la apoptosis, la célula sufre una serie de cambios morfológicos. Se observa una contracción celular: las células son de tamaño reducido, el citoplasma

## *Introducción*

más denso y los orgánulos están más condensados. La condensación de la cromatina es una característica típica del proceso apoptótico. Existen cambios en la membrana plasmática, la cromatina se fragmenta y finalmente la célula forma cuerpos apoptóticos. La integridad de los orgánulos dentro de estos cuerpos apoptóticos se conserva y la membrana plasmática se mantiene intacta. Después, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos, células parenquimales o células neoplásticas y son degradados en los fagolisosomas [18].

El mecanismo de apoptosis es complejo y sofisticado e incluye una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. Los estudios indican que existen dos vías principales de la apoptosis: la vía extrínseca o de los receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial. Sin embargo, estas dos vías están conectadas y las moléculas de señalización de una vía pueden influir en la otra. Además, estas dos rutas se unen para iniciar la vía de ejecución.

Las células apoptóticas muestran varias modificaciones bioquímicas: la hidrólisis (ver Caspasas) y la reticulación de las proteínas, la fragmentación del ADN y la expresión de los marcadores de reconocimiento fagocítico en la superficie celular. La reticulación de las proteínas se induce por la expresión y la activación de la transglutaminasa tisular dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (tTG). Esta enzima forma las uniones específicas entre las cadenas laterales de glutámico y de lisina de las proteínas intra- y extracelulares, y de esta manera es responsable de la estabilización estructural observada en el proceso de la muerte celular apoptótica [19]. El ADN se fragmenta por las endonucleasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , generando fragmentos de 180 a 200 pares de bases [20]. La característica “escalera de ADN” puede ser visualizada en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta.

Otra característica bioquímica de la apoptosis, la expresión de los marcadores fagocíticos en la superficie celular, permite a las células vecinas reconocer y fagocitar rápidamente a las células apoptóticas. Esto se consigue, por ejemplo, con la externalización de la fosfatidilserina desde la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática [21]. La anexina V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina, y puede ser utilizada para la detección de la apoptosis [22]. Aunque la externalización de la fosfatidilserina es una señal bien conocida de la fagocitosis, estudios recientes indican que existen otras proteínas que se exponen a la superficie celular durante el proceso apoptótico.

### **1.5.1. Caspasas.**

La mayor parte de los cambios morfológicos observados durante la apoptosis están causados por un grupo de cisteína proteasas que son activadas específicamente en el proceso apoptótico, conocidas como caspasas. Hasta ahora, se han identificado al menos catorce caspasas siendo diez las más comunes, que pueden ser clasificadas en iniciadoras (caspasas-2,-8,-9,-10), ejecutoras (caspasas-3,-6,-7) e inflamatorias (caspasas-1,-4,-5) [23,24].

Todas las caspasas conocidas poseen una cisteína en el centro activo e hidrolizan los sustratos después de ácido aspártico. La especificidad de las caspasas viene determinada por los cuatro aminoácidos N-terminales del sitio de corte [25].

Como la mayoría de las proteasas, las caspasas se sintetizan como proenzimas inactivas o zimógenos. Estas proenzimas contienen tres dominios: un prodominio N-terminal y dominios p20 y p10, que se encuentran en la enzima madura. En todos los casos examinados las enzimas activas son heterotetrámeros que contienen dos p20/p10 heterodímeros y dos centros activos. La mayoría de las caspasas se activan

## *Introducción*

por hidrólisis de la proenzima entre los dominios p20 y p10 y normalmente también entre el prodominio y el dominio p20. Todos estos cortes ocurren después de ácido aspártico, lo que sugiere que existe una autocatálisis o una activación por otras caspasas. Por ejemplo, las caspasas ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras, mientras que la caspasa-8 se autoactiva por proximidad (ver vía extrínseca). La caspasa-9 se activa por un mecanismo más complejo. A diferencia de las otras caspasas el procesamiento proteolítico de la caspasa-9 tiene un efecto menor sobre su actividad enzimática. Para la activación de esta proteasa es necesaria su asociación con un cofactor proteico Apaf-1 [26]. La holoenzima formada por la caspasa-9 y Apaf-1 se denomina apoptosoma.

Se han descubierto casi 400 sustratos potenciales de caspasas [24]. Estos sustratos incluyen proteínas-componentes del citoesqueleto (actina, gelsolina,  $\beta$ -catenina etc) y del núcleo (lamina A y B, receptor de lamina B, proteínas del aparato mitótico, etc), proteínas implicadas en la reparación y el metabolismo del ADN (PARP, DNA-PKcs, ADN-topoisomerasa II, etc), proteínas quinasas (PKC, PKN, PAK2, MEKK1, Raf1, etc), proteínas involucradas en las vías de señalización (pro-interleuquinas, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y su regulador I $\kappa$ B, etc), proteínas reguladoras del ciclo celular y la proliferación (p21, p27, pRb, CDC27, etc), así como las proteínas cuya hidrólisis desempeña un papel crítico en la apoptosis (procaspasas, proteínas de la familia Bcl-2, ICAD (con la liberación de CAD, endonucleasa responsable de la aparición de la “escalera de ADN”)) [27].

La actividad de caspasas está regulada por una familia de proteínas llamada IAP (Inhibidor de Apoptosis) [28]. Se han identificado seis IAPs humanas: NAIP, c-IAP1/HAIP-2, c-IAP2/HAIP-1, XIAP/hILP, survivina y BRUCE. De éstas XIAP,

IAP1, IAP2 y posiblemente survivina son inhibidores directos de las caspasas-3, -7 y -9, pero no de las caspasas-1, -6, -8, y -10. Todos los miembros de la familia IAP contienen 1-3 dominios N-terminales BIR y un dominio C-terminal RING. Los dominios BIR son necesarios para la unión y la inhibición de las caspasas.

### **1.5.2. Vía extrínseca. Receptores de muerte.**

La vía de señalización extrínseca que inicia la apoptosis implica las interacciones mediadas por los receptores transmembranales de muerte de la superfamilia del receptor de TNF (Factor de Necrosis Tumoral). Los miembros de esta familia comparten un dominio extracelular rico en cisteína y tienen un dominio citoplasmático de 80 aminoácidos denominado dominio de muerte (DD) [29]. El DD desempeña un papel importante en la transmisión de la señal de la muerte en la superficie celular de las vías de señalización intracelulares. Hasta ahora, los ligandos y receptores de la muerte más caracterizados son: FasL/FasR(CD95), TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L(TRAIL)/DR4 y Apo2L(TRAIL)/DR5.

La mejor forma de caracterizar la secuencia de eventos de la vía extrínseca de la apoptosis es utilizando los modelos de FasL/FasR y TNF- $\alpha$ /TNFR1 (Figura 4) [29,30]. Tras la unión del ligando Fas a los receptores Fas (asociados en trímeros), los receptores de muerte activados reclutan una proteína adaptadora llamada FADD (Dominio de Muerte Asociada con Fas). FADD contiene dos dominios: un dominio de muerte (DD) y un dominio efector de muerte (DED). FADD se une al receptor de Fas, al mismo tiempo el DED se une a DED de la procaspasa-8, de esta manera se forma el complejo de señalización inductor de la muerte (DISC). La formación de DISC induce una alta concentración local de procaspasa-8. En estas condiciones la baja actividad intrínseca de la procaspasa-8 es suficiente para que varias moléculas

## Introducción

de proenzima se activen recíprocamente. Una vez activada la caspasa-8 se inicia la fase de ejecución de la apoptosis activando la caspasa-3. La caspasa-8 también corta una proteína de la familia Bcl-2 llamada Bid. La proteína Bid procesada se transloca a la mitocondria para activar la vía intrínseca, activándose así las dos rutas y amplificando la señal apoptótica inducida por los receptores de muerte [31].

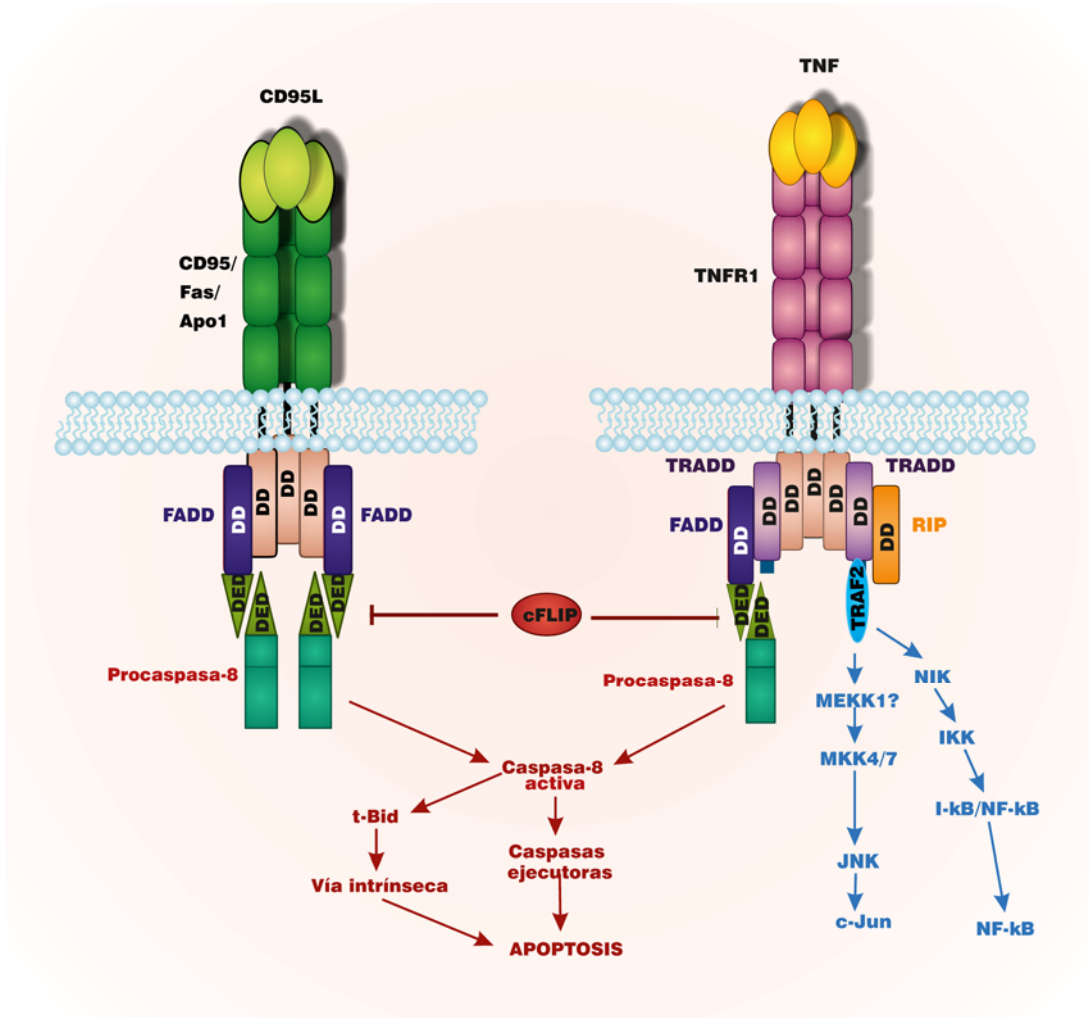


Figura 4. La vía extrínseca de la apoptosis. La unión de señales de muerte, como el ligando Fas o el factor de necrosis tumoral, a sus receptores activa a una proteína asociada (FADD) que a su vez desencadena la cascada de caspasas que conduce a la muerte celular.

La unión del ligando TNF a su receptor determina la unión de una proteína adaptadora TRADD y el reclutamiento de RIP y TRAF2 o FADD. RIP y TRAF2 estimulan las rutas de activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y JNK/AP-1, mientras FADD induce la ruta de apoptosis. A diferencia de Fas la unión de TNF a su receptor induce la apoptosis solo en el caso de que la síntesis de proteínas esté bloqueada.

La apoptosis mediada por los receptores de muerte puede ser inhibida por una proteína llamada c-FLIP, que está relacionada con caspasa-8 pero no posee actividad proteolítica. Probablemente c-FLIP compite con la procaspasa-8 para unir a DISC [32].

### **1.5.3. Vía intrínseca o vía mitocondrial. Proteínas de la familia Bcl-2.**

La vía de señalización intrínseca implica varios estímulos de apoptosis no relacionados con los receptores de muerte y se inicia en la mitocondria. Se puede estimular tanto por ausencia de factores de crecimiento, de hormonas y de citoquinas como por factores como la radiación, las toxinas, la hipoxia y la presencia de radicales libres [18]. Todos estos cambios pueden inducir la liberación de varias proteínas pro-apoptóticas de la mitocondria al citosol. La más importante de ellas es el citocromo *c* (Figura 5). En la mitocondria esta proteína funciona como un transportador electrónico pero una vez liberado el citocromo *c* se asocia con Apaf-1. La unión de citocromo *c* con Apaf-1 y su oligomerización dependiente de ATP permite el reclutamiento de la procaspasa-9 para formar una holoenzima llamada apoptosoma. De esta manera la activación de la caspasa-9 está mediada por los cambios conformacionales y no por proteólisis [33]. Otras proteínas liberadas de la mitocondria, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, también estimulan la apoptosis ya que

## Introducción

inhiben la actividad anti-apoptótica de las proteínas IAPs (Proteínas inhibidores de apoptosis).

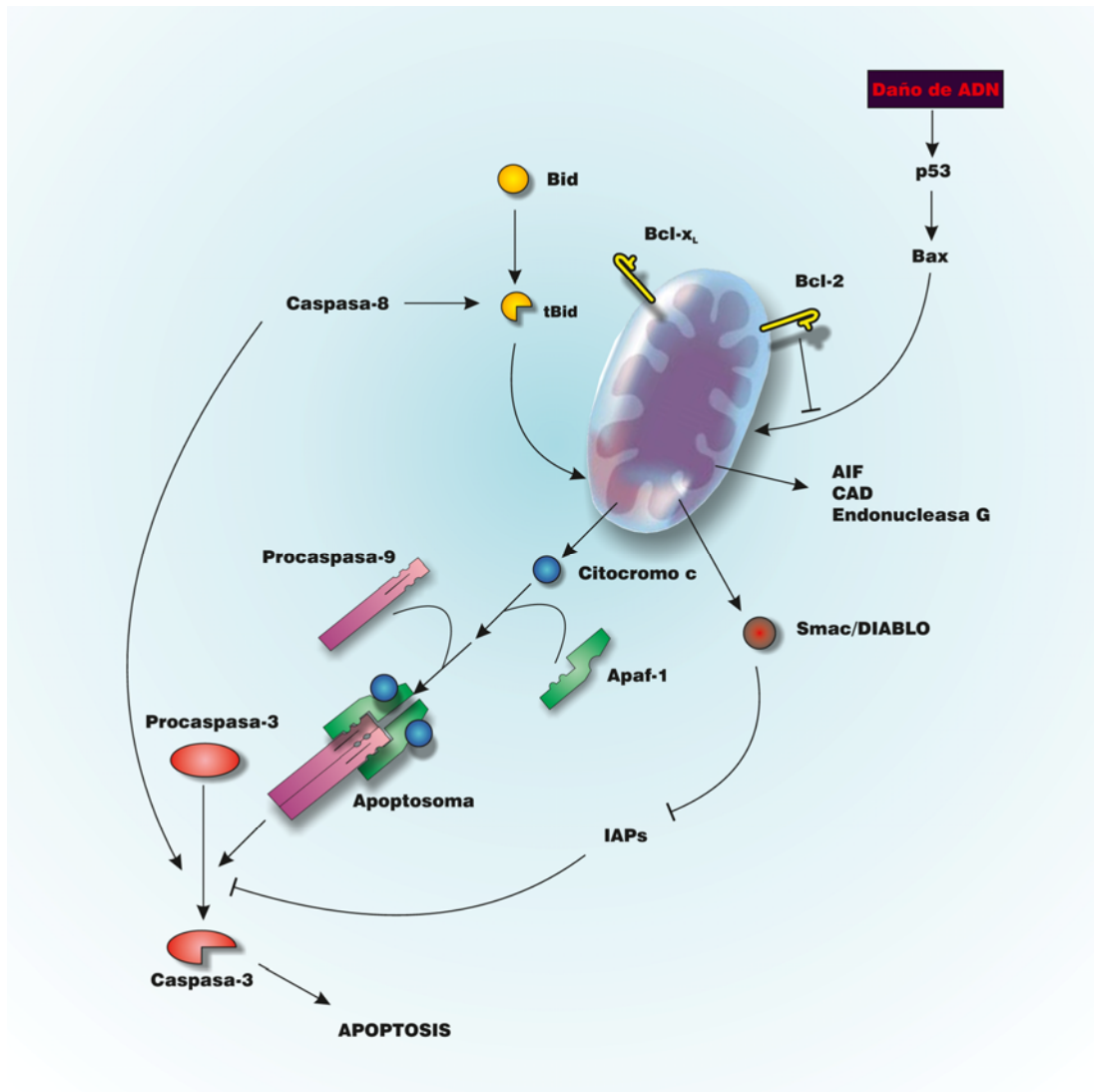


Figura 5. La vía intrínseca de la apoptosis. Muchas señales de muerte inducen daño mitocondrial, resultando en la liberación de proteínas proapoptóticas del espacio intermembrana. Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la integridad de la mitocondria y pueden controlar la liberación de citocromo *c* y desencadenar la muerte celular.



El segundo grupo de proteínas pro-apoptóticas liberadas de la mitocondria incluyen a la AIF (factor inductor de apoptosis), la endonucleasa G y CAD (Endonucleasa activada por caspasas, proteína responsable de la formación de la “escalera de ADN”). Sin embargo, es un evento tardío de la apoptosis y una vez liberadas estas proteínas inducen la fragmentación de ADN y la condensación de la cromatina [34].

La liberación de estas proteínas de la mitocondria está controlado por proteínas de la familia Bcl-2. La proteína que da el nombre a esta familia, Bcl-2 (B cell lymphoma-2) es un protooncogén responsable de un linfoma folicular de células B [35]. La familia Bcl-2 puede ser dividida en tres grupos basándose en su estructura y su papel en la apoptosis [36]:

- proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2-L-10, Bcl-B. Estas proteínas se caracterizan por la presencia de los 4 dominios de Bcl-2 (BH: BH1, BH2, BH3 y BH4) y poseen una cola hidrofóbica C-terminal que localiza a estas proteínas en la superficie exterior de la membrana mitocondrial y el resto de la proteína está orientada al citosol.

- proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bak, Bok/Mtd y Bcl-Xs, que contienen tres dominios BH1, BH2 y BH3 y la cola hidrofóbica C-terminal.

- proteínas que solo contienen un dominio BH3, que incluyen Bid, Bad, Noxa, Puma, Bmf, BimL/Bod, Bik/Nbk, Blk, Hrk/DP5, Bnip3 and Bnip3 L. Estas proteínas inducen apoptosis activando las proteínas pro-apoptóticas como Bax o inhibiendo las proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2.

Las proteínas de estas tres clases son capaces de formar homo-oligodímeros y heterodímeros entre sí mismos y desempeñan distintos papeles en el control del

## *Introducción*

potencial de la membrana mitocondrial. Bax y Bak son esenciales para la liberación de citocromo *c* [37]. En las células sanas Bax está localizado en el citosol como un monómero. Durante la apoptosis Bax se transloca a la mitocondria [38], donde sufre homooligomerización. Por el contrario, Bak reside en la mitocondria constantemente y durante la apoptosis se oligomeriza [39]. Los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 previenen la liberación de citocromo *c* formando heterodímeros con Bax/Bak y desactivándolos. Existen tres modelos para explicar cómo las proteínas de la familia Bcl-2 controlan la liberación de citocromo *c*, aunque ninguna de ellas ha sido confirmada. Las proteínas de la familia Bcl-2 no tienen homología en secuencia de aminoácidos significativa con ninguna otra proteína, aunque la estructura tridimensional de Bcl-x<sub>L</sub> se asemeja a la estructura de los dominios formadores de poros de ciertas toxinas bacterianas que actúan como canales de iones o de proteínas. Si la función está relacionada con la estructura, la predicción sería que las proteínas de la familia Bcl-2 pueden funcionar como canales [40]. Sin embargo, no se sabe si estos canales pueden ser lo suficientemente grandes para que puedan pasar las proteínas. Otra posibilidad es que las proteínas de la familia Bcl-2 recluten otras proteínas de la membrana externa mitocondrial, por ejemplo VDAC (Canal Aniónico Dependiente de Voltaje) para formar poros grandes [41]. Este modelo asume que VDAC sufre cambios conformacionales significativos al unirse con los miembros de la familia Bcl-2. Es posible que las proteínas de la familia Bcl-2 controlen la homeostasis de la mitocondria (por ejemplo gracias a su actividad como canal de iones mencionada más arriba) o indirectamente, a través de la modulación de otras proteínas mitocondriales, como por ejemplo VDAC, ya que puede formar un poro de transición permeable mitocondrial (PTP). PTP es un canal grande, su apertura

determina la pérdida rápida del potencial mitocondrial, el hinchamiento del orgánulo y la liberación del citocromo *c* [36].

#### **1.5.4. Estrés oxidativo y apoptosis.**

El tratamiento oxidativo directo así como la producción intracelular no regulada de especies reactivas de oxígeno (ROS) son igual de peligrosos para la célula. Existen varias defensas celulares que pueden ser divididas en no enzimáticas y enzimáticas [42]. Las defensas no enzimáticas incluyen agentes hidrosolubles como el glutatión (GSH), el ascorbato, el ácido úrico, las proteínas plasmáticas, y los agentes liposolubles como el  $\alpha$ -tocoferol, el  $\beta$ -caroteno, la bilirrubina y el ubiquinol, que son más útiles para combatir la peroxidación de lípidos. De todos estos agentes el tripéptido GSH ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly) es el más rápido y más abundante, y regula el estado redox de muchas otras moléculas celulares. Se ha demostrado que durante la apoptosis disminuyen los niveles de GSH y se incrementan los niveles de ROS [43]. La capacidad de antioxidantes como la catalasa y la N-acetilcisteína (NAC), precursor de GSH, de bloquear la apoptosis inducida por diferentes agentes, indica el papel central del estrés oxidativo en el proceso de apoptosis [44]. La redistribución del glutatión celular puede ser otro evento crítico durante la apoptosis. Se ha demostrado que la expresión elevada de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 induce un cambio del estado redox de la célula hacia el estado más reducido: aumentan los niveles de GSH, de superóxido dismutasa (SOD) y de catalasa [45].

#### **1.5.5. Lisosomas y Retículo Endoplasmático (ER) en apoptosis.**

El lisosoma es un orgánulo rico en hidrolasas ácidas y está involucrado en la degradación del material fagocitado y en la digestión de proteínas en general [46].

## *Introducción*

Las proteasas de la familia de la catepsina son las hidrolasas lisosomales mejor caracterizadas. La mayoría de las catepsinas son cisteín-proteasas (catepsina B, C, H, F, K, L, O, S, V, W y X/Z), dos son aspartil proteasas (catepsina D y E) y una es una serín-proteasa (catepsina G). Estas enzimas son activas y estables a pH bajo, mientras que a pH normal son muy activas pero no tan estables.

La rotura de los lisosomas, que provoca la liberación de las catepsinas al citosol, es dañino para la célula. El citosol contiene cistatinas, que son inhibidores endógenos de cisteín-catepsinas. El grado de permeabilidad lisosomal puede determinar la cantidad de catepsinas liberadas al citosol: la rotura completa de todos los lisosomas induce necrosis, mientras que la rotura parcial (suficiente para superar la protección de cistatinas) puede iniciar la apoptosis. Algunas catepsinas pueden inducir la activación de Bid por hidrólisis iniciando de esta manera la vía intrínseca de la apoptosis [47]. Determinados estudios han puesto de manifiesto que los lisosomas de las células tumorales son más grandes y más susceptibles a la rotura. Además, la probabilidad de una rotura lisosomal en las células tumorales es más alta debido a que la digestión de proteínas está aumentada en las células que proliferan rápidamente.

Las proteínas destinadas a la secreción o a la membrana plasmática se translocan al retículo endoplasmático (ER), donde se modifican y se pliegan correctamente. La acumulación de las proteínas mal plegadas en el ER provoca estrés de ER y si éste es excesivo induce la apoptosis. IRE1 es una proteína quinasa transmembranal localizada en el ER y su función es la transmisión de las señales del estrés de ER. Una vez activada IRE1 recluta TRAF2 a la membrana del ER lo que desencadena la activación de la cascada de JNK (ver Vía de señalización de las

proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [48]. La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER induce la activación de las calpaínas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$ , que pueden activar proteínas apoptóticas como Bid [49], Bax [50] y caspasa-7 [51]. La caspasa-4 localizada en la membrana de ER es procesada y activada cuando las células se tratan con los agentes inductores del estrés del ER [52].

### **1.6. Vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).**

Las redes de señalización permiten a las células percibir los cambios en el medio extracelular y organizar una respuesta apropiada. Las cascadas de MAPK son uno de los sistemas de señalización más estudiados y se ha demostrado su participación en la diferenciación, el movimiento, la división y la muerte celulares. Hasta ahora, se han caracterizado seis grupos de MAPKs en mamíferos: proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), proteínas quinasas de Jun NH<sub>2</sub> terminal (JNK1/2/3), proteínas quinasas p38 (p38  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ), ERK7/8, ERK3/4 y ERK5. Los grupos más estudiados son las proteínas quinasas ERK1/2, JNKs y p38 [53].

Normalmente estas cascadas están organizadas en tres pasos de fosforilación secuencial (Figura 6): MAPK, activador de MAPK (MEK, MKK o MAPKK) y activador de MEK (MEKK, MAPKKK o MAP3K). Las MAP3Ks son Ser/Thr quinasas activadas vía fosforilación y/o interacción con proteínas G pequeñas de la familia Ras/Rho como respuesta a los estímulos extracelulares. La activación de MAP3K causa la fosforilación de MAPKK. MAPKK es una proteína quinasa de especificidad dual y puede fosforilar MAPK en treonina y tirosina del motivo conservado Thr-Xaa-Tyr y de esta manera activarlas.

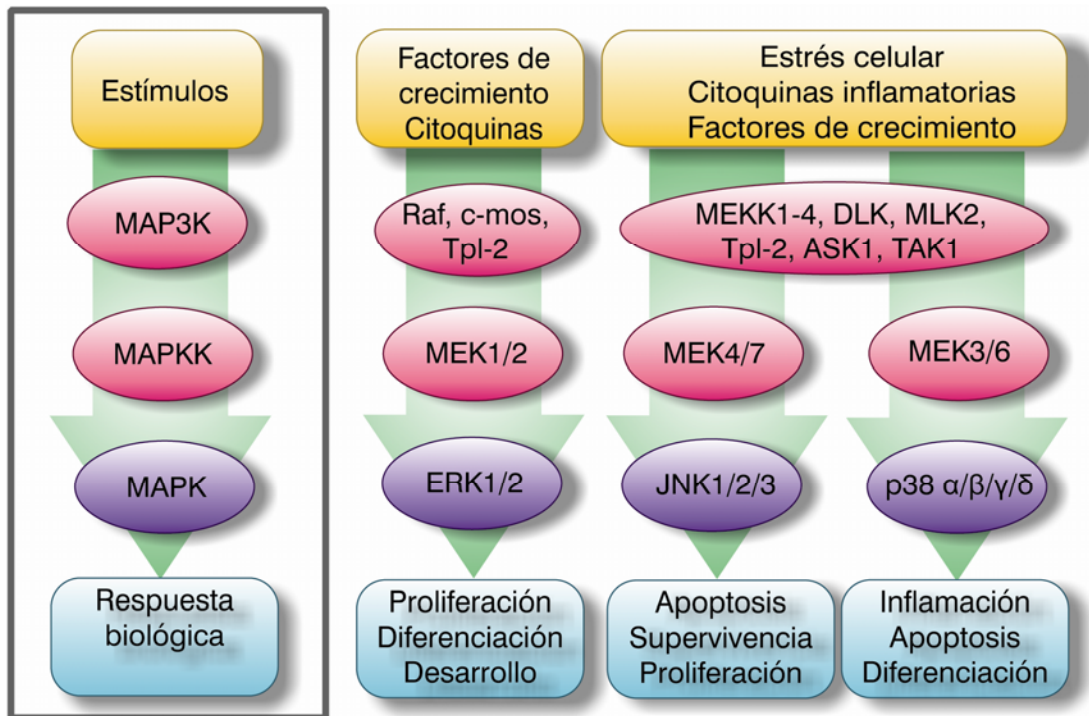


Figura 6. Las cascadas de MAPKs. La activación de ERK está mediada por cascadas de proteínas quinasas paralelas a las responsables de la activación de JNK y p38. Las cascadas de proteínas quinasas que conducen a la activación de JNK y p38 son activadas preferentemente por las citoquinas y el estrés celular y conducen, en general, a la inflamación o a la muerte celular.

Una vez activadas, las MAPKs fosforilan sus sustratos en serina o treonina solo si el siguiente aminoácido es prolina. Además, para aumentar la eficiencia y la especificidad de la vía, las MAPKs requieren la presencia de unos dominios en los sustratos que son específicos para cada grupo de MAPKs. Los sustratos de las MAPKs pueden ser factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto u otras proteínas quinasas, proteínas quinasas activadas por MAPKs o MKs. Las MKs contribuyen a la especificidad, diversidad y amplificación adicionales de las cascadas MAPK. Algunos efectos de los MAPKs no requieren su actividad quinasa y pueden

funcionar por interacción directa proteína-proteína, como por ejemplo la degradación de *c-jun* por JNK y la activación de la topoisomerasa II $\alpha$  por ERK [54].

Ya que los niveles de MAPKs no cambian durante la estimulación, la desfosforilación por fosfatasas parece desempeñar un papel principal en la regulación de la actividad de MAPK [53]. Este proceso puede ser mediado por Ser/Thr fosfatasas, Tyr fosfatasas o fosfatasas con especificidad dual. Estas fosfatasas tienen un motivo de interacción con quinasas (KIM) en el lado N-terminal del dominio fosfatasa [55].

Se han propuesto varios mecanismos que participan en la determinación de la especificidad de las MAPKs para explicar su capacidad de transmitir señales diferentes e incluso opuestas: i) la duración y la fuerza de la señal, ii) la interacción con proteínas adaptadoras (JIP en la cascada JNK y KSR y MP1 para ERK), iii) la localización subcelular, iv) la presencia de varias isoformas en cada nivel de la cascada, v) la conexión con otras cascadas de MAPKs y otras rutas de señalización, y vi) otras modificaciones post-transcripcionales diferentes a la fosforilación.

La proteína quinasa ERK fue la primera MAPK identificada y es la mejor estudiada. Se conocen dos isoformas ERK1 y ERK2 que son 83% idénticas y se expresan en todos los tejidos. La señalización a través de esta cascada comienza por la activación de los receptores de la superficie celular, como los receptores tirosina-quinasa (RTKs) y los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), la transducción de la señal a través de proteínas G pequeñas (por ejemplo Ras), que transmite la señal reclutando a la membrana plasmática MAP3K (como Raf quinasa), donde se activan. Otras MAP3Ks involucradas en la cascada de ERK son c-Mos, TPL2 y MEK1/2/3 que actúan principalmente durante la meiosis, la proliferación y la

## *Introducción*

respuesta al estrés, respectivamente. Las MAP3K activadas se unen con proteínas quinasas de especificidad dual MEK 1 y 2 y las fosforilan. MEK1/2 fosforila posteriormente a ERK1/2 en el motivo conservado Thr-Glu-Tyr. Se conocen más de 150 sustratos de ERK1/2 que incluyen proteínas citosólicas, membranales, nucleares y proteínas del citoesqueleto, así como MKs. La ruta ERK está desregulada en aproximadamente la tercera parte de los cánceres humanos. Muchos componentes de esta ruta están relacionados con la proliferación. ERK1/2 controla tanto la proliferación como la progresión del ciclo celular. Aunque la ruta de ERK está implicada en supervivencia celular, su activación también puede estar implicada en la apoptosis inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) [56]. Varios estudios han demostrado una reducción de la expresión de Bax y p53 por inhibición de ERK [57]. ERK fosforila p53 en Ser15 aumentando su efecto apoptótico [58] y también fosforila al miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2, Bad, impidiendo de esta manera su translocación a la mitocondria [59].

Las JNKs se identificaron inicialmente como proteínas quinasas activadas por estrés (SAPKs) en el hígado de las ratas tratadas con cicloheximida, pero después cambiaron de nombre para resaltar su papel en la fosforilación y la activación del factor de transcripción *c-jun* [53]. Las JNKs se activan en respuesta a citoquinas, irradiación UV, deficiencia de factores de crecimiento, agentes que dañan el ADN y en menor medida por estimulación de algunos GPCRs, por el suero y por los factores de crecimiento. Las JNKs de mamíferos están codificadas por tres genes distintos (JNK1, JNK2 y JNK3) y la maduración alternativa de estos genes genera diez productos diferentes de 46-55 kDa. Como en el caso de ERK la activación de JNK requiere la fosforilación en el motivo conservado de Thr-Pro-Tyr. Se han



identificado gran cantidad de sustratos de JNKs, principalmente factores de transcripción y receptores hormonales nucleares. Muchas proteínas mitocondriales, como por ejemplo las proteínas de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bad, Bim y Bax), también son sustratos de JNK, así como las proteínas del citoesqueleto paxilina, MAP-2, -1B y Tau. Hasta el momento, no ha sido identificada ninguna MK activada por JNK. Se ha demostrado que JNK está involucrada en la degradación del inhibidor de caspasa-8 cFLIP<sub>L</sub>. Aunque el papel de JNK en apoptosis está bien establecido, esta quinasa también contribuye a la supervivencia. Estos efectos opuestos están determinados por la duración o la magnitud de la activación y en parte por la activación de otras rutas. La activación prolongada de JNK induce la apoptosis, mientras que la activación transitoria está implicada en la supervivencia celular [60].

Por lo general, los mismos estímulos que activan la ruta de JNK también activan la de p38. Existen al menos cuatro isoformas de p38:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Entre ellas la p38 $\alpha$  es la más estudiada. La proteína quinasa p38 activa fosforila varias dianas celulares, tanto factores de transcripción (causando cambios en la expresión de genes), como MKs. También se ha demostrado que p38 fosforila y reduce los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> y aumenta los niveles de p53 [61], favoreciendo de esta manera la apoptosis.



## **OBJETIVOS**

---



## **OBJETIVOS**

1. Analizar la citotoxicidad de un grupo de flavonoides y abietanos diterpénicos utilizando como modelo de estudio diversas líneas celulares tumorales humanas.
2. Seleccionar los compuestos más citotóxicos e investigar su mecanismo de acción.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---





### 3.1. Agentes farmacológicos.

Los estudios correspondientes al aislamiento, elucidación estructural y derivatizaciones de los productos naturales fueron llevados a cabo en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González”, La Laguna, Tenerife, bajo la dirección del Dr. Jesús M. González Díaz. Kaempferol 3-*O*-β-(2’’-acetil)-glucopiranosido (2’’-acetilastragalina) fue aislado de *Delphinium staphisagria*. El derivado heptaacetilado de la astragalina (AHA) se obtuvo tratando 2’’-acetilastragalina con anhídrido acético en piridina durante 12 h [62]. La identificación de las estructuras se realizó por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H-NMR y <sup>13</sup>C-NMR) y espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS) y la pureza de todos los compuestos fue del 99% determinada por HPLC.

Los abietanos diterpénicos ensayados son diterpenoides naturales aislados de *Salvia sp.* o derivados semisintéticos obtenidos de los compuestos naturales. Todos los compuestos han sido descritos anteriormente y se obtuvieron en el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad de Lisboa bajo la dirección de la Dra M. Fátima Simões. Los abietanos diterpenoides: taxodona (**1**), taxodiona (**2**) y royleanona (**3**) se aislaron de *Salvia phlomoides* [63], 7α-etoxiroyleanona (**4**) and inuroyleanol (**5**) se aislaron de *Salvia lavandulaefolia* [64] y coleona U (**6**) se aisló de *Plecranthus grandidentatus* [65]. Los abietanos diterpénicos reorganizados 2-oxocandesalvona A (**7**) y teuvincenona A (**8**) se aislaron de *S. palaestina* [66] y *Teucrium polium* subsp. *vincentinum* [67], respectivamente. Los derivados sintéticos 11,12-di-*O*-acetil-14-desoxicoleona U (**9**) y 6,11,12-tri-*O*-acetil-14-desoxicoleona U (**10**) se prepararon a partir de 14-desoxicoleona U como está descrito anteriormente [63].

## Material y Métodos

La 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxiroyleanona (**11**) se obtuvo de *P. grandidentatus* [68] y los derivados sintéticos 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -benzoiloxi-12-*O*-benzoilroyleanona (**12**), 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -(4-cloro)benzoiloxi-12-*O*-(4-cloro)benzoilroyleanona (**13**), 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxi-12-*O*-(4-metoxi)benzoilroyleanona (**14**), 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxi-12-*O*-(4-cloro)benzoilroyleanona (**15**), 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxi-12-*O*-(4-nitro)benzoilroyleanona (**16**), 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -(4-nitro)benzoiloxiroyleanona (**17**), 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diacetoxi-12-*O*-acetilroyleanona (**18**), 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -propioniloxi-12-*O*-propionilroyleanona (**19**), 6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diacetoxiroyleanona (**20**), 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -propioniloxiroyleanona (**21**) y 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -butiriloxiroyleanona (**22**) se prepararon de (**11**) como está descrito en [69].

Los derivados sintéticos (11*R*\*,13*E*)-11-acetoxihalima-5,13-dien-15-ol (**23**), (11*R*\*,13*E*)-15-propioniloxihalima-5,13-dien-11-ol (**24**), (11*R*\*,13*E*)-15-butiloxihalima-5,13-dien-11-ol (**25**), (11*R*\*,13*E*)-15-benzoiloxihalima-5,13-dien-11-ol (**26**), (11*R*\*,13*E*)-15-(4-metoxi)benzoiloxihalima-5,13-dien-11-ol (**27**), (11*R*\*,13*E*)-halima-5,13-dien-11,15-diol (**28**) y el ester metílico del ácido (11*R*\*,13*E*)-11-acetoxihalima-5,13-dien-15-oico (**29**) se obtuvieron a partir del ácido (11*R*\*,13*E*)-11-acetoxihalima-5,13-dien-15-oico (**30**), un 5-halimano diterpénico aislado de *P. ornatus* [70].

### 3.2. Productos y material.

Los medios de cultivo RPMI 1640, DMEM, el suero bovino fetal (FBS), el HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazino N'-[2-etanosulfónico]), la L-glutamina, el azul de tripán, el bicarbonato sódico y los antibióticos (estreptomicina, gentamicina y penicilina G) fueron de Sigma Chemical Co. (San Luis, EE UU). Las botellas de

cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y las placas de 48 y 96 pocillos estériles, así como el resto del material estéril utilizado fueron de Becton-Dickinson.

El yoduro de propidio, la RNasa A, la proteinasa K, el paraformaldehído, la bisbenzimidida (Hoechst nº 33258) y el fenol fueron suministradas por Sigma Chemical Co. El cloroformo y alcohol isoamílico se obtuvieron de BDH (Poole, Inglaterra). La agarosa se obtuvo de Bio-Rad (Madrid, España) y el bromuro de etidio de Sigma/Aldrich (España). Se utilizó un microscopio de fluorescencia LSM 5 PASCAL de ZEISS.

La anexina V se obtuvo de BD Pharmigen<sup>TM</sup> (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit). Los fluorocromos H<sub>2</sub>-DCF-DA (diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína) y JC-1 (yoduro de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetil-bencimidazolo-carbocianina) se obtuvieron de Molecular Probes (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA). Los inhibidores de caspasas: z-VAD-fmk (benciloxi-carbonil-Val-Ala-Asp (OMe)-fluoro metil cetona), Q-VD-OPh (ácido (3S)-5-(2,6-Difluorofenoxi)-3-[[[(2S)-3-metil-1-oxo-2-[(2-quinolinilcarbonil)amino]butil]amino]-4-oxo-pentanoico), z-DEVD-fmk (benciloxicarbonil-Asp-Glu-Val-Asp-(OMe) fluorometil cetona), z-LEHD-fmk (benciloxicarbonil-Leu-Glu-His-Asp (OMe) fluorometil cetona), z-IETD-fmk (benciloxicarbonil-Ile-Glu-Thr-Asp(OMe) fluorometil cetona), z-LEVD-fmk (benciloxicarbonil-Leu-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-fluorometil cetona), el inhibidor de catepsina B/L, Mu-Phe-HPh-fmk (*N*-metoxisuccinil-Phe-homoPhe-fluorometil cetona), los inhibidores de MAPKs (SP600125, PD98059, SB203580, U0126) y los inhibidores de PTP, ciclosporina A y ácido bongkrékico, fueron

## *Material y Métodos*

obtenidos de Sigma Chemical Co. Los antioxidantes Trolox, N-acetil-L-cisteína (NAC) y Tocoferol (vitamina E) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

Los sustratos específicos utilizados para determinar la actividad caspasa -3/-7 DEVD-*p*NA (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina), caspasa-8 IETD-*p*NA (N-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilina) y caspasa-9 LEHD-*p*NA (N-acetil- Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilina) fueron obtenidos de Sigma, y la paranitroanilina (*p*NA) fue obtenida de Calbiochem.

La acrilamida (bis N,N'-metilen-bis-acrilamida), persulfato amónico, TEMED (N,N,N,N,-tetrametil-etilendiamina), SDS (dodecil sulfato sódico) y los marcadores de pesos moleculares se obtuvieron de Bio-Rad. El azul de bromofenol, el BSA (albúmina de suero bovino) y el  $\beta$ -mercaptoetanol fueron de Sigma. Las membranas (PVDF) y el sustrato de revelado por quimioluminiscencia se obtuvieron de Millipore (Billerica, MA, EE UU). Las placas para autorradiografía se adquirieron de Kodak.

Los productos utilizados en la obtención del lisado celular, fueron: aprotinina (inhibidor de serínproteasas que inhibe tripsina, quimiotripsina y plasmina), leupeptina (inhibidor de cisteín y serínproteasas. Inhibe plasmina, tripsina, papaína y catepsina B), pepstatina A (inhibidor potente de proteasas ácidas), PMSF (inhibe cisteín, serínproteasas y acetilcolinesterasa), ditioneitol (DTT: agente reductor estereoselectivo para puentes disulfuro en complejos moleculares), ortovanadato sódico (inhibidor de fosfatasas alcalinas) y el detergente tritón X-100 fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.

De Stressgen se obtuvieron los anticuerpos de las caspasas -3, -7, -8, -9, citocromo *c* y PARP. De Cell Signaling Technology se obtuvieron los anticuerpos de

las caspasas -3, -7, -8, -9, fosfo-p38<sup>MAPK</sup> (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>), p38<sup>MAPK</sup>, fosfo-JNK (Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>), JNK/SAPK, fosfo-ERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) y ERK1/2. De Medical and Biological Laboratories Co se obtuvieron los anticuerpos de las caspasas- 4, -6, y -7. De BD Biosciences se obtuvieron los anticuerpos de las caspasa-4, -6, -8, Bid, Bax, Bcl-x<sub>L</sub>, citocromo *c*, Smac/DIABLO y AIF. El anticuerpo de Bcl-2 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology y el anticuerpo de β-actina, de Sigma/Aldrich. Los anticuerpos secundarios se obtuvieron de Amersham Biosciences.

El agua desionizada y bidestilada se obtuvo con un equipo Mili-Q (Water Purification System, Millipore Ibérica, Madrid, Spain). El dimetilsulfóxido (DMSO), EDTA, EGTA, NaCl, glicerol, trizma base, trizma-HCl, azida sódica, bromuro de 3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la sacarosa, tween 20, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico y otros compuestos utilizados en la preparación de reactivos y tampones se adquirieron de Sigma Chemical Co. o de BDH (Carlo Erba, E Merck y Fluka).

### **3.3. Modelo experimental.**

Las células se contaron en un hematocitómetro y la viabilidad siempre fue superior al 95% utilizando el método de exclusión de azul de tripán.

*3.3.1. Cultivo de células leucémicas humanas HL-60 y Molt-3, y células de linfoma histiocítico humano U937.*

Las células HL-60, Molt-3 y U937 se obtuvieron de la colección alemana o americana de cultivos celulares (DSMZ y ATCC) y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomycin) en una atmósfera humidificada (37 °C y 5% CO<sub>2</sub>) y a una densidad no superior a 0,5 x 10<sup>6</sup>

## *Material y Métodos*

células/ml [71,72]. A las células se les cambió el medio de cultivo tres veces por semana y se dividieron aproximadamente cada 24 horas.

### *3.3.2. Cultivo de células de melanoma humanas SK-MEL-1.*

Las células de melanoma humano SK-MEL-1 se obtuvieron de la colección alemana de cultivos celulares (DMSZ), se cultivaron en medio RPMI 1640 en las mismas condiciones que las anteriores. Aunque las células crecen lentamente producen sin embargo una rápida acidificación del medio por lo que el medio de cultivo se cambió tres veces por semana [71,72].

### *3.3.3. Cultivo de células MCF-7.*

Las células de cáncer de mama humano MCF-7 se obtuvieron de la ATCC y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, 2 mM L-glutamina y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomina)

### *3.3.4. Cultivo de células HL-60 transfectadas con el gen humano Bcl-xL y con el vector control, y de células U937 que expresan niveles elevados del gen humano Bcl-2.*

Las células HL-60 fueron transfectadas con el plásmido pSFFV-neo (HL-60/neo) o con el plásmido pSFFV-Bcl-xL (HL-60/Bcl-xL) que fueron establecidos por el Dr. Kapil N Bhalla (Medical College of Georgia Cancer Center, GA, EEUU) y fueron obtenidas por donación de la Dra. Angelika Vollmar (Departamento de Farmacia, Universidad de Munich, Alemania). Las células HL-60/Bcl-xL y HL-60/neo fueron cultivadas igual que en el caso de las células HL-60, añadiendo 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y 1 mM de piruvato de sodio (Invitrogen) al medio de cultivo. Además añadimos gentamicina (1 mg/ml) al medio de cultivo cada

quinto pase, y las células con gentamicina no fueron empleadas para los experimentos.

Las células U937/Bcl-2 fueron proporcionadas por la Dra. Jacqueline Bréard (INSERM U749, Faculté de Pharmacie Paris-Sud, Châtenay-Malabry, Francia). Las células se cultivaron en RPMI 1640 con glutamax y 25 mM de HEPES, 1% MEM piruvato de sodio, complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 100 unidades /ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina, en una atmósfera humidificada a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. A las células se les cambió el medio de cultivo tres veces por semana y se duplicaron cada 24 horas [71,72].

#### *3.3.5. Células mononucleares de sangre periférica de origen humano.*

Las células mononucleares de sangre periférica de origen humano (PBMC) fueron aisladas de sangre obtenida de voluntarios sanos, recogidas en tubos heparinizados para evitar la coagulación y se aislaron mediante centrifugación con Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences). Una parte de las PBMCs obtenidas se estimularon con fitohemaglutinina (PHA, 2 µg / ml) durante 48 h antes del tratamiento experimental.

#### *3.3.6. Tratamiento con los compuestos.*

Los productos se prepararon a una concentración de 10-100 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y las alícuotas se mantuvieron a -20°C. Las diluciones necesarias se hicieron en medio de cultivo justo antes del experimento y el porcentaje de DMSO no excedió del 0,3%, concentración no tóxica para las células. La misma proporción de DMSO fue añadida a las células control.

### **3.4. Métodos:**

#### *3.4.1. Evaluación de la citotoxicidad in vitro y estudios de la proliferación celular: MTT.*

Se realizó, mediante el ensayo de la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la actividad deshidrogenasa mitocondrial [73].

Las células se cultivaron en placas de 96 pocitos, por triplicado, a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocito en 0,2 ml de medio de cultivo y en presencia de diferentes concentraciones de los flavonoides y/o diterpenoides durante 72 h. Las placas se centrifugaron (500 g, 10 min) a temperatura ambiente y el medio se eliminó por aspiración. A cada pocito se le añadió 100  $\mu$ l de MTT (0,5 mg/ml en medio de cultivo con antibiótico pero sin suero) y las placas se incubaron durante 4 h a 37°C. La reacción se paró añadiendo 100  $\mu$ l de SDS (20%) con HCl 0,02 N e incubando la mezcla hasta la mañana siguiente. La cuantificación de la conversión del MTT (amarillo) en su forma reducida (púrpura) por la deshidrogenasa mitocondrial se determinó a 570 nm en un lector de microplacas (modelo 680 Bio-Rad) utilizando como blancos pocitos sin células a los que se les añadió medio. Los datos se analizaron con el programa informático Prism 2.0 (GraphPad) y se determinó la concentración de producto que inhibe el crecimiento celular a la mitad (IC<sub>50</sub>) [74].

#### *3.4.2. Tinción con el fluorocromo bisbenzimidida.*

Método cuantitativo, basado en la capacidad del fluorocromo para unirse al ADN, permitiendo visualizar la existencia de cambios morfológicos del núcleo como son la condensación de la cromatina y su compactación a lo largo de la periferia del núcleo y la segmentación del núcleo. Una vez finalizados los tratamientos, las células



( $\sim 5 \times 10^5$ ) se lavaron con PBS (10 mM fosfato sódico, 150 mM NaCl, pH 7,4) y se fijaron con 70  $\mu$ l de paraformaldehído (3% en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron (12.000 g, 1 minuto), se eliminó el paraformaldehído y las células se tiñeron con 20  $\mu$ l de una disolución que contenía 20  $\mu$ g/mL de bisbenzimidida (Hoechst 33258) en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Una alícuota (10  $\mu$ l) se fijó en un porta y se analizó la morfología nuclear de 500 células con un microscopio de fluorescencia (Zeiss-Axiovert). Se consideraron células apoptóticas aquellas cuyos núcleos presentaron condensación de la cromatina, su compactación a lo largo de la periferia y/o la fragmentación nuclear en tres o más cuerpos apoptóticos [71].

#### *3.4.3. Fragmentación del ADN.*

Método cualitativo, basado en la detección de la fragmentación internucleosómica del ADN y visualización como una escalera discontinua de bandas multiméricas de 185-200 pares de bases, características del proceso apoptótico. Las células ( $5 \times 10^5$  células/ml) después de ser tratadas se recolectaron por centrifugación (12.000 g, 1 minuto) y se lavaron dos veces con PBS frío. Las células se resuspendieron con 30  $\mu$ l de tampón de lisis [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,5% SDS] y se incubaron sucesivamente con 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de RNasa A (1 hora a 37 °C) y con 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de Proteinasa K (1 h a 50 °C). Se añadió a cada muestra 2  $\mu$ l de azul bromofenol (0,25%) y el ADN se extrajo con 100  $\mu$ l de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). Las muestras se centrifugaron (12.000 g, 1 min.) a temperatura ambiente y la fase acuosa (azul) se lavó nuevamente con 100  $\mu$ l de cloroformo. A las muestras se les añadió 5  $\mu$ l de tampón de carga (10 mM EDTA, pH 8,0, conteniendo 1% (p/v) de agarosa de bajo punto de fusión y 40% de

## *Material y Métodos*

sacarosa) y se incubaron a 70 °C durante 5-10 minutos. Finalmente 30 µl de cada muestra se sometieron a electroforesis (5 V/cm) durante 3-4 h en geles de agarosa al 1,8 %. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 µg/ml durante 20 min), los fragmentos de ADN se visualizaron a 260 nm en un transiluminador y la imagen se capturó con una cámara digital (DC290, Kodak) y se analizó con el software Quantity One (Bio-Rad).

### *3.4.4. Cuantificación de células hipodiploides por citometría de flujo.*

#### *Cuantificación de la fracción SubG<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M mediante el análisis del contenido en ADN.*

Método cuantitativo basado en la fluorescencia emitida por diferentes fluorocromos capaces de unirse al ADN (Ej. yoduro de propidio). Se puede detectar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular en función de su contenido en ADN. Las células en fase G<sub>1</sub> forman el primer pico, en la fase S las células están sintetizando ADN y en fase G<sub>2</sub>/M las células presentan el doble de contenido en ADN que una célula normal y aparecerán como un segundo pico. Las células que contienen ADN hipodiploide (menor contenido de ADN que el contenido diploide de las células normales) son consideradas apoptóticas, y se localizan a la izquierda del pico G<sub>1</sub> constituyendo la fracción SubG<sub>1</sub> [71].

Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron durante al menos una hora en etanol al 70 %, a -20 °C. A continuación se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se incubaron con 1 ml de PBS (1 h a 37 °C en oscuridad) conteniendo 100 µg/ml de RNasa A y 50 µg/ml de yoduro de propidio. La sonda fue excitada a 488 nm y la fluorescencia emitida por el complejo propidio-ADN (617 nm) se determinó en un citómetro Coulter Epics XL-

MCL, (Beckman Coulter) usando el detector FL3 (620±15 nm). Se analizaron 10.000 células en cada muestra y los resultados se analizaron con el software EXPO 32 ADC Software™ (Beckman Coulter) [74].

*3.4.5. Determinación de las células apoptóticas mediante el análisis de la externalización de fosfatidilserina.*

La fosfatidilserina es un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y se transloca a la cara externa de dicha membrana en los estadios tempranos del proceso de apoptosis. La proteína anexina V se une a fosfatidilserina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y permite detectar las células apoptóticas por citometría de flujo, previa incubación de las células con anexina V unida a un fluorocromo (FITC) [22]. De esta manera distinguimos: a) células viables, no unen anexina V y excluyen yoduro de propidio, b) células en apoptosis temprana, unen anexina V y excluyen yoduro de propidio, c) células en apoptosis tardía, unen anexina V e incorporan yoduro de propidio y d) células necróticas, unen anexina V e incorporan yoduro de propidio, o sólo incorporan yoduro de propidio. Las células ( $1 \times 10^6$  por muestra) una vez tratadas se lavaron con PBS frío, y se resuspendieron en el tampón 1X (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Se transfirieron 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión ( $1 \times 10^5$  células) a un tubo de cultivo de 5 ml, y se le añadió 5  $\mu\text{l}$  de anexina V-FITC y 5  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio. Mezclamos suavemente las células e incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) en la oscuridad. Se añadió 400  $\mu\text{l}$  del anterior tampón 1X a cada tubo, y se analizó cada muestra por citometría de flujo.

## *Material y Métodos*

Cuando las células en cultivo sufren apoptosis, al no poder ser fagocitadas, sufren necrosis secundaria al proceso apoptótico, por lo que puede aumentar el número de células que dan positivo a yoduro de propidio.

### *3.4.6. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).*

Para el procesado de muestras en microscopía electrónica de transmisión, las células se centrifugaron, se resuspendieron y se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en tampón fosfato (0,1M, pH 7,2) durante 24 horas. La post-fijación se realizó en OsO<sub>4</sub> al 1% en tampón fosfato. Las células se deshidrataron con una serie de concentraciones crecientes de etanol. El sedimento se incluyó en resina EMBED 812 que polimerizó a 70 °C. Los cortes fueron realizados con un ultramicrotomo Reichert Ultracut s (Leica). Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina, mientras que los ultrafinos fueron contrastados con acetato de uranilo y plomo. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 910 (Carl ZEISS, Germany) equipado con cámara digital Proscan Slow-scan CCDCamera para MET (Fa. Proscan Elektronische Systeme GmbH, Alemania) y software Soft Imaging System (Alemania) del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

### *3.4.7. Determinación de la actividad caspasa.*

Las células tratadas se centrifugaron a 1.000 g durante 5 min a 4 °C, se lavaron con PBS y se incubaron en hielo. Las células se resuspendieron en tampón de lisis (50 mM HEPES, pH 7,4, 1 mM ditioneitol, 0,1 mM EDTA, 0,1% Chaps) y se dejaron 5 min en hielo. Se centrifugaron durante 10 min at 16.000 g a 4 °C, se determinó la concentración de proteínas en los sobrenadantes mediante el método de Bradford [75] y se almacenaron a -20 °C hasta que se usaron para el estudio de la

actividad enzimática de las caspasas. Se utilizó una cantidad equivalente de proteínas de los diferentes tratamientos (~20 µg). El incremento de la absorbancia a 405 nm después de la incubación a 37 °C durante 1 hora fue indicativo de la actividad enzimática de las caspasas. El sustrato colorimétrico específico utilizado en el ensayo para la actividad caspasa -3/-7 DEVD-*p*NA (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilina), caspasa-8 IETD-*p*NA (N-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilina) y caspasa-9 LEHD-*p*NA (N-acetil- Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilina).

#### *3.4.8. Inmunodetección de proteínas. Transferencia Western.*

Las células (1-10 x 10<sup>6</sup>) se incubaron en medio de cultivo con los productos de interés durante distintos tiempos a 37 °C. A continuación se recolectaron por centrifugación (500 g, 10 minutos, 4 °C) y se lavaron dos veces con PBS. En este punto, las células se procesaron de distinta forma: en función de si se necesitaba el lisado celular o las diferentes fracciones subcelulares (fracción nuclear, citosólica y mitocondrial).

*Obtención del lisado celular total:* El precipitado celular se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis [Tris-HCl (pH 7,4), 2 mM EDTA, 137 mM cloruro sódico, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 2 mM de pirofosfato de sodio, 20 mM glicerofosfato de sodio, 10 mM fluoruro sódico, 2 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, leupeptina (5 µg/ml), aprotinina (5 µg/ml) y pepstatina A (5 µg/ml)] e incubó durante 15 min a 4 °C. Los lisados se sonicaron (cuatro ciclos de cinco segundos) y se centrifugaron a 11,000 x g durante 10 min a 4 °C. El precipitado resultante (membranas y demás restos celulares) se descartó, mientras el sobrenadante se analizó [71,72].

## *Material y Métodos*

*Fraccionamiento subcelular:* El precipitado celular ( $\sim 10^7$  células) se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón de homogeneización [20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa] con inhibidores de proteasas (0,1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml de leupeptina, 10  $\mu$ g/ml aprotinina y 10  $\mu$ g/ml pepstatina A), y se incubó durante 15 min a 4 °C. Las células se lisaron usando una aguja de 21G y el extracto resultante se centrifugó a 1.000 x g durante 5 min a 4 °C. El precipitado (fracción nuclear) se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón de homogeneización y se sonicó 3 veces durante 10 segundos a 4 °C. El sobrenadante resultante se centrifugó a 22.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El precipitado (fracción mitocondrial) se resuspendió en 50  $\mu$ l de tampón de homogeneización mientras que el sobrenadante fue utilizado como fracción citosólica. Las diferentes fracciones se congelaron a -20 °C hasta su utilización [71].

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, y todas las muestras se ajustaron a la misma concentración utilizando el tampón anterior. Los lisados celulares se hirvieron en tampón de electroforesis [50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 15% sacarosa, 2 mM EDTA, 3% SDS, 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 0,01% azul de bromofenol] a 100 °C durante 5 min [71].

Las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (del 7,5% al 15%, dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar) conteniendo 0,1% SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con 10% de leche desnatada en tampón TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20] durante 1 h a temperatura ambiente (o toda la noche a 4 °C), seguido de una incubación con el anticuerpo específico. Los anticuerpos utilizados en este estudio se diluyeron en TBST conteniendo 3% de leche desnatada y las

membranas se incubaron en presencia del anticuerpo de interés, durante 24 h con agitación suave y a 4 °C. Las membranas se lavaron con TBST tres veces durante 15 min cada vez y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se lavaron nuevamente con TBST en las mismas condiciones anteriores y la detección de las proteínas específicas se determinó por emisión de quimioluminiscencia, utilizando un kit comercial y posterior exposición de las membranas sobre películas de autorradiografía. Las imágenes fueron capturadas con un escáner y analizadas con el programa Adobe Photoshop 7.0. Como control de que se ha cargado y transferido la misma cantidad de proteínas, las distintas muestras se analizaron con un anticuerpo específico anti- $\beta$ -actina.

*3.4.9. Determinación de la generación de especies reactivas de oxígeno intracelular.*

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular se midió fluorimétricamente usando la sonda diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína (H<sub>2</sub>-DCFDA). Las células fueron expuestas a los tratamientos correspondientes y se incubaron con 8  $\mu$ M de H<sub>2</sub>-DCF-DA durante los últimos 30 minutos antes de finalizar el ensayo, a 37 °C. Inmediatamente después, las muestras se analizaron mediante citometría de flujo con el equipo Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter), excitando la sonda con un láser de argón a 488 nm y recogiendo la emisión fluorescente de la diclorofluoresceína (529 nm), con el detector FL1 (525 $\pm$ 20 nm). La distinta intensidad de la emisión fluorescente indica la mayor o menor presencia de ROS en el interior de la célula. Los resultados se analizaron con el EXPO32 ADC Software<sup>tm</sup> (Beckman Coulter) [76].

## Material y Métodos

### 3.4.10. Análisis de la despolarización de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).

Las células HL-60 ( $1 \times 10^6$  células) se incubaron a 37 °C en la oscuridad, con la sonda JC-1 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante los últimos 30 minutos antes de finalizar el ensayo y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el canal FL1 (527 nm) para detectar la fluorescencia verde de los monómeros de la sonda y el canal FL2 (590 nm) para la fluorescencia roja de los agregados. La cuantificación de la despolarización mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) se obtuvo a partir de la representación gráfica de los datos recogidos por el detector FL1 frente a los recogidos por el detector FL2. La división de las gráficas en cuadrantes permite estimar el porcentaje de células con potencial de membrana intacto (cuadrantes superiores) de aquellas que sufren despolarización mitocondrial (cuadrantes inferiores).

El ionóforo de protones *m*-clorofenil hidrazona de carbonil cianuro (CCCP) se utilizó como control positivo de la disipación del potencial de membrana. La despolarización de la membrana mitocondrial inducida por CCCP (10  $\mu\text{M}$ ) se ve reflejada por un incremento del número de células que emiten mayor fluorescencia verde y menos roja respecto a las células control y que se sitúan en el cuadrante inferior derecho. Para el análisis se usó un citómetro Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter).

### 3.5. Métodos estadísticos.

En todos los casos las determinaciones para cada grupo experimental se realizaron por triplicado o cuadruplicado, y los valores representados se corresponden a datos de tres experimentos como mínimo (Media  $\pm$  S.E.M). La comparación entre los distintos tratamientos se realizó por el método de la *t* de Student o análisis de la varianza, considerando significativos los valores de  $P < 0,05$ .



# CAPÍTULO I

---

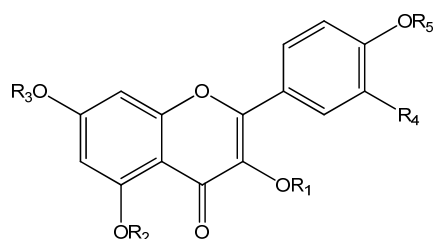
*Evaluación de la actividad antiproliferativa del  
heptaacetato de astragalina (AHA)*



## RESULTADOS

### **4.1. Los derivados semisintéticos de la quercetina y kaempferol inhiben el crecimiento y la viabilidad de la línea celular de leucemia humana HL-60.**

En esta Tesis hemos evaluado la potencial actividad antitumoral de nueve derivados semisintéticos de glicósidos de la quercetina y el kaempferol (Tabla 1). Los datos de los estudios antiproliferativos (Tabla 2) indican que el derivado semisintético compuesto 6 (heptaacetato de astragalina, AHA) presenta el valor más bajo de  $IC_{50}$  (Figura 7 A, B). Por el contrario, 2''-acetilastragalina (Compuesto 1, NA-AHA) que se encuentra en naturaleza no es efectiva como un agente antiproliferativo, ya que presenta un valor de  $IC_{50}$  superior a 100  $\mu$ M en las células de leucemia (Tabla 2 y Figura 7 B). Como experimento control usamos células mononucleares de sangre periférica (PBMC) quiescentes y PBMC cultivados en presencia de un agente inductor de la proliferación (PHA, fitohemaglutinina, 2  $\mu$ g/ml). Los resultados indican que AHA no es citotóxico hasta una concentración de 30  $\mu$ M durante 24 h en los linfocitos quiescentes y hasta 10  $\mu$ M en los linfocitos proliferantes (Figura 7 C).



Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
1	Glc 2''-Ac	H	H	H	H
2	Glc-Ac	Ac	Glc-Ac	H	Ac
3	Glc-Ac	Ac	Glc-Ac	OAc	Ac
4	Glc-Ac	Ac	Rha-Ac	OAc	Ac
5	Glc-Ac	Ac	H	H	Ac
6	Glc-Ac	Ac	Ac	H	Ac
7	Glc-Ac	Ac	Ac	OAc	Ac
8	Glc	H	RhaAc	H	H
9	Glc 2''Ac	H	Rha	OH	H

Tabla 1. Estructura de los flavonoides evaluados. Glc = Glucosa, Rha = Ramnosa, Ac = Acetato.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)
1	>100	6	8,9±2,4
2	>100	7	10,3±2,7
3	>100	8	39,3 ±12,6
4	20,8±7,0	9	>100
5	23,3±1,5		

Tabla 2. Efectos de los derivados de la fenilbenzo-γ-pirona sobre el crecimiento de células HL-60. Las células se cultivaron durante 72 horas y el valor de la IC<sub>50</sub> (μM) se determinó mediante el ensayo colorimétrico MTT como se describe en la sección de Material y Métodos. Los datos representan la media ± S.E.M. de 3-5 experimentos independientes con tres determinaciones cada uno.

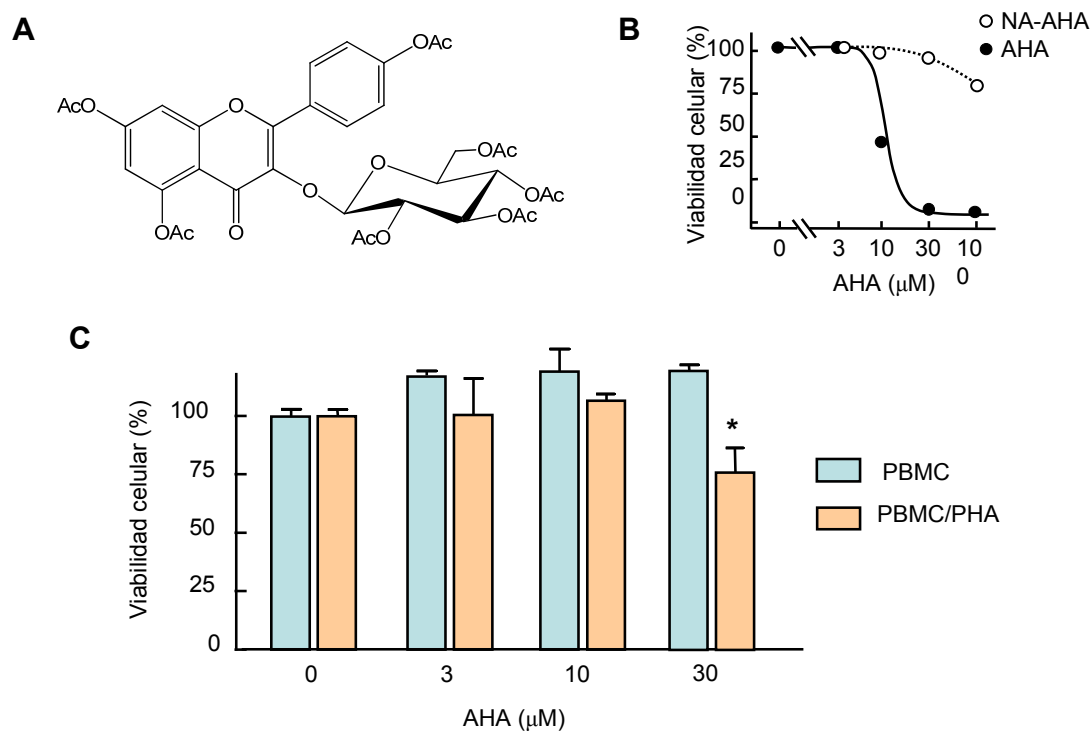


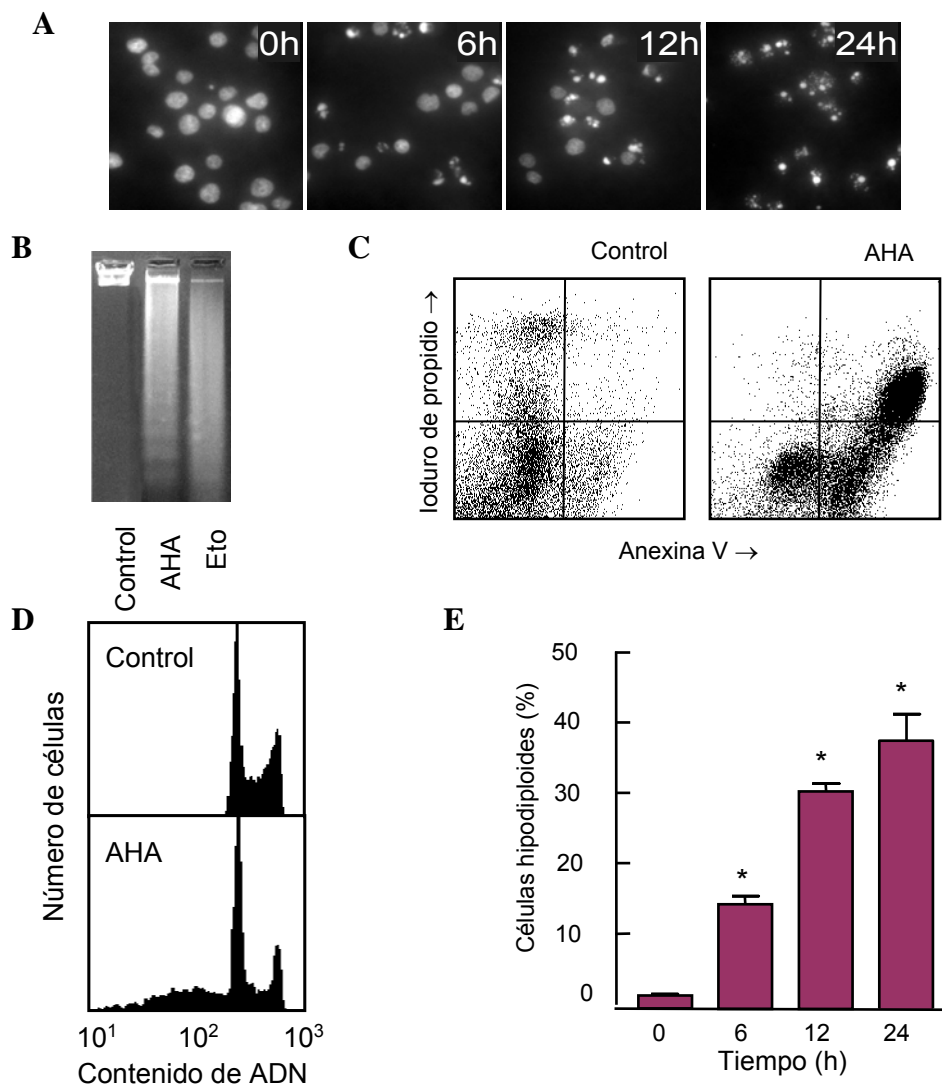
Figura 7. (A) Estructura química de AHA. (B) Efecto de AHA sobre la viabilidad celular de HL-60 determinado por el método de MTT. Se muestran los valores de un experimento representativo en el que cada punto representa la media de tres determinaciones. (C) Efecto de AHA sobre la proliferación de células mononucleares humanas de sangre periférica. Se cultivaron células quiescentes PBMC y células PBMC activadas con fitohemaglutinina (PHA) en presencia de las concentraciones indicadas de AHA durante 24 h. Los valores representan la media  $\pm$  SE de tres determinaciones. \* $P < 0,05$  significativamente diferente del control.

#### 4.2. AHA induce apoptosis en células de leucemia mieloide humana.

Para evaluar si la apoptosis está implicada en el efecto citotóxico de AHA en las células de leucemia mieloide humana HL-60, utilizamos una serie de métodos complementarios. Hemos estudiado si AHA induce cambios morfológicos característicos de la muerte celular apoptótica mediante microscopía de fluorescencia utilizando el fluorocromo trihidrocloruro de bisbencimida. Las células expuestas a AHA presentan condensación y fragmentación de la cromatina detectables ya después de 6 h de tratamiento (Figura 8 A).

El análisis de ADN por electroforesis en gel de agarosa, muestra un patrón de fragmentación típico (hidrólisis de cromatina internucleosómica) en las células tratadas con AHA, confirmando el efecto sobre la inducción de la apoptosis (Figura 8 B). Además, AHA induce la externalización de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática determinada por citometría de flujo después de la tinción con Anexina V-FITC (Figura 8 C).

Para estudiar el efecto de AHA sobre el ciclo celular las células se incubaron con AHA y se analizaron por citometría de flujo después de la tinción con yoduro de propidio (Figura 8 D). El tratamiento causó una detención de ~ 56% de células en fase  $G_0 - G_1$  (comparado con ~ 46% en las células controles) que fue acompañada con una disminución de la cantidad de células en las fases S y  $G_2 - M$ . El porcentaje de las células controles en fase S y  $G_2 - M$  fue de ~23% y 31%, respectivamente, y disminuyó después del tratamiento con AHA durante 24 h en ~18% y 24%, respectivamente. La cuantificación de las células hipodiploides (Figura 8 E) muestra que el porcentaje de las células apoptóticas aumentó 15%, 31% y 39% en respuesta al tratamiento de AHA después de 6, 12 y 24 h, respectivamente.



*Figura 8. Efecto de AHA sobre la inducción de la apoptosis en células HL-60. (A) Microfotografías de campos representativos de células teñidas con bisbenzimidazoles para evaluar la condensación de la cromatina nuclear después del tratamiento con 30  $\mu$ M AHA. (B) Evaluación de la fragmentación del ADN. Las células se trataron con 30  $\mu$ M AHA durante 24 h. Eto = etopósido 3 $\mu$ M. (C) Análisis por citometría de flujo de células HL-60 teñidas con anexina V y yoduro de propidio después del tratamiento con 30  $\mu$ M de AHA durante 24 h. (D) Las células fueron tratadas con 30  $\mu$ M de AHA durante 24 h, teñidas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. La apoptosis fue cuantificada (E) como porcentaje de las células en la región sub-G<sub>1</sub>. Los valores representan medias  $\pm$  SE de tres experimentos independientes cada uno hecho por triplicado. \* $P$ <0,05 significativamente diferente del control.*

### **4.3. AHA induce la muerte celular mediada por la activación de caspasas.**

Para determinar si las caspasas están implicadas en la respuesta de las células HL-60 a AHA, las células se trataron con diferentes concentraciones del flavonoide y se analizaron mediante transferencia Western (Figura 9 A). Los resultados indican que AHA estimula la hidrólisis de las pro-caspasas-3, -6, -7 y -9, pero no se detectó el procesamiento proteolítico de la pro-caspasa-8. De acuerdo con este resultado se detectó, también, la hidrólisis del sustrato de caspasa-3, PARP [poli(ADP-ribosa)polimerasa], proteína implicada en la reparación de ADN y que da lugar a un fragmento de 85 kDa. También evaluamos si AHA induce el procesamiento y la activación de la caspasa-4, que está involucrada en el estrés del retículo endoplasmático, y detectamos una reducción significativa de la pro-caspasa-4 después de 24 h de tratamiento.

Ya que el procesamiento de caspasas no siempre está relacionado con su activación, evaluamos la actividad enzimática utilizando DEVD-*p*NA y LEHD-*p*NA, sustratos específicos de las caspasas-3/-7 y -9, respectivamente. Como se muestra (Figura 9 B), la caspasa -3/-7 se activa significativamente en los extractos de células tratadas con AHA, mientras caspasa-9 presenta menor activación, lo que es consistente con su papel como caspasa iniciadora.

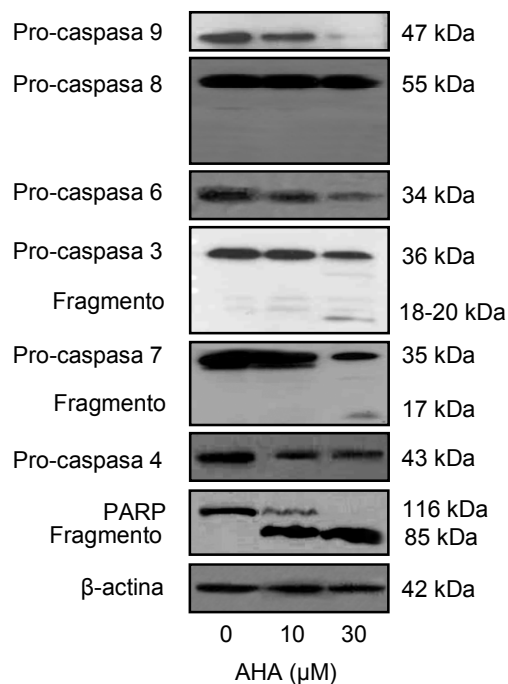
Para confirmar que las caspasas están involucradas en la apoptosis inducida por AHA, se examinaron los efectos de dos inhibidores generales de caspasas. El inhibidor z-VAD-fmk redujo significativamente el número de células hipodiploides (Figura 9 C) y el inhibidor Q-VD-Oph bloqueó la fragmentación de ADN (Figura 9 D), lo que indica que la muerte celular es dependiente de caspasas. Para indentificar qué caspasas son importantes, se estudiaron los efectos de inhibidores de caspasas



específicos z-LEHD-fmk (inhibidor de caspasa-9), z-DEVD-fmk (inhibidor de caspasa-3/-7) y z-LEVD-fmk (inhibidor de caspasa-4). El pretratamiento de las células con z-LEVD-fmk redujo significativamente el porcentaje de células hipodiploides, mientras z-LEHD-fmk y z-DEVD-fmk no tuvieron efecto (Figura 9 E).

Ya que z-VAD-fmk no bloqueó completamente la muerte celular inducida por AHA, es posible que exista un mecanismo alternativo. En este sentido, existen evidencias de que las catepsinas lisosomales pueden estar implicadas en las etapas tempranas de la muerte celular programada dependiente e independiente de caspasas. Hemos demostrado (Figura 9 E) que el inhibidor de catepsina B/L, Mu-Phe-HPh-fmk, redujo el porcentaje de células hipodiploides, lo que indica que esta cisteín-proteasa puede estar involucrada en la muerte celular inducida por AHA.

**A**



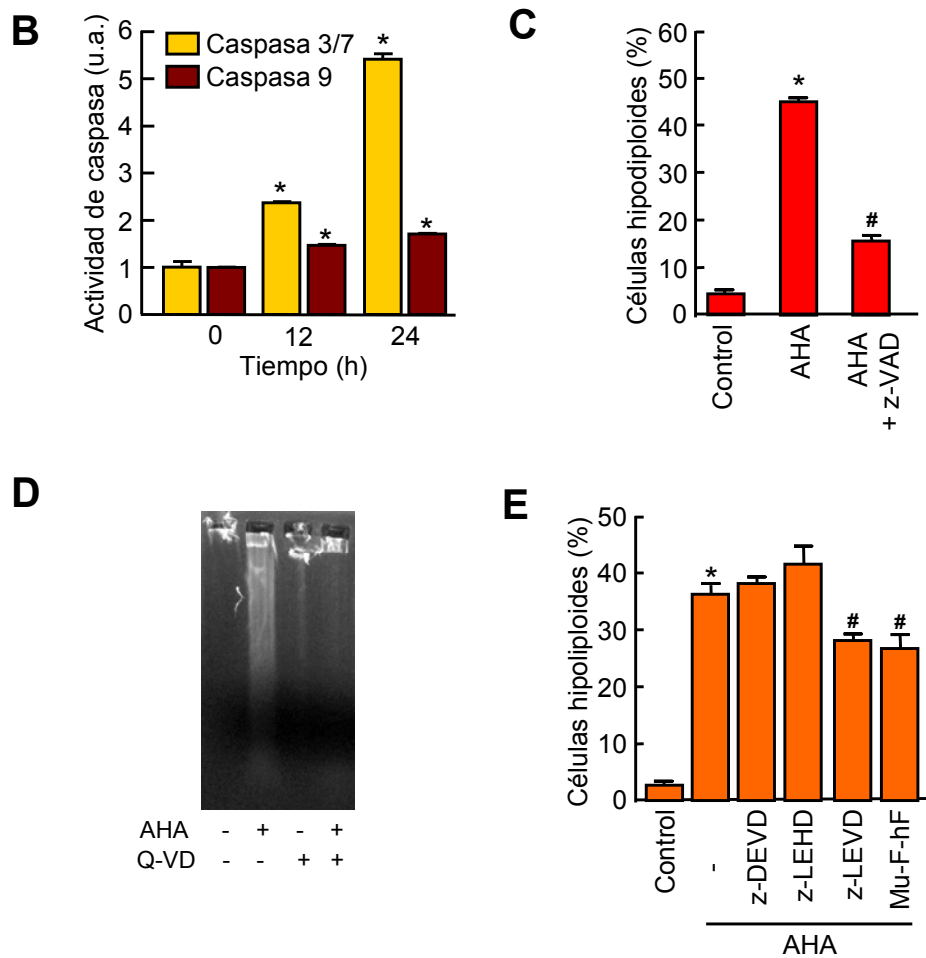


Figura 9. Evaluación de la activación de caspasas en células HL-60. (A) Las células se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de AHA durante 24 h. Los extractos celulares se analizaron por transferencia Western y la  $\beta$ -actina fue usada como control de carga. (B) Cinética de la activación de caspasas en respuesta al tratamiento con AHA. Los resultados se expresan en incrementos de actividad comparada con el control. (C) Efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk sobre el porcentaje de células hipodiploides. (D) Efecto del inhibidor de caspasas Q-VD-OPh sobre la fragmentación de ADN inducida por AHA (E) Efecto de los inhibidores de caspasas y catepsinas B/L sobre apoptosis. Las células se incubaron con el inhibidor correspondiente durante 1 h y después con AHA durante 24 h. \* $P < 0,05$  significativamente diferente del control. # $P < 0,05$  significativamente diferente del tratamiento con AHA.

#### **4.4. La mitocondria desempeña un papel importante en la muerte celular inducida por AHA.**

Para determinar si AHA induce la liberación de citocromo *c*, examinamos los lisados citosólicos de las células tratadas con 30  $\mu$ M de AHA durante 6, 12 y 24 h por transferencia Western (Figura 10 A). Los resultados muestran un aumento significativo de la cantidad de citocromo *c* en el citosol después de 6 h de tratamiento.

AHA induce la hidrólisis de Bcl-2, el aumento de la expresión de Bax y la reducción de Bcl-x<sub>L</sub> (Figura 10 B). Además, la expresión de niveles elevados de Bcl-x<sub>L</sub> disminuye el efecto citotóxico de AHA (Figura 10 C).

Para examinar si la disipación del potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) es necesaria para la liberación de citocromo *c* inducida por AHA, las células se tiñeron con JC-1 y se analizaron por citometría de flujo (Figura 10 D). Como podemos observar, el  $\Delta\Psi_m$  se mantuvo hasta 12 h de tratamiento y disminuyó solo después de 24 h, lo que sugiere que la disipación del  $\Delta\Psi_m$  no es un evento temprano de la apoptosis inducida por AHA. De acuerdo con estos resultados, los inhibidores de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP), ciclosporina A (CsA) y ácido bongkrékico (BA), no tuvieron efecto en la apoptosis inducida por AHA (Figura 10 E).

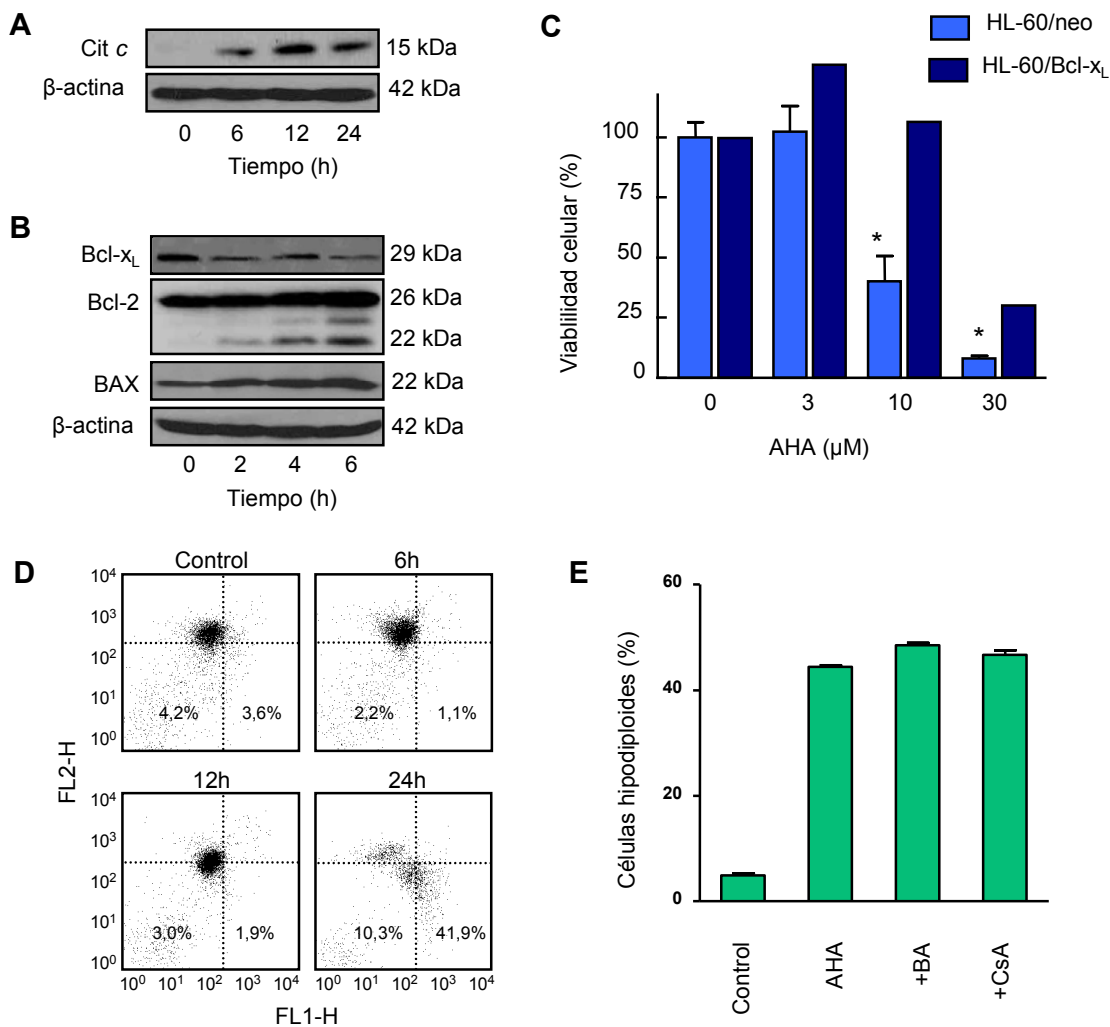


Figura 10. Importancia de la mitocondria en la apoptosis inducida por AHA. Efecto de AHA sobre la liberación de citocromo c (A) y las proteínas de la familia Bcl-2 (B) determinado por transferencia Western. (C) Efecto de AHA sobre la proliferación de células HL-60/neo y HL-60/Bcl-x<sub>L</sub> estudiado por el método de MTT. (D) Efecto de AHA sobre el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Las células teñidas con JC-1 se analizaron por citometría de flujo. (E) Efecto de los inhibidores de PTP sobre la apoptosis inducida por AHA. Las células se incubaron con ácido bongkrékico (BA 50  $\mu$ M) y ciclosporina A (CsA 25  $\mu$ M) durante 1 h y después con AHA 30  $\mu$ M durante 24 h, y se analizaron por citometría de flujo.

#### 4.5. AHA activa las proteínas quinasas activadas por mitógenos MAPKs.

Puesto que las proteínas quinasas ERK, JNK/SAPK y p38<sup>MAPK</sup> desempeñan un papel crítico en el destino de la célula, evaluamos el efecto de AHA sobre la activación de estas proteínas quinasas hasta 6 h, ya que el compuesto produce los efectos citotóxicos significativos a tiempos más prolongados. Los resultados demuestran que este flavonoide induce una fosforilación rápida (2 h) de todas las MAPKs ensayadas. Tanto P-JNK/SAPK como P-p38<sup>MAPK</sup> permanecieron fosforiladas durante al menos 6 h, mientras que la fosforilación de ERK1/2 presentó un comportamiento bifásico (Figura 11 A). De este modo, las cinéticas de activación de ERK1/2, JNK/SAPK y p38<sup>MAPK</sup> inducidas por AHA (30  $\mu$ M) son diferentes.

Para determinar si la fosforilación de MAPKs es crucial para la apoptosis inducida por AHA, hemos examinado el efecto de inhibidores específicos. El tratamiento de las células con U0126 y/o PD98059, inhibidores de las quinasas extracelulares activadas por mitógenos 1/2 (MEK1/2), y con SP600125, inhibidor de JNK/SAPK, aumenta la apoptosis inducida por AHA (Figura 11 B). Sin embargo, la inhibición de p38<sup>MAPK</sup> con el inhibidor específico SB203580 no tuvo efecto sobre la muerte celular inducida por AHA.

Para confirmar el efecto de los inhibidores de MEK1/2, hemos estudiado la fosforilación de ERK1/2 inducida por AHA en combinación con estos inhibidores (Figura 11 C). Como muestran los resultados, U0126 y PD98059 bloquearon completamente el efecto de AHA sobre la fosforilación de ERK1/2.

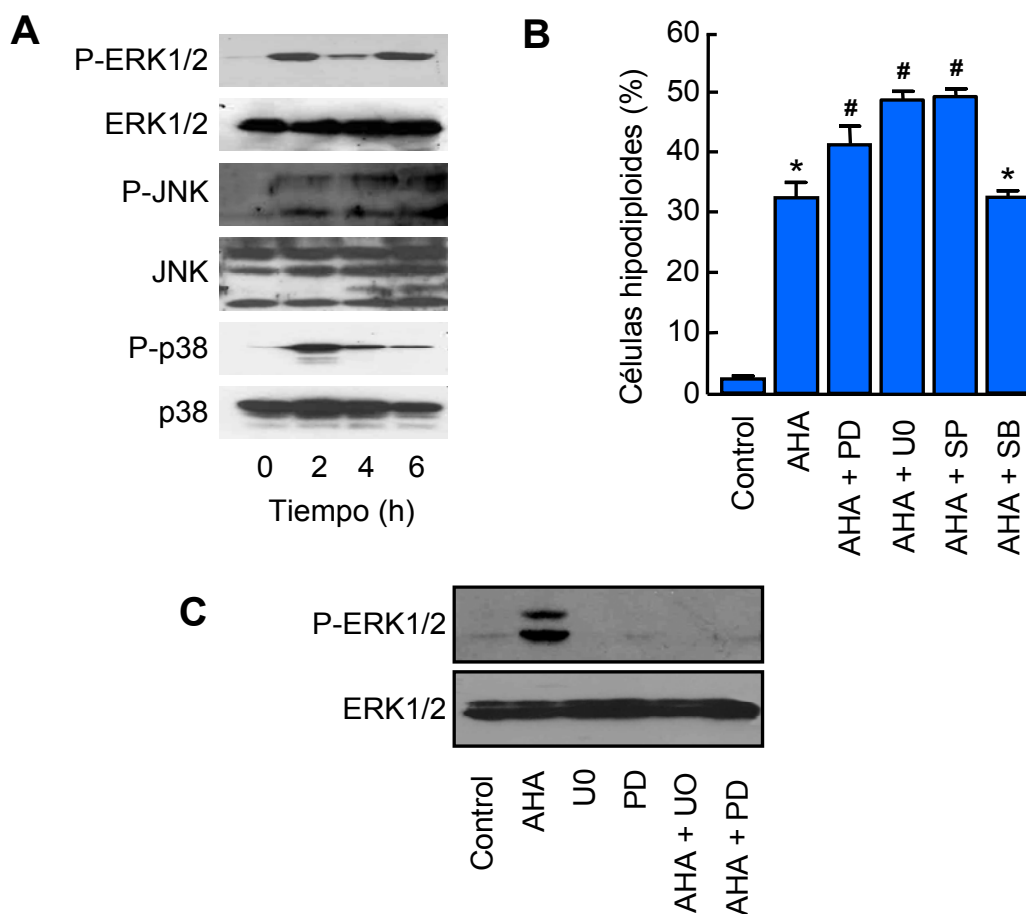


Figura 11. (A) Inducción de la fosforilación de MAPKs por AHA. Las células se trataron con AHA (30  $\mu$ M) a los tiempos indicados y los extractos de proteínas se analizaron por transferencia Western. (B) Efecto de los inhibidores de las MAPKs sobre la apoptosis inducida por AHA. Las células se incubaron con PD98059 (PD, 10  $\mu$ M), U0126 (U0, 10  $\mu$ M), SP600125 (SP, 10  $\mu$ M) y SB203580 (SB, 2  $\mu$ M) durante 1 h y después con AHA durante 24 h; las células apoptóticas se cuantificaron por citometría de flujo. (C) Efecto de los inhibidores de MEK1/2, PD98059 (PD, 10  $\mu$ M) y U0126 (U0, 10  $\mu$ M), sobre la inducción de la fosforilación de ERK1/2 por AHA. \* $P < 0,05$  significativamente diferente del control. # $P < 0,05$  significativamente diferente del tratamiento con AHA.

#### **4.6. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son necesarias para la muerte celular inducida por AHA.**

Como la producción de ROS en células de leucemia puede causar la activación de MAPKs y muerte celular [77], investigamos si la generación de ROS está involucrada en la apoptosis inducida por AHA. Para ello las células tratadas se tiñeron con H<sub>2</sub>-DCF-DA y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 12 A se detectó la generación de ROS a los 15 minutos de tratamiento.

El antioxidante *N*-acetil-L-cisteína (NAC, 10 mM) bloqueó casi completamente la muerte celular (Figura 12 B), lo que indica que la generación de ROS es crucial para la inducción de la muerte celular por AHA. El efecto protector de NAC no es una consecuencia de la reacción directa con el flavonoide ya que se observó la muerte celular incluso cuando los dos compuestos se preincubaron durante dos horas antes de añadirlos a las células (Figura 12 C).

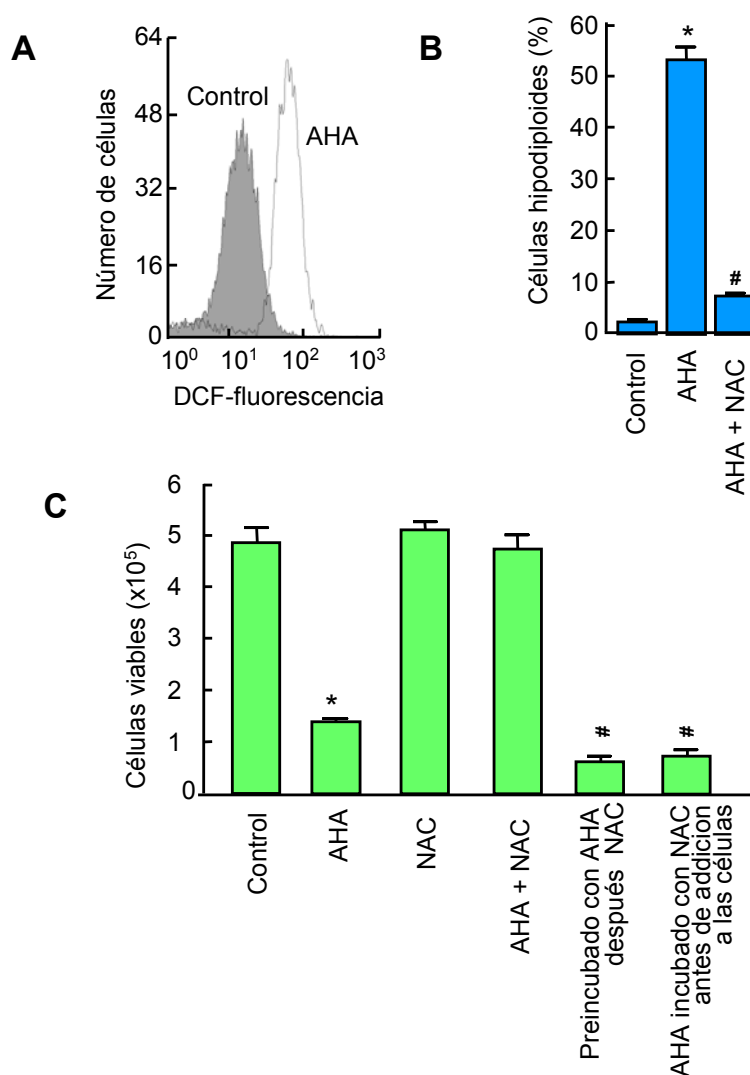


Figura 12. Importancia de la generación de ROS en la muerte celular inducida por AHA. (A) Las células se incubaron con AHA y se determinó la fluorescencia de H<sub>2</sub>-DCF oxidado por citometría de flujo. (B) Inhibición de la apoptosis por NAC en las células tratadas con AHA. Las células se incubaron con NAC durante 1 h, después con AHA durante 24 h y se analizaron por citometría de flujo. \*P<0,05 significativamente diferente del control. (C) Efecto de NAC (10 mM) sobre la muerte celular inducida por AHA. NAC se añadió 2 h antes (AHA+NAC), 2 h después de AHA (30 μM) y simultáneamente con AHA después de la incubación previa de ambos durante 2 h. La viabilidad se determinó por el método de exclusión del azul de tripán utilizando el contador TC10 de Bio-Rad. \*P<0,05 significativamente diferente del control. #P<0,05 significativamente diferente del tratamiento AHA+NAC. Los resultados similares se obtuvieron usando el método de MTT.



## DISCUSIÓN

Aproximadamente el 63% de los fármacos anticancerígenos introducidos en los últimos 25 años son productos naturales o sus derivados [2]. Los flavonoides son compuestos polifenólicos que presentan un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo aquellas que podrían ser capaces de influir en procesos que desencadenan el desarrollo del cáncer. Por tanto, pueden tener efectos beneficiosos para la salud y considerarse posibles protectores o agentes terapéuticos contra el cáncer. Las propiedades antitumorales de estos compuestos están mediadas por diferentes tipos de parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis, una forma activa de muerte celular que desempeña un papel esencial en el desarrollo y la supervivencia y es una respuesta importante a la mayoría de los agentes quimioterápicos [3].

En este estudio se evaluó la sensibilidad de las células HL-60 a nueve compuestos semisintéticos derivados de la fenilbenzo- $\gamma$ -pirona. Las células HL-60 constituyen un modelo útil para estudiar la inhibición del crecimiento de células leucémicas desencadenada por agentes químicos, físicos y fisiológicos. Los estudios anti-proliferativos indican que AHA posee propiedades citotóxicas en células HL-60, mientras las PBMC quiescentes y proliferantes son resistentes. El compuesto induce la apoptosis pero este efecto fue bloqueado por los inhibidores z-VAD-fmk y Q-VD-OPh, lo que indica que el mecanismo de la muerte celular es dependiente de caspasas. El estrés del retículo endoplasmático está implicado, ya que AHA induce el procesamiento de caspasa-4 y la apoptosis se bloqueó parcialmente con el inhibidor específico de caspasa-4.

Los estudios cinéticos indican que las actividades de las caspasas-3 y -9 aumentaron en respuesta al tratamiento con AHA. Sin embargo, el hecho de que z-

## Capítulo I

DEVD-fmk no tuviese ningún efecto indica que la muerte celular puede ocurrir en ausencia de la actividad de caspasa-3. Una posibilidad es que otras caspasas ejecutoras, como caspasa-7 o caspasa-6, contribuyan a la apoptosis inducida por AHA. Esta posibilidad está apoyada con el hecho de que z-DEVD-fmk es un inhibidor más potente de caspasa-3 que de caspasa-7 [78]. El hecho de que z-VAD-fmk no bloqueara completamente la muerte celular inducida por AHA supone la existencia de otras rutas adicionales. Varios estímulos pueden inducir la ruta lisosomal, la cual está caracterizada por la rotura parcial de la membrana lisosomal y la liberación de catepsinas al citosol [79]. Por tanto, es posible que las cisteín-proteasas catepsinas B/L pudiesen estar involucradas en el mecanismo de la muerte celular inducida por AHA.

Este flavonoide induce la liberación temprana de citocromo *c*, el procesamiento de Bcl-2, la disminución del nivel de Bcl-x<sub>L</sub> y el aumento de la cantidad de Bax. Se ha demostrado que la hidrólisis de Bcl-2 por caspasa-3 con la formación de un fragmento de 22 kDa provoca la liberación de citocromo *c* de la mitocondria [80]. Además, la expresión de niveles elevados de Bcl-x<sub>L</sub> disminuye el efecto citotóxico de AHA, lo que indica que la mitocondria juega un papel importante en la muerte celular inducida por AHA.

AHA induce la activación de JNK/SAPK y la fosforilación bifásica de ERK1/2. La inhibición de estas rutas de señalización potenció la muerte celular apoptótica inducida por AHA, lo que sugiere que estas MAPKs pueden estar implicadas como señales de supervivencia. Aunque el mecanismo por el que AHA induce la fosforilación bifásica de ERK1/2 es desconocido, una posible explicación podría ser la implicación de algunas treonina/tirosina fosfatasas de MAPK (MKPs)

con especificidad dual, cuya transcripción se activa por ERK1/2 [81]. Otra posibilidad es que la generación de ROS activada por AHA pueda inhibir las MKPs [82] y de esta manera explicar el segundo pico de la activación de ERK1/2.

El aumento de apoptosis en HL-60 cuando se bloquea la ruta de ERK1/2 parece que contradice al hecho de que la muerte celular inducida en PBMC por AHA aumenta en PBMC activadas con PHA. Una posibilidad es que AHA pueda disminuir los niveles intracelulares de glutatión, que, como ha sido demostrado [83], puede disminuir la actividad proliferativa de los linfocitos. Ya que AHA induce la generación de ROS, la respuesta predominante podría ser la disminución del nivel intracelular de glutatión reducido. Además, las ROS podrían reducir los niveles de NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido) y de esta manera interferir indirectamente en la función de la glutatión reductasa [44].

Además las ROS están implicadas en el efecto antiproliferativo de AHA ya que la preincubación con el antioxidante NAC (N-acetil-L-cisteína) bloquea la generación de ROS y la apoptosis inducida por este flavonoide en las células HL-60.

En resumen, nuestros resultados muestran que la muerte celular inducida por AHA en células HL-60 implica a las caspasas y a las catepsinas B/L, está asociada con la liberación de citocromo *c* y se inhibe por la expresión de niveles elevados de la proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub>. Además, AHA activa la ruta de MAPKs y la muerte celular es dependiente de la generación de ROS.



## CAPÍTULO II

---

*Evaluación de actividad antiproliferativa de los abietanos  
diterpénicos*



### 6.1. Los abietanos diterpénicos inhiben la viabilidad celular de líneas celulares tumorales de origen humano.

En esta Tesis hemos examinado los efectos de 30 compuestos naturales y derivados semisintéticos (Figuras 13, 14, 15) sobre la proliferación de cinco líneas celulares tumorales humanas y descubrimos que algunos de ellos presentan propiedades citotóxicas (Tabla 3). Se usaron diferentes líneas celulares para determinar la potencial especificidad de sus efectos citotóxicos. Las células de leucemia fueron elegidas porque son propensas a la apoptosis, las células SK-MEL-1 porque el melanoma es la forma más agresiva del cáncer de piel, y las células MCF-7 porque son resistentes a la apoptosis. Las líneas celulares HL-60, U937 y Molt-3 fueron más sensibles, mientras que las MCF-7 y SK-MEL-1 fueron más resistentes.

La taxodona (1) y la taxodiona (2) presentaron valores similares de  $IC_{50}$  (~1-4  $\mu\text{M}$ ) en las líneas celulares de leucemia HL-60, U937 y Molt-3, mientras que las líneas SK-MEL-1 y MCF-7 presentaron valores de  $IC_{50}$  de ~10  $\mu\text{M}$  (excepto taxodiona 2 en MCF-7 que presentó una  $IC_{50} > 30 \mu\text{M}$ ). La royleanona (3) y la 7 $\alpha$ -etoxi-royleanona (4) mostraron valores de  $IC_{50} > 30 \mu\text{M}$  en todas las líneas celulares ensayadas. El inuroyleanol (5) mostró propiedades citotóxicas en U937 ( $IC_{50} = 11,1 \mu\text{M}$ ) y fue menos potente en HL-60, mientras que el resto de las líneas ensayadas fueron resistentes a este compuesto. La coleona U (6) fue citotóxica en ambas líneas celulares HL-60 y U937, con valores de  $IC_{50}$  de  $4,1 \pm 1,8 \mu\text{M}$  y  $4,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ , respectivamente. La 2-oxocandesalvona A (7) no presentó citotoxicidad en ninguna línea celular. La teuvincenona (8) solo presentó citotoxicidad en células de leucemia. Los derivados sintéticos 11,12-di-*O*-acetil-14-desoxicoleona U (9) y 6,11,12-tri-*O*-

## Capítulo II

acetil-14-desoxicoleona U (**10**) presentaron una toxicidad similar en todas las líneas celulares, excepto en MCF-7 con un valor de  $IC_{50} > 30 \mu M$ , pero el derivado triacetilado (**10**) presentó valores de  $IC_{50}$  ligeramente más bajos que el derivado diacetilado (**9**). Esto podría explicarse por la diferencia de hidrofobicidad: el derivado triacetilado (**10**) podría atravesar las membranas biológicas con más facilidad que el derivado diacetilado (**9**) y de esta manera alcanzar una concentración intracelular más alta. Aunque la 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxiroyleanona (**11**) no presenta potentes propiedades citotóxicas en células de leucemia y de melanoma humanas, este compuesto presenta una actividad antiproliferativa interesante en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 ( $IC_{50} = 6,8 \pm 1,3 \mu M$ ). De esta manera el compuesto **11** afecta la proliferación celular de una forma específica. Ya que el compuesto **11** tiene dos grupos hidroxilo, se obtuvieron sus derivados con varios radicales (**12-22**) (Figura 14) y se estudiaron sus efectos en las diferentes líneas celulares. En general, los derivados con grupos funcionales monoéster y diéster fueron más activos contra las células de leucemia que el compuesto **11**, con la única excepción del compuesto **13**, que fue menos potente que el compuesto **11** en las células Molt-3, SK-MEL-1 y MCF-7. Entre los derivados con un grupo benzoilo en el anillo de quinona no hubo diferencia en la actividad entre los compuestos con un sustituyente donante de electrones (-OCH<sub>3</sub>, compuesto **14**) y aceptor de electrones (-Cl, compuesto **15**) en la posición *para* del anillo bencénico. Sin embargo, la introducción de un sustituyente aceptor de electrones, el grupo nitro, en el compuesto **16** redujo la actividad citotóxica. El derivado *p*-nitrobenzoilo (**17**) fue al menos 6-10 veces más activo que el compuesto **11**, excepto en las células MCF-7. El derivado diacetilo (**18**) fue más citotóxico que el derivado monoacetilado (**20**) en todas las células ensayadas.



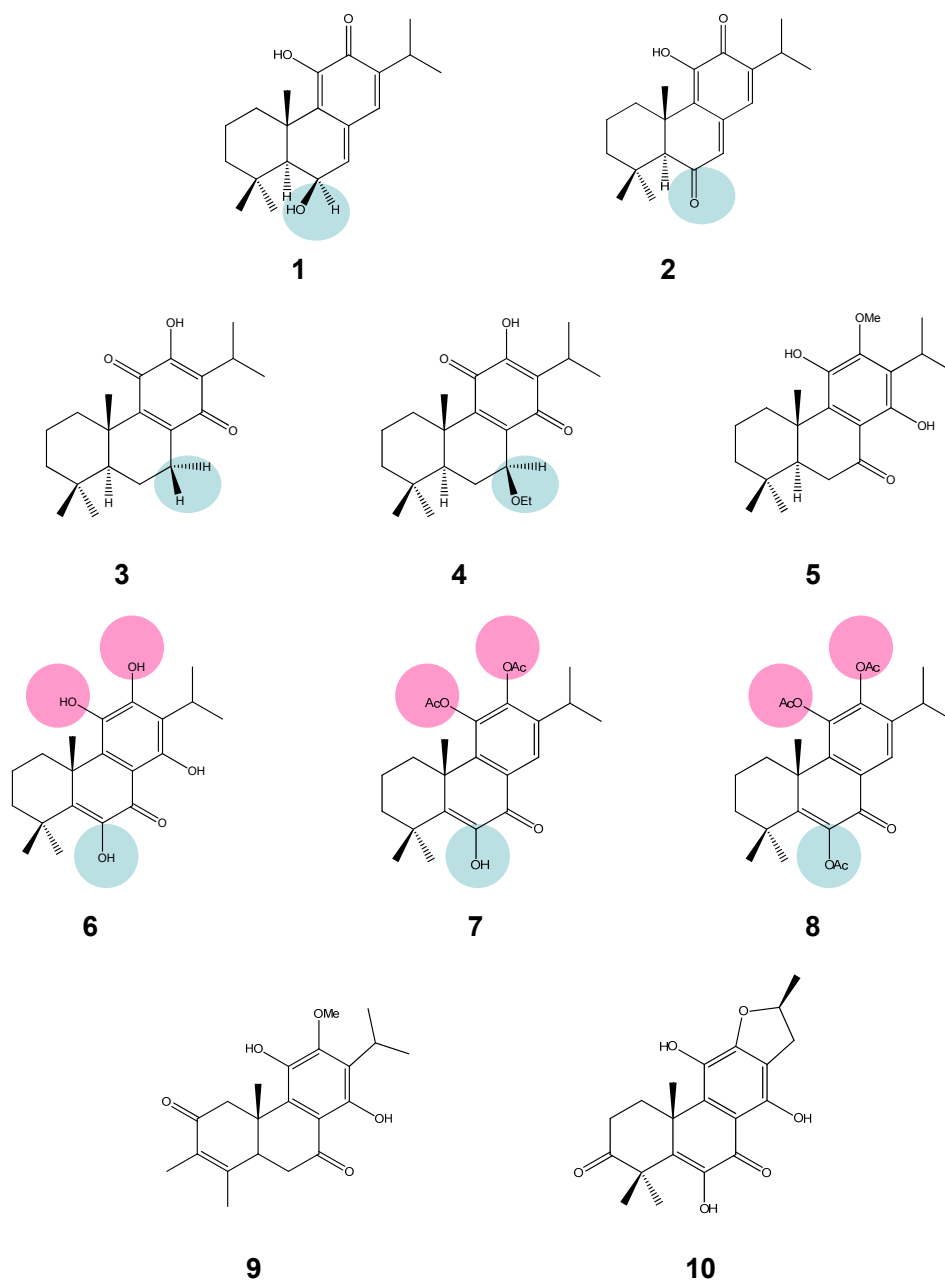


Figura 13 . Estructuras químicas de los abietanos ensayados.

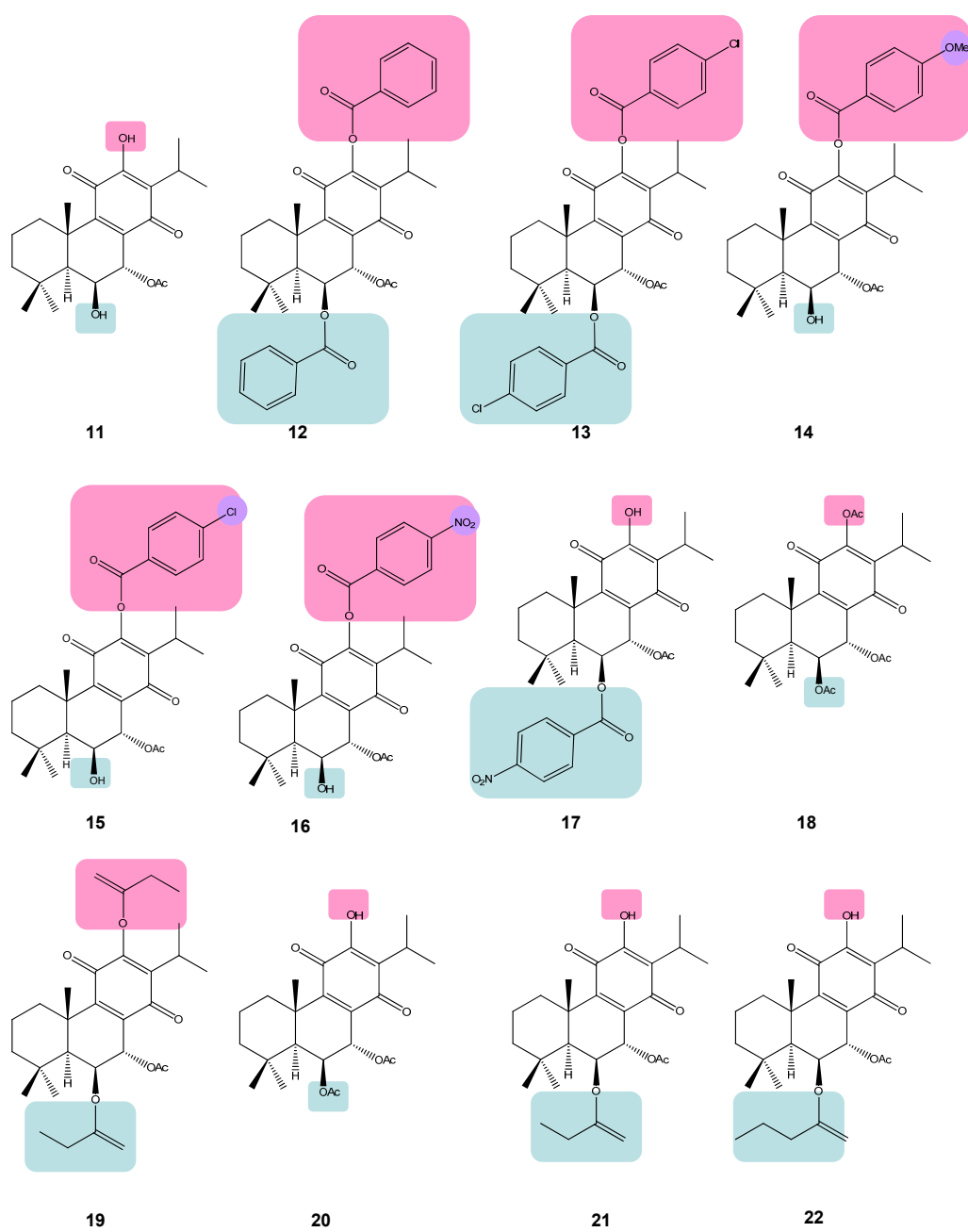


Figura 14. Estructuras químicas de los abietanos ensayados. 7 $\alpha$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxiroyleanona (**11**) y sus derivados.

También hemos investigado la citotoxicidad de una serie de halimanos diterpénicos (**23-30**) (Figura 15). Ningún derivado mostró actividad citotóxica en las cinco líneas celulares ensayadas ( $IC_{50} > 30 \mu M$ ).

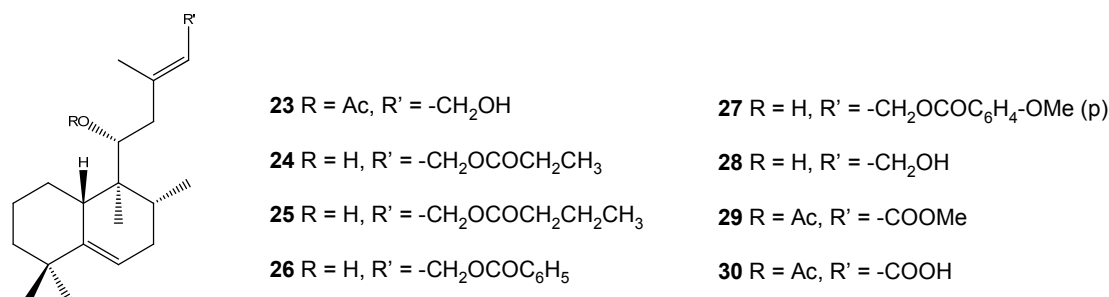


Figura.15. Estructuras químicas de los halimanos diterpénicos ensayados.

Ya que los compuestos **1**, **12**, **14** y **15** presentaron una actividad citotóxica similar contra las células de leucemia, seleccionamos estos compuestos para profundizar en su mecanismo de citotoxicidad. Hemos evaluado si estos compuestos presentan actividad citotóxica en células de leucemia con la expresión elevada de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. Nuestros resultados indican que las líneas celulares de leucemia humana con expresión elevada de Bcl-2 (U937/Bcl-2) (Figura 16 A) y Bcl-x<sub>L</sub> (HL-60/Bcl-x<sub>L</sub>) (Figura 16 B) también son sensibles a los compuestos seleccionados y presentaron unos valores de  $IC_{50}$  similares a U937 y HL-60/neo, respectivamente.

Además, los compuestos **12**, **14** y **15** no fueron citotóxicos en linfocitos quiescentes (PBMC) hasta una concentración de 3  $\mu M$  (Figura 16 C). Aunque el compuesto **1** (3  $\mu M$ ) fue ligeramente tóxico para las PBMC (~80% de viabilidad celular), este compuesto fue más citotóxico contra las células HL-60 (36% de viabilidad celular).

Nº	IC <sub>50</sub> (µM)				
	HL-60	U937	Molt-3	MCF-7	SK-MEL-1
1	1,8 ± 1,3	1,5 ± 0,6	1,4 ± 0,2	9,6 ± 3,8	7,2 ± 2,8
2	4,8 ± 0,6	3,0 ± 0,7	1,8 ± 0,3	>30	9,6 ± 1,5
3	>30	>30	13,6 ± 12,7	>30	>30
4	>100	>100	>30	>100	>100
5	20,8 ± 1,9	11,1 ± 3,5	>30	>30	>30
6	4,1 ± 1,8	4,3 ± 1,3	8,8 ± 5,2	27,5 ± 9,4	10 ± 1,8
7	>100	>100	>100	>100	>100
8	3,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	2,7 ± 0,2	>100	>100
9	11,5 ± 1,7	8,4 ± 2,5	13,4 ± 3,6	>30	24,1 ± 9,1
10	4,1 ± 0,6	4,6 ± 1,6	4,6 ± 1,8	>30	9,9 ± 0,5
11	25,4 ± 2,8	13,7 ± 4,0	12,7 ± 0,3	6,8 ± 1,3	29,1 ± 3,6
12	3,6 ± 1,4	1,8 ± 0,6	6,9 ± 4,0	25,5 ± 2,1	3,1 ± 1,1
13	5,7 ± 0,9	5,6 ± 2,6	>30	>30	49,6 ± 7,5
14	2,7 ± 0,4	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,2	3,1 ± 0,4	7,2 ± 2,2
15	2,4 ± 1,1	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	2,9 ± 0,7	4,0 ± 1,1
16	8,4 ± 1,2	1,1 ± 0,1	10,0 ± 1,0	11,4 ± 1,0	5,7 ± 0,5
17	3,8 ± 1,7	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,8	9,1 ± 2,9	6,7 ± 1,4
18	9,0 ± 1,9	6,4 ± 1,4	3,0 ± 1,5	5,9 ± 1,7	8,1 ± 2,1
19	4,7 ± 1,0	3,9 ± 0,2	10,8 ± 4,9	28,3 ± 2,4	27,4 ± 2,2
20	15,9 ± 4,7	12,1 ± 1,6	5,4 ± 2,1	23,3 ± 8,5	16,2 ± 4,1
21	11,8 ± 2,4	7,0 ± 0,6	6,3 ± 2,1	17,1 ± 3,8	9,0 ± 4,1
22	5,6 ± 2,7	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,3	6,5 ± 2,1	3,6 ± 0,7
23	>30	>100	>100	>30	>100
24	>30	24,7 ± 0,9	>30	>30	>30
25	>30	>30	>30	>30	≈30
26	>30	>30	>30	>30	>30
27	>30	>30	>30	>30	>30
28	>100	≈30	>30	>30	>30
29	>30	≈30	>30	>100	>30
30	>30	>30	>30	>100	>100

Tabla 3. Efectos de los diterpenoides sobre la proliferación de las líneas tumorales humanas. Las células se cultivaron durante 72 horas y el valor de la IC<sub>50</sub> (µM) se determinó mediante el ensayo colorimétrico MTT como se describe en la sección de Material y Métodos. Los datos representan la media ± S.E.M. de 3-5 experimentos independientes con tres determinaciones cada uno.

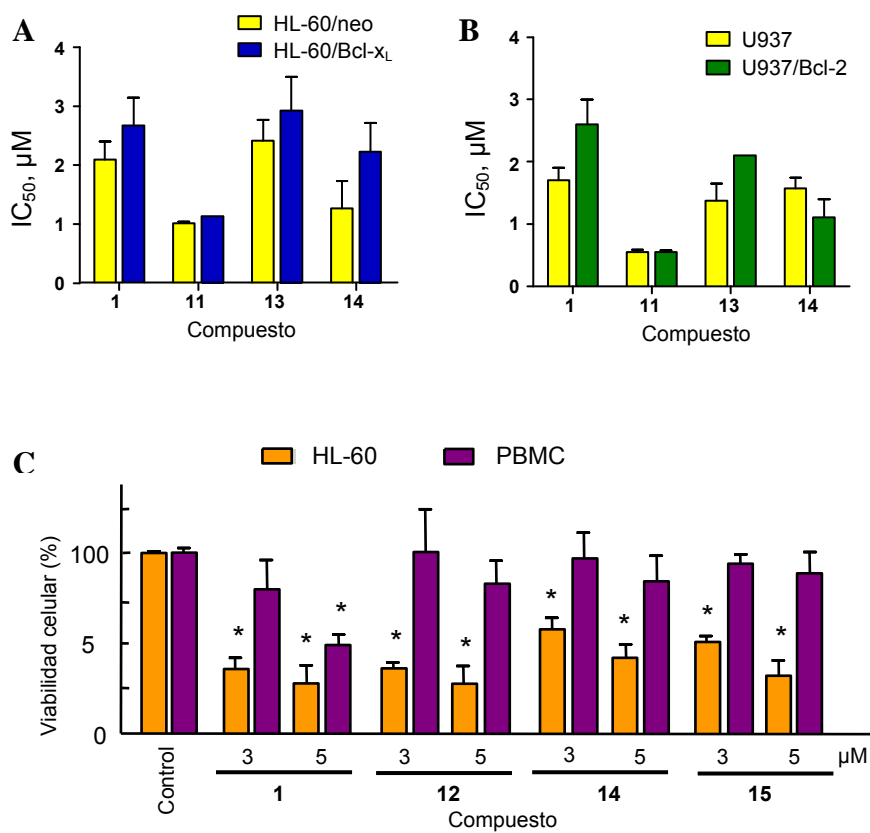


Figura 16. Efecto de los abietanos **1**, **12**, **14** y **15** sobre la viabilidad de las células con expresión elevada de *Bcl-x<sub>L</sub>* (A), *Bcl-2* (B) y sobre la viabilidad de los linfocitos quiescentes (C) determinado por el método de MTT.

## **6.2. Los abietanos diterpénicos inducen apoptosis en células de leucemia mieloide humana.**

Para evaluar el mecanismo responsable de la inhibición de la proliferación, hemos examinado si los compuestos **1**, **12**, **14** y **15** inducen apoptosis en células HL-60. Hemos investigado si estos compuestos inducen los cambios morfológicos característicos de la muerte celular apoptótica analizando las células normales y tratadas por microscopía fluorescente. Las células incubadas con los compuestos seleccionados muestran condensación y fragmentación de cromatina después de 6 h de tratamiento (Figura 17 A). Estos compuestos también inducen la externalización de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática determinada por citometría de flujo después de la tinción con anexina V-FITC (Figura 17 B). Hemos utilizado la microscopía electrónica de transmisión para visualizar los cambios ultraestructurales asociados con apoptosis (Figura 17 C). Aparte de la fragmentación y/o la condensación de los núcleos, señales características de células apoptóticas, las células tratadas con los abietanos **1** y **12** presentaron condensación densa perinuclear y abundantes vacuolas.

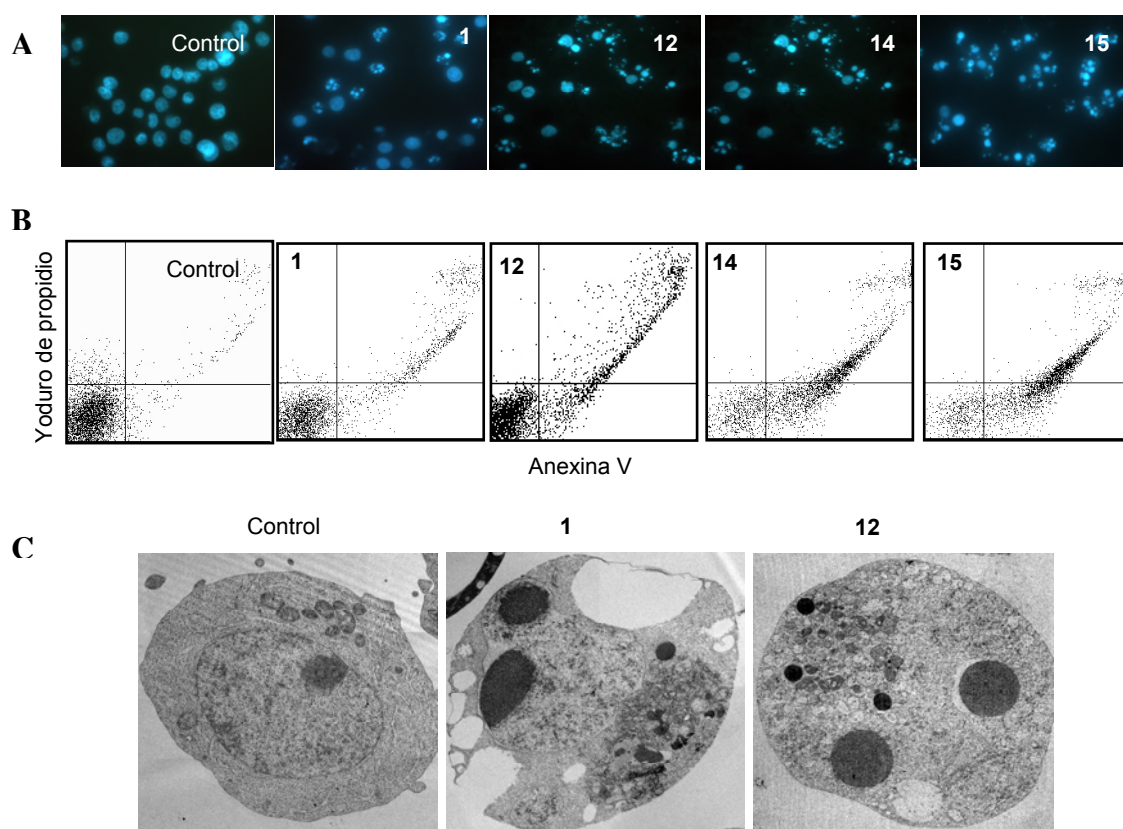
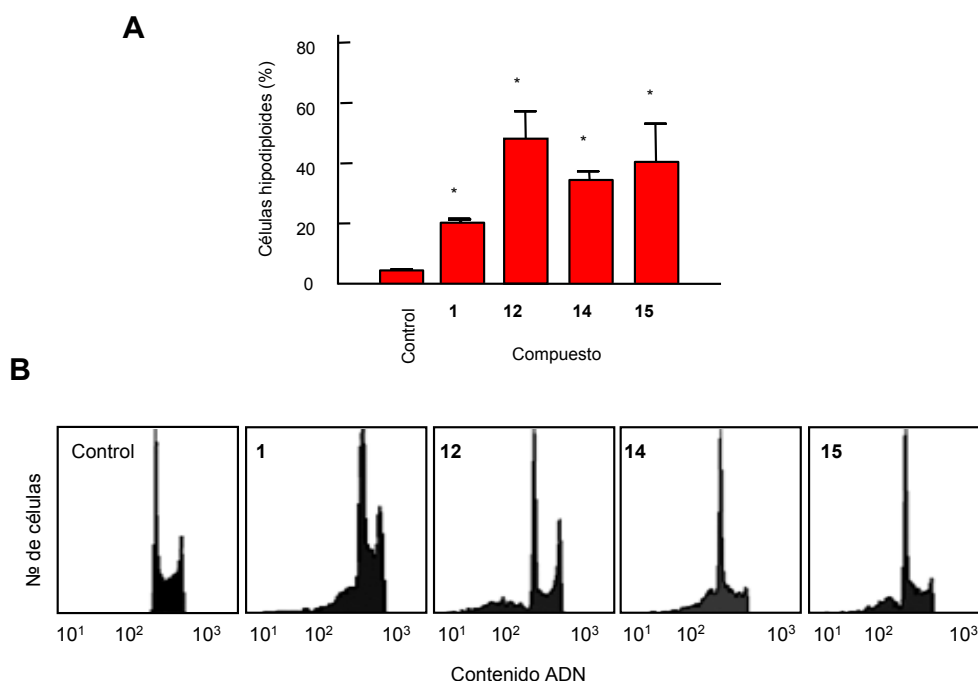


Figura 17. Efecto de los compuestos **1**, **12**, **14** y **15** sobre la inducción de apoptosis en las células HL-60. (A) Microfotografías de campos representativos de las células teñidas con bisbenzimida para evaluar la condensación nuclear (apoptosis) después del tratamiento con los abietanos diterpénicos **1**, **12**, **14** y **15**. (B) Análisis por citometría de flujo de las células teñidas con Anexina V-FITC y yoduro de propidio después del tratamiento con 3  $\mu$ M de los compuestos seleccionados durante 24 h. Estos datos son representativos de tres experimentos independientes. (C) Microfotografías electrónica de transmisión de las células HL-60 tratadas con 3  $\mu$ M de taxodona (**1**) y **12** durante 24 h.

## Capítulo II

Para estudiar el efecto de los abietanos diterpénicos seleccionados sobre el ciclo celular, las células incubadas con los compuestos se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo (Figura 18). La evaluación del número de células hipodiploides (fase sub- $G_1$ ) después de 24 h de tratamiento con los compuestos **1**, **12**, **14**, y **15** (3  $\mu$ M) mostró que el porcentaje de células apoptóticas aumentó aproximadamente 20%, 48%, 35% y 40%, respectivamente. Un número significativo de células apoptóticas fue detectado ya después de 12 horas de tratamiento. Cuando se excluyó del análisis la fracción de células en fase sub- $G_1$ , no hubo cambios en la distribución de células en las distintas fases del ciclo entre células HL-60 normales y tratadas.



*Figura 18. Efecto de los compuestos 1, 12, 14 y 15 sobre el ciclo celular. (A) Evaluación de la cantidad de células hipodiploides (fase sub- $G_1$ ) después de 24 h de tratamiento con 3  $\mu$ M de los compuestos seleccionados. Los valores representan medias  $\pm$  SE de tres experimentos independientes cada uno hecho en triplicado. \* $P < 0,05$  significativamente diferente del control. (B) Distribución del ciclo celular en las células tratadas con 3  $\mu$ M de los compuestos **1**, **12**, **14** y **15** durante 24 h.*



### **6.3. Papel de las caspasas en la muerte celular inducida por los abietanos 1, 12, 14 y 15.**

Para determinar si las caspasas están involucradas en la respuesta de las células al tratamiento con los compuestos abietánicos, hemos examinado si estos compuestos inducen el procesamiento proteolítico de las caspasas. Para ello, las células se trataron durante 24 h con 3  $\mu$ M de los compuestos **1**, **12**, **14** y **15** y los lisados celulares se analizaron por transferencia Western (Figura 19 A). Los compuestos inducen el procesamiento de la pro-caspasa-9 (en el caso del compuesto **1** no se detectó el fragmento 35-37 kDa), la pro-caspasa-8 (el compuesto **15** fue el más potente) y la pro-caspasa-3. Los compuestos **14** y **15** no inducen la hidrólisis de las pro-caspasas-6 y -7, mientras que los compuestos **1** y **12** inducen el procesamiento más potente de la caspasa-7 que de la caspasa-6. También hemos evaluado si estos compuestos activan la caspasa-4, que está implicada en el estrés del retículo endoplasmático, y hemos observado una disminución de la pro-caspasa-4 (compuesto **1**) y la formación del fragmento 18-20 kDa (compuestos **12**, **14** y **15**). Todos los compuestos ensayados inducen la hidrólisis de PARP (poli(ADP-ribosa)polimerasa), sustrato de la caspasa-3.

Como el procesamiento de caspasas no siempre está relacionado con su activación, hemos evaluado la actividad enzimática de las caspasas-3/7, -8 y -9 en los lisados de las células tratadas con los abietanos seleccionados utilizando los sustratos específicos DEVD-*p*NA, IETD-*p*NA y LEHD-*p*NA (Figura 19 B). Como muestran los resultados, los compuestos **1**, **12** y **14** inducen la activación de las caspasas-3/7, -8 y -9. En las células tratadas con el compuesto **15** se observa el aumento de la actividad de la caspasa-3/7 pero no de las caspasas-8 y -9.

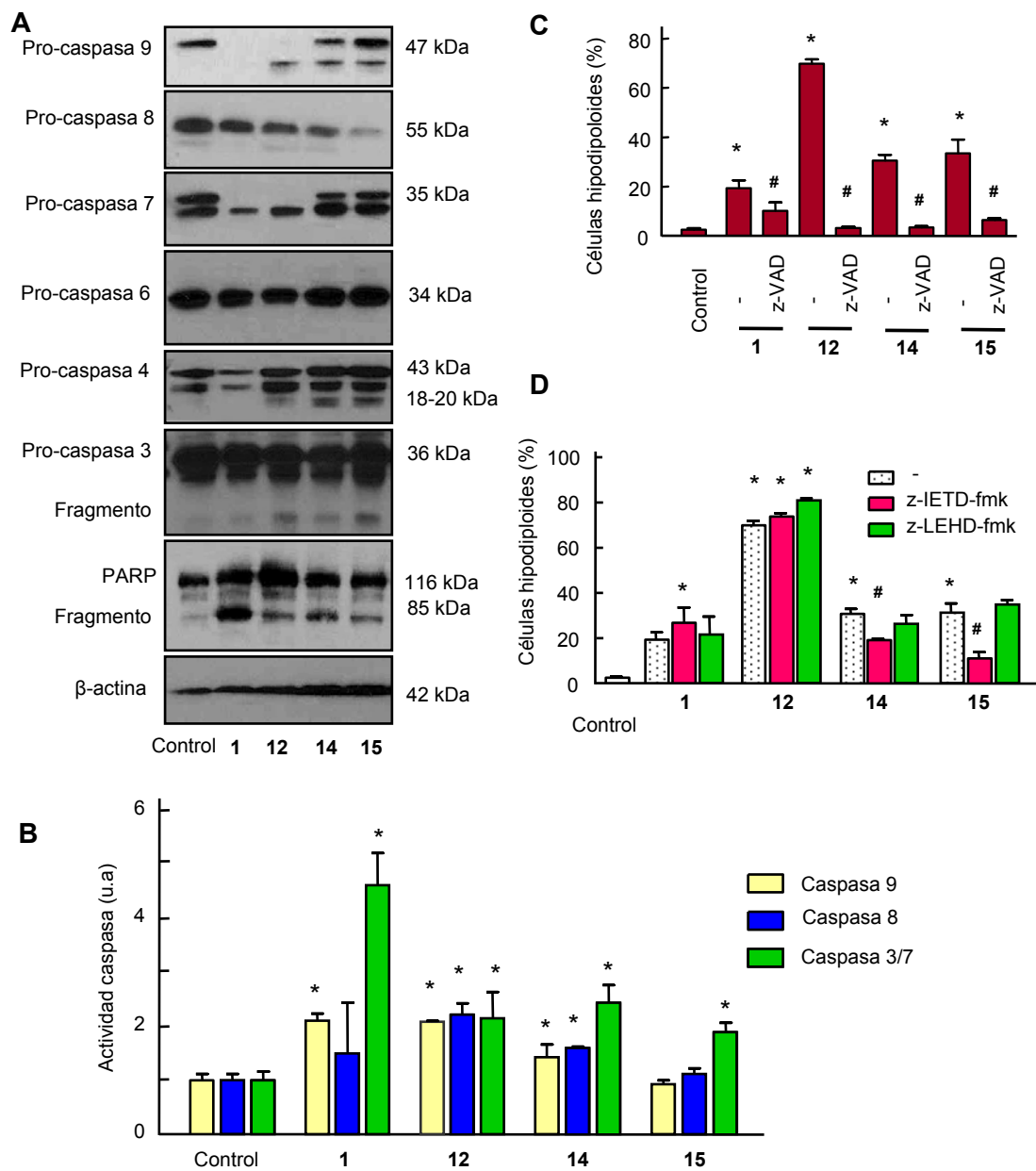


Figura 19. Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por los compuestos 1, 12, 14 y 15. (A) El procesamiento proteolítico de caspasas y PARP. Las células se trataron con 3  $\mu$ M de los compuestos indicados durante 24 h y los lisados celulares se analizaron por transferencia Western. (B) Activación de caspasas inducida por los compuestos seleccionados. Los resultados se expresan en incrementos de actividad comparada con el control. Efecto del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk (C) y los inhibidores específicos de caspasa-8 y -9 (D) sobre la apoptosis inducida por los abietanos. \* $P < 0,05$  significativamente diferente del control. # $P < 0,05$  significativamente diferente del tratamiento con los abietanos.

Para demostrar si la activación de las caspasas es necesaria para la apoptosis inducida por los compuestos **1**, **12**, **14** y **15**, las células se trataron con un inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 19 C, este inhibidor reduce significativamente (compuesto **1**) o casi completamente (compuesto **12**, **14**, y **15**) la cantidad de células hipodiploides, lo que indica que estos compuestos inducen una muerte celular dependiente de caspasas.

Para identificar qué caspasas están involucradas en el mecanismo de la muerte celular inducida por los abietanos, hemos examinado los efectos de los inhibidores específicos de caspasa-9 (z-LEHD-fmk) y caspasa-8 (z-IETD-fmk) (Figura 19 D). Estos inhibidores no tuvieron efecto sobre la muerte celular inducida por los compuestos **1** y **12**. El pretratamiento de las células con z-IETD-fmk redujo significativamente la cantidad de células hipodiploides inducidas por los compuestos **14** y **15**, mientras z-LEHD-fmk no tuvo efecto.

#### **6.4. Papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por los compuestos**

##### **1, 12, 14 y 15.**

Para determinar si el tratamiento con los abietanos induce la liberación de proteínas mitocondriales, las fracciones citosólicas de los extractos celulares se analizaron por transferencia Western (Figura 20 A). Como se observa los compuestos seleccionados inducen la liberación al citosol de proteínas proapoptóticas citocromo *c*, Smac/DIABLO y AIF. Además, los abietanos **1** y **15** inducen la disminución de Bcl-2 y ligeramente de Bax citosólico. La taxodona (**1**)

Capítulo II

también reduce los niveles de Bid, lo que está de acuerdo con la activación de la caspasa-8.

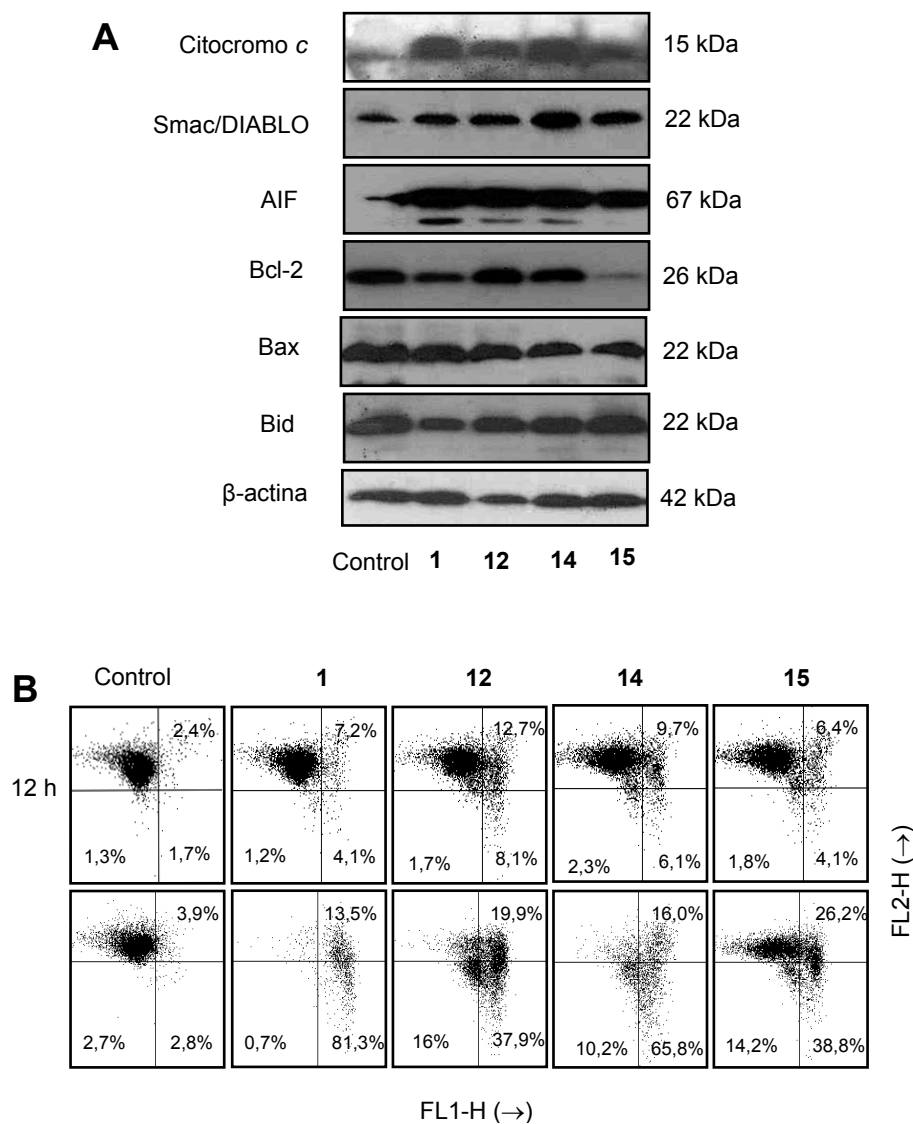


Figura 20. El papel de la mitocondria en la apoptosis inducida por los compuestos 1, 12, 14 y 15. (A) Efecto de los abietanos diterpénicos sobre la liberación de citocromo c, Smac/DIABLO y AIF y su efecto sobre los niveles de las proteínas de la familia Bcl-2: Bcl-2, Bax y Bid. Las células se trataron con 3  $\mu$ M de los compuestos indicados durante 24 h y los lisados celulares se analizaron por transferencia Western. (B) Efecto de los compuestos seleccionados sobre el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Las células teñidas con JC-1 se analizaron por citometría de flujo.

Para determinar si la disipación del potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) es necesaria para la liberación de las proteínas mitocondriales, las células se tiñeron con JC-1 y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 20 B,  $\Delta\Psi_m$  disminuyó solo después de 24 horas de tratamiento, lo que indica que la disipación de  $\Delta\Psi_m$  no es un evento temprano en la apoptosis inducida por los compuestos seleccionados.

### **6.5. Los abietanos diterpénicos seleccionados activan las proteínas quinazas activadas por mitógenos MAPKs.**

La vía de las MAPKs actúa como mediadora de una serie de señales que promueven o inhiben la proliferación de las células leucémicas. Para determinar si la fosforilación de las MAPKs desempeña un papel importante en la apoptosis inducida por los diterpenos, hemos examinado el efecto de los inhibidores específicos de MAPKs sobre la muerte celular inducida por estos compuestos.

El pretratamiento de las células con PD98059 y U0126, inhibidores de las quinazas extracelulares activadas por mitógenos 1/2 (MEK1/2), y con SP600125, inhibidor de JNK/SAPK, no hizo efecto sobre la apoptosis inducida por taxodona (**1**) (Figura 21 A). Sin embargo, la inhibición de  $p38^{MAPK}$  con el inhibidor específico SB203580 aumentó el porcentaje de células apoptóticas inducida por este compuesto de  $15,3\pm 3,8\%$  a  $54,3\pm 7,6\%$ .

Ningún inhibidor tuvo efecto sobre la muerte celular inducida por el compuesto **12**, lo que sugiere que la activación de estas MAPKs no es necesaria para la apoptosis inducida por este compuesto.

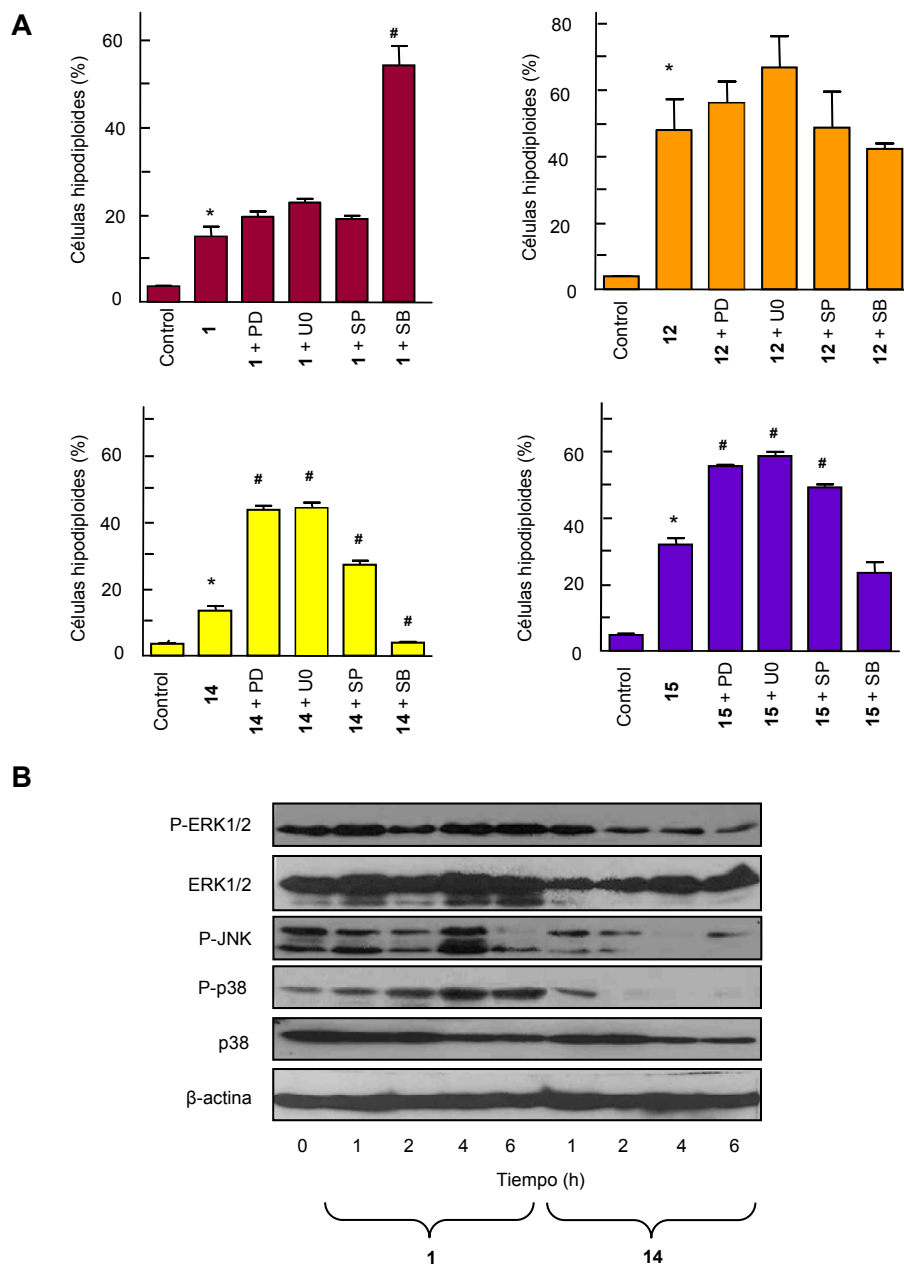


Figura 21. (A) Efecto de los inhibidores de las MAPKs sobre la apoptosis inducida por los compuestos **1**, **12**, **14** y **15**. Las células se preincubaron con PD98059 (PD, 10  $\mu$ M), U0126 (U0, 10  $\mu$ M), SP600125 (SP, 10  $\mu$ M) y SB203580 (SB, 2  $\mu$ M) durante 1 h y después con 3  $\mu$ M de los abietanos diterpénicos durante 24 h. \* $P$ <0,05 significativamente diferente del control. # $P$ <0,05 significativamente diferente del tratamiento con los compuestos. (B) Fosforilación de las MAPKs inducida por los compuestos **1** y **14**. Las células se trataron con 3  $\mu$ M de los compuestos durante los tiempos indicados y los lisados celulares se analizaron por transferencia Western.

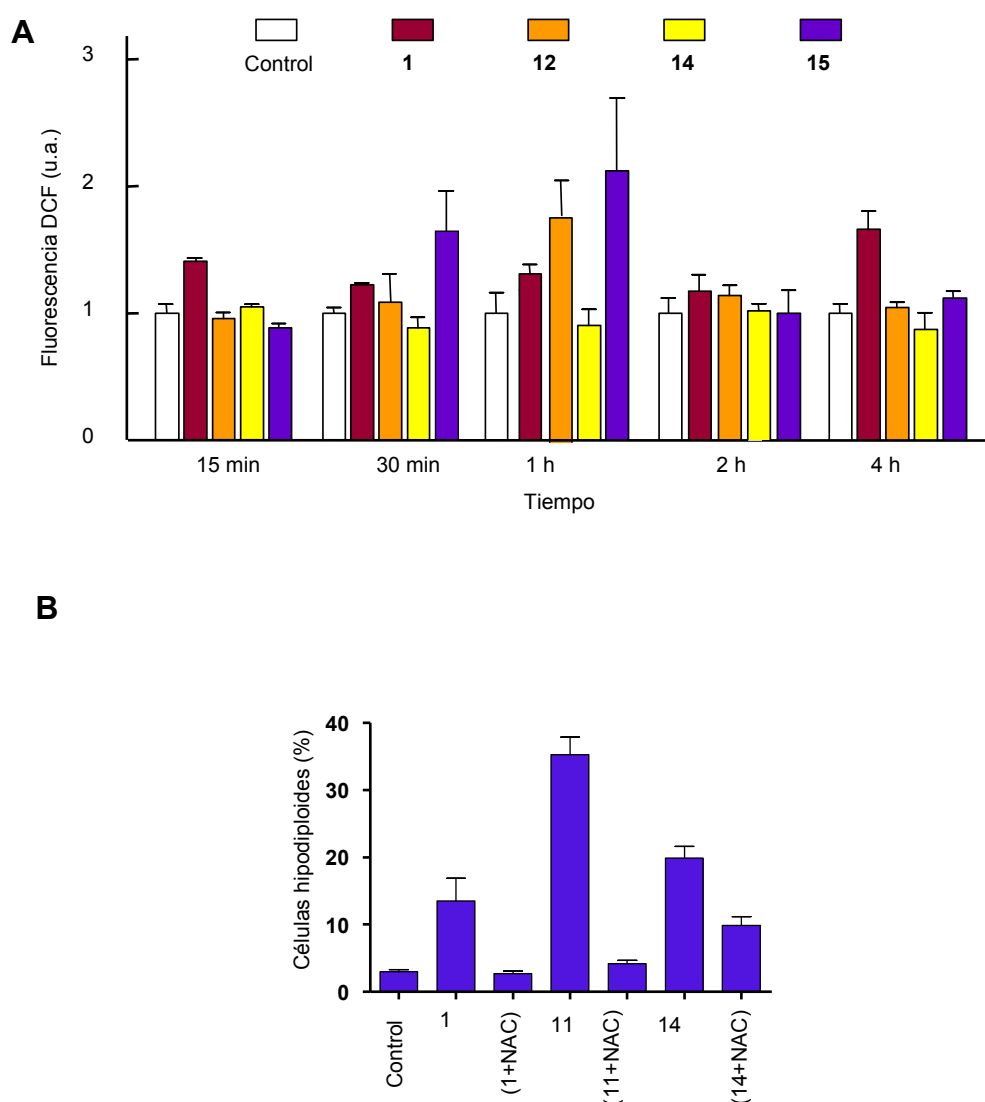
Los inhibidores de MEK 1/2 así como SP600125 aumentaron la muerte celular inducida por los compuestos **14** y **15**. El inhibidor de p38<sup>MAPK</sup> bloqueó casi completamente la apoptosis inducida por el compuesto **14**, mientras que este inhibidor no tuvo ningún efecto significativo sobre las células tratadas con el compuesto **15**. Estos resultados sugieren que la activación de p38<sup>MAPK</sup> es necesaria para la apoptosis inducida por el compuesto **14**.

Para explorar el papel de las MAPKs en la muerte celular inducida por estos compuestos hemos analizado el efecto de los compuestos **1** y **14** sobre la fosforilación de las MAPKs mediante transferencia Western (Figura 21 B). La fosforilación de ERK 1/2 y p38<sup>MAPK</sup> en las células tratadas con taxodona **1** se detectó después de 1 h de tratamiento, mientras que la fosforilación de JNK/SAPK se detectó después de 4 h. Por el contrario, no se observó fosforilación de MAPKs en las células tratadas con el compuesto **14**, pero se detectó la disminución de la fosforilación de fosfo-p38<sup>MAPK</sup> y también una leve disminución de la cantidad de p38<sup>MAPK</sup> total.

#### **6.6. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) no son necesarias para la muerte celular inducida por los abietanos diterpénicos.**

Hemos investigado si la generación de ROS está involucrada en la apoptosis inducida por los compuestos seleccionados. Para ello las células se tiñeron con H<sub>2</sub>-DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidro-fluoresceína) y se analizaron por citometría de flujo. La generación de ROS fue detectada después de 30 min, 1 h y 4 h de tratamiento con los abietanos diterpénicos **15**, **12** y **1**, respectivamente (Figura 22 A). No hubo generación de ROS en las células tratadas con el compuesto **14**.

## Capítulo II



*Figura 22. (A). Generación de ROS por los abietanos seleccionados. Las células se incubaron con los compuestos 1, 12, 14 y 15 durante los tiempos indicados y se determinó la fluorescencia de H<sub>2</sub>-DCF oxidado por citometría de flujo. (B) Efecto de NAC (10 mM) sobre la muerte celular inducida por los compuestos 1, 12, 15. NAC se añadió simultáneamente con los compuestos después de la incubación previa de NAC con cada compuesto durante 2 h. Las células tratadas se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por citometría de flujo.*



Para determinar si la generación de ROS está involucrada en la apoptosis inducida por los compuestos **1**, **12** y **15** hemos examinado el efecto de *N*-acetil-L-cisteína (NAC, 10 mM),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E, 25  $\mu$ M) y trolox (2 mM). NAC fue el único antioxidante que bloqueó la muerte celular inducida por los compuestos **1**, **12** y **15**. Sin embargo, el papel protector de NAC parece ser una consecuencia de la reacción directa con los abietanos ya que no se detectó la muerte celular cuando los compuestos se preincubaron con NAC durante 2 h y después se añadieron a las células (Figura 22 B)

## DISCUSIÓN.

Los abietanos diterpénicos han atraído mucha atención ya que presentan una amplia variedad de actividades biológicas, incluidas propiedades antitumorales. En este estudio hemos investigado las propiedades citotóxicas de la taxodona y una serie de abietanos diterpénicos incluyendo algunos derivados de la taxodona utilizando varias líneas celulares. Hemos demostrado que la taxodona (**1**) y sus derivados **12**, **14** y **15** poseen propiedades citotóxicas en células de leucemia humana (HL-60, U937 y Molt-3), en células de melanoma SK-MEL-1 e incluso en células de cáncer de mama MCF-7. En células SK-MEL-1 estos compuestos presentaron valores de  $IC_{50}$  entre 3,1 y 7,2  $\mu$ M. Este resultado es muy interesante ya que el melanoma frecuentemente resiste a la quimioterapia. Además los linfocitos normales (PBMC) fueron más resistentes a los compuestos **1**, **12**, **14** y **15** que las células HL-60.

El análisis del ciclo celular mostró que la inhibición de la viabilidad celular inducida por estos compuestos fue acompañada con un aumento de la fracción sub- $G_1$ . El tratamiento con estos abietanos diterpénicos induce la externalización de fosfatidilserina detectada por la tinción de las células HL-60 con anexina V-FITC. Los experimentos utilizando la microscopía de fluorescencia y electrónica de transmisión demostraron que los abietanos seleccionados inducen los cambios morfológicos característicos de la muerte celular apoptótica.

También hemos demostrado que los abietanos diterpénicos **1**, **12**, **14** y **15** son citotóxicos en las células de leucemia humana que expresan niveles elevados de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. Estos miembros de la familia Bcl-2 inhiben la transición de la permeabilidad mitocondrial, la acumulación citosólica de citocromo *c* y la activación

de las caspasas ejecutoras de la apoptosis [84,85]. El hecho de que los protectores mitocondriales Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> no fueron capaces de prevenir la toxicidad de los abietanos seleccionados indica que estos compuestos activan una ruta alternativa que no implica la mitocondria o que son capaces de inactivar la protección conferida por estas proteínas. Por tanto, estos compuestos pueden ser útiles en el tratamiento del cáncer humano, ya que el aumento en la expresión de Bcl-2 y/o Bcl-x<sub>L</sub> está asociado a la quimioresistencia particularmente en el caso de las células malignas hematológicas [86].

Nuestros resultados indican que el efecto antiproliferativo de los diterpenoides seleccionados es dependiente de caspasas, ya que la muerte celular fue reducida por el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. Estos compuestos inician la redistribución de las proteínas mitocondriales citocromo *c*, Smac/DIABLO y AIF a la fracción citosólica, lo que se correlacionó con la disipación de  $\Delta\Psi_m$ . La liberación de citocromo *c* y Smac/DIABLO contribuyen a la activación de las caspasas-9 y -3. Además, los resultados muestran el procesamiento proteolítico de las caspasas ejecutoras, las caspasas-3, -6 y -7, e iniciadoras, las caspasas-8 y -9, lo que indica que los compuestos seleccionados activan estas proteasas en las células de leucemia. La actividad enzimática de las caspasas-3/-7, -8 y -9 también aumentó después del tratamiento con los abietanos. Aunque hemos demostrado que la apoptosis inducida por estos compuestos fue bloqueada por el inhibidor general de caspasas, los inhibidores específicos de la caspasa-8 (z-IETD-fmk) y caspasa-9 (z-LEHD-fmk) no fueron capaces de bloquear la muerte celular. La única excepción fue el inhibidor de caspasa-8 que bloqueó parcialmente o casi completamente la muerte

## Capítulo II

celular inducida por los compuestos **14** y **15**, respectivamente. Este resultado indica el papel central de la caspasa-8 en la apoptosis inducida por estos dos compuestos.

Las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) es una familia de serina-/treonina-proteínas quinasas que desempeñan un papel importante en la señalización de la apoptosis, así como en el control de la proliferación y la diferenciación celular. En el caso de la taxodona (**1**) se detectó la fosforilación de ERK1/2 y p38<sup>MAPK</sup> después de 1 h de tratamiento y de JNK/SAPK después de 4 h. Sin embargo, los inhibidores específicos de MEK1/2 ni de JNK/SAPK afectaron la apoptosis inducida por taxodona (**1**), lo que sugiere que la activación de estas MAPKs no es necesaria para la muerte celular inducida por este compuesto. La inhibición de p38<sup>MAPK</sup> aumentó la muerte celular, lo que indica que la inhibición de esta ruta sensibiliza a las células HL-60 al tratamiento con taxodona (**1**). Los estudios previos han demostrado que el aumento de la muerte celular inducida por el 5-fluorouracilo por la inhibición de p38<sup>MAPK</sup> puede ser debido al aumento de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax [87]. Aunque se desconoce el mecanismo por el que la inhibición de p38<sup>MAPK</sup> sensibiliza a las células HL-60 al tratamiento con taxodona (**1**), una posible explicación podría ser la disminución de la expresión de Bcl-2. Estos resultados tienen una implicación clínica importante para la utilización de la combinación de taxodona (**1**) con los inhibidores de p38<sup>MAPK</sup> como potenciales agentes terapéuticos.

Por el contrario, la combinación del abietano **14** con los inhibidores específicos de MEK1/2 y JNK/SAPK aumentaron la muerte celular inducida por este compuesto, mientras el inhibidor de p38<sup>MAPK</sup> bloqueó casi completamente la apoptosis. El último efecto fue inesperado, ya que no se detectó la fosforilación de

p38<sup>MAPK</sup> inducida por este compuesto sino la disminución de la cantidad de fosfo-p38<sup>MAPK</sup>. Esto sugiere que se activan las MAPK fosfatasas con especificidad dual (MKPs). Nuestros resultados indican que p38<sup>MAPK</sup> parece estar implicada en la apoptosis inducida por el compuesto **14**, mientras que ERK1/2 y JNK/SAPK están involucradas en la supervivencia celular.

La combinación del compuesto **15** con los inhibidores específicos de MEK1/2 y JNK/SAPK también aumentaron la apoptosis inducida por este compuesto. Sin embargo, el inhibidor de p38<sup>MAPK</sup> no disminuyó la cantidad de células apoptóticas inducidas por este compuesto.

Aunque el efecto antiproliferativo de los abietanos **1**, **12** y **15** fue asociado con la generación de ROS, esto no es importante en el proceso de apoptosis ya que ninguno de los antioxidantes ensayados fue capaz de bloquear la muerte celular inducida por los compuestos **1**, **12** y **15**.

En resumen, los abietanos diterpénicos seleccionados son citotóxicos en varias líneas celulares tumorales. En el caso de las células de leucemia su citotoxicidad implica la activación de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. El mecanismo de la muerte celular inducida por el abietano diterpénico taxodona (**1**) implica también la activación de la cascada de MAPKs.



## **CONCLUSIONES**

---





## CONCLUSIONES

1. Hemos evaluado la actividad antitumoral de nueve derivados semisintéticos de glicósidos de la quercetina y el kaempferol en la línea celular HL-60.
2. De los compuestos analizados el heptacetato de astragalina (AHA) es el más citotóxico. AHA posee propiedades citotóxicas en células HL-60, mientras que las PBMC quiescentes y proliferantes son resistentes.
3. AHA induce la apoptosis por un mecanismo dependiente de caspasas. Sin embargo, el hecho de que inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk no bloqueara completamente la muerte celular inducida por AHA supone la existencia de otras rutas adicionales.
4. El estrés del retículo endoplasmático está implicado, ya que AHA induce el procesamiento de caspasa-4 y la apoptosis se bloqueó parcialmente con el inhibidor específico de caspasa-4.
5. La apoptosis inducida por AHA está asociada con la liberación de citocromo *c* a través de un mecanismo que es independiente de la despolarización de la membrana mitocondrial, y se inhibe mediante la expresión de niveles elevados de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>.
6. AHA induce la activación de JNK/SAPK y la fosforilación bifásica de ERK1/2. Las MAPKs parecen actuar como señales de supervivencia, ya que la inhibición de estas rutas de señalización potencian la muerte celular apoptótica inducida por AHA.
7. La muerte celular inducida por AHA es dependiente de la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).
8. Hemos examinado los efectos de 30 diterpenoides sobre la proliferación de cinco líneas celulares tumorales humanas y descubrimos que algunos de ellos presentan propiedades citotóxicas.
9. La taxodona (**1**) y sus derivados **12**, **14** y **15** poseen propiedades citotóxicas en todas las líneas celulares analizadas. Además los linfocitos normales (PBMC) fueron más resistentes a los compuestos **1**, **12**, **14** y **15** que las células HL-60.

10. El efecto antiproliferativo de los diterpenoides **1**, **12**, **14** y **15** es dependiente de caspasas y asociado a la liberación de proteínas mitocondriales y la disipación del potencial de membrana mitocondrial.
11. Los abietanos diterpénicos seleccionados son citotóxicos en las células de leucemia humana que expresan niveles elevados de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> y por lo tanto son capaces de inactivar la protección conferida por estas proteínas.
12. La activación de JNK y ERK1/2 no es necesaria para la muerte celular inducida por taxodona, pero la inhibición de la ruta p38<sup>MAPK</sup> sensibiliza a las células HL-60. En cambio, p38<sup>MAPK</sup> parece estar implicada en la apoptosis inducida por el compuesto **14**, mientras que ERK1/2 y JNK/SAPK están involucradas en la supervivencia celular.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70
- [2] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012; 75:311-35
- [3] Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96:67-202
- [4] Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003; 23:519-34
- [5] San Feliciano A, Gordaliza M, Salinero MA, Miguel del Corral JM. Abietane acids: sources, biological activities, and therapeutic uses. *Planta Med* 1993; 59:485-90
- [6] Vivek KB, Sun CK. Antibacterial abietane-type diterpenoid, taxodone from *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *J Biosc* 2010; 35: 533–8
- [7] Kolak U, Kabouche A, Öztürk M, Kabouche Z, Topçu G, Ulubelen A. Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochem Anal* 2009; 20: 320–7
- [8] Kusumoto N, Ashitani T, Murayama T, Ogiyama K, Takahashi K. Antifungal Abietane-Type Diterpenes from the Cones of *Taxodium distichum* Rich. *J Chem Ecol* 2010; 36: 1381–6
- [9] Dong Y, Morris-Natschke SL, Lee KH. Biosynthesis, total syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep* 2011; 28:529-42
- [10] Fronza M, Lamy E, Günther S, Heinzmann B, Laufer S, Merfort I. Abietane diterpenes induce cytotoxic effects in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 through different modes of action. *Phytochemistry* 2012; 78:107-19
- [11] Guerrero IC, Andrés LS, León LG, Machín RP, Padrón JM, Luis JG, Delgadillo J. Abietane Diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. clevelandii* with Cytotoxic Activity against Human Cancer Cell Lines. *J Nat Prod* 2006; 69: 1803–5
- [12] Kupchan, S. M.; Karim, A; Marcks, C. Tumor inhibitors. XXXIV. Taxodione and taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*. *J Am Chem Soc* 1968; 90:5923-27
- [13] Ulubelen A, Topçu G, Chai H, Pezzuto JM. Cytotoxic Activity of Diterpenoids Isolated from *Salvia hypargeia*. *Pharm Biol* 1999; 37: 148–151

## *Bibliografia*

- [14] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36:131-49
- [15] McDonald ER 3rd, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol* 2000; 16:871-86
- [16] Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8:413-50
- [17] Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;181-182, 471-4
- [18] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35:495-516
- [19] Nemes Z Jr, Friis RR, Aeschlimann D, Saurer S, Paulsson M, Fésüs L. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur J Cell Biol* 1996; 70:125-33
- [20] Bortner CD., Oldenburg NB. Cidlowski, JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1995; 5:21-6
- [21] Bratton DL., Fadok VA., Richter DA., Kailey JM., Guthrie L.A., Henson P M. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997; 272:26159-65
- [22] van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1-9
- [23] Cohen, G. M. (). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1-16
- [24] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008; 27:6194-206
- [25] Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272:17907-11
- [26] Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 1999; 13:3179-84

- [27] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383-424
- [28] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:239-52
- [29] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281:305-8
- [30] Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004; 16:139-44
- [31] Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998; 94:481-90
- [32] Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., and Peter, M. E. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274:1541-8
- [33] Cain K., Brown DG, Langlais C, Cohen GM. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 1999; 274:22686-92
- [34] Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prevost MC, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000; 192:571-80
- [35] Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of *bcl-2*, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5214-8
- [36] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-911
- [37] Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292:727-30
- [38] Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3668-72
- [39] Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144:903-14

## *Bibliografia*

- [40] Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; 381:335-41
- [41] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399:483–7
- [42] Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:323-33
- [43] Tan S; Sagara Y; Liu Y; Maher P; Schubert D. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 1998; 141:1423–32
- [44] Buttke TM; Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15:7–10
- [45] Ellerby LM, Ellerby HM, Park SM, Holleran AL, Murphy AN, Fiskum G, Kane DJ, Testa MP, Kayalar C, Bredesen DE. Shift of the cellular oxidation-reduction potential in neural cells expressing Bcl-2. *J Neurochem* 1996; 67:1259-67
- [46] Linder S, Shoshan MC. Lysosomes and endoplasmic reticulum: targets for improved, selective anticancer therapy. *Drug Resist Updat* 2005; 8:199-204
- [47] Cirman T, Oresić K, Mazovec GD, Turk V, Reed JC, Myers RM, Salvesen GS, Turk B. Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem* 2004; 279:3578-87
- [48] Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; 287:664-6
- [49] Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002; 22:3003–13
- [50] Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene* 1998; 17:1069–78
- [51] Ruiz-Vela A, Gonzalez de Buitrago G, Martinez AC. Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion. *EMBO J* 1999; 18:4988–4998



- [52] Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, Manabe T, Yamagishi S, Bando Y, Imaizumi K, Tsujimoto Y, Tohyama M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 2004; 165:347-56
- [53] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:3525-44
- [54] Shapiro PS, Whalen AM, Tolwinski NS, Wilsbacher J, Froelich-Ammon SJ, Garcia M, Osheroff N, Ahn NG. Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1999; 19:3551-60
- [55] Pulido R, Zúñiga A, Ullrich A. PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J* 1998; 17:7337-50
- [56] Tikoo K, Lau SS, Monks TJ. Histone H3 phosphorylation is coupled to poly-(ADP-ribosylation) during reactive oxygen species-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *Mol Pharmacol* 2001; 60:394-402
- [57] Park BG, Yoo CI, Kim HT, Kwon CH, Kim YK. Role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced cell death in osteoblastic cells. *Toxicology* 2005; 215:115-25
- [58] Cagnol S, Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis* 2006; 11:337-46
- [59] Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996; 87:619-28
- [60] Ventura JJ, Hübner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 2006; 21:701-10
- [61] Bradham C, McClay DR. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle* 2006; 5:824-8.
- [62] Díaz JG, Carmona AJ, Torres F, Quintana J, Estévez F, Herz W. Cytotoxic activities of flavonoid glycoside acetates from *Consolida oliveriana*. *Planta Med* 2008; 74:171-4.
- [63] Hueso-Rodríguez JA, Jimeno ML, Rodríguez B, Savona G, Bruno M. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*. *Phytochemistry* 1983; 22:2005-9

## Bibliografía

- [64] Michavila A, Fernández-Gadea F, Rodríguez B. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia lavandulaefolia*. *Phytochemistry* 1986; 25:266-8
- [65] Rijo P, Gaspar-Marques C, Simões MF, Jimeno ML, Rodríguez B. Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. *Biochem Syst Ecol* 2007; 35:215-21
- [66] Hussein AA, Torre MC, Rodríguez B, Hammouda FM, Hussiney HA. Modified abietane diterpenoids and a methoxylupane derivative from *Salvia palaestina*. *Phytochemistry* 1997; 45:1663-8
- [67] Carreiras MC, Rodríguez B, Torre MC, Perales A, Torres MR, Savona G, Piozzi F. Rearranged abietane diterpenoids from the root of *Teucrium polium* supsp. *vincentinu*. *Tetrahedron* 1990; 46:847-60
- [68] Gaspar-Marques C, Rijo P, Simões MF, Duarte MA, Rodríguez B. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicilin and vancomycin resistant bacteria. *Phytomedicine* 2006; 13:267-71
- [69] Rijo P, Simões MF, Francisco AP, Rojas R, Gilman RH, Vaisberg AJ, Rodríguez B, Moiteiro C. Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus*. Royleanone derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Chem Biodiv* 2010; 7:922-32
- [70] Rijo P, Rodríguez B, Duarte A, Simões MF. Antimicrobial properties of *Plectranthus ornatus* extracts, 11-acetoxythalima-5,13-dien-15-oic acid metabolite and its derivatives. *Nat Prod J* 2011; 1:57-64
- [71] Rivero A, Quintana J, Eiroa JL, López M, Triana J, Bermejo J, Estévez F. Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *Eur J Pharmacol* 2003; 482:77-84
- [72] Cabrera J, Quintana J, Reiter RJ, Loro J, Cabrera F, Estévez F. Melatonin prevents apoptosis and enhances HSP27 mRNA expression induced by heat shock in HL-60 cells: possible involvement of the MT2 receptor. *J Pineal Res* 2003; 35:231-8
- [73] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63
- [74] Rubio S, Quintana J, López M, Eiroa JL, Triana J, Estévez F. Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents. *Eur J Pharmacol* 2006;48:9-20.
- [75] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54

- [76] Rubio S, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estévez F. Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK. *Carcinogenesis* 2007;28:2105-13
- [77] Zhuang S, Demirs J.T., Kochevar I.E. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 2000; 275:25939-48
- [78] Margolin N, Raybuck SA, Wilson KP, Chen W, Fox T, Gu Y, Livingston DJ Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. *J Biol Chem* 1997; 272:7223-8
- [79] Guicciardi ME., Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004; 23:2881-90
- [80] Bellows D., Chau B., Lee P, Lazebnik Y, Burns WH, Hardwick JM. Antiapoptotic herpesvirus Bcl-2 homologs escape caspase-mediated conversion to proapoptotic proteins. *J Virol* 2000; 74:5024-31
- [81] Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specific protein phosphatases. *Oncogene* 2007; 26:3203-13
- [82] Tonks NK. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signalling. *Cell* 2005; 121:667-70
- [83] Kavanagh TJ, Grossmann A, Jaecks EP, Jinneman J., Eaton DI, Martin GM, Rabinovitch PS. Proliferative capacity of human peripheral blood lymphocytes sorted on the basis of glutathione content. *J Cell Physiol* 1990; 145:472-80
- [84] Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275:1129-32
- [85] Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: Mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:488-96
- [86] Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ Jr. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell line. *Cancer Res* 2000; 60:6101-10
- [87] Yang SY, Miah A, Sales KM, Fuller B, Seifalian AM, Winslet M. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitizes human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. *Int J Oncol* 2011; 38:1695-1702



**ANEXO**

---



## PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO ORIGEN ESTA TESIS

**Burmistrova O**, Quintana J, Díaz JG, Estévez F. Astragalín heptaacetato-inducida muerte celular en células de leucemia humana depende de las caspasas y activa la vía de MAPK. *Cancer Lett* 2011; 309:71-7

Indicios de calidad:

A) Base de datos de indexación: Journal Citation Reports

B) Año: 2011

C) Índice de impacto: 4,238

D) Posición que ocupa en la categoría: 43 de 196

E) Categoría: Oncology.

Estévez F, Quintana J, Marrero MT, Negrín G, **Burmistrova O**, Estévez S, Rubio S, Torres F, Nicolini F, Triana J, Eiroa JL, López M, Pérez FJ, Díaz JG, León F, Brouard I, Bermejo J. Evaluación de flavonoides sobre la viabilidad y proliferación de las células leucémicas humanas. *Biocáncer* 2011; 5:54-68

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

**Burmistrova O**, Quintana J, Díaz JG, Estévez F. 2012. Evaluación de potenciales compuestos antileucémicos. Presentación oral. La conferencia final del proyecto BIOPHARMAC "Estrategias para el desarrollo de la biotecnología en la Macaronesia".

**Burmistrova O**, Quintana J, Díaz JG, Estévez F. 2008. Evaluación de derivados glicosilados de la quercetina y el kaempferol sobre células leucémicas humanas. Póster. Congreso: XII Semana Científica "Antonio González". La Laguna, Tenerife

**Burmistrova O**, Quintana J, Paz B, Díaz JG, Estévez F. 2010. Semisíntesis y evaluación citotóxica en células de leucemia humana HL-60 del glicósido heptaacetato de astragalina. Póster Congreso: XIV Semana Científica "Antonio González"





