

Evaluación antitumoral y mecanismo de acción de metoxiflavonoides

María Cristina Hernández Alemán

Fabio Nicolini

José Quintana Aguiar

Francisco Estévez Rosas

Los flavonoides son compuestos polifenólicos sintetizados por las plantas que presentan un amplio espectro de actividades biológicas y entre las que cabe destacar su papel como prometedores agentes antitumorales. En este trabajo demostramos que el metoxiflavonoide natural tamarixetina presenta actividad antitumoral intensa frente a diversas líneas leucémicas humanas (HL-60, U937, Molt-3 and Raji). Estudios detallados en HL-60 ponen de manifiesto que este compuesto interrumpe el ciclo celular a nivel de la fase G₂-M e induce apoptosis a través de un mecanismo que implica activación de diversas caspasas. El efecto de la tamarixetina está, además, asociado con cambios en la expresión y/o fosforilación de proteínas reguladoras del ciclo celular así como con alteración de los niveles de las especies reactivas derivadas del oxígeno.

Flavonoids are naturally polyphenolic compounds synthesized in plants which display a remarkable spectrum of biological activities and they are among the most promising anticancer agents. Here we show that tamarixetin, a natural methoxiflavonoid, displays strong cytotoxic properties in vitro in several human leukemia cell lines (HL-60, U937, Molt-3 and Raji). Mechanistic studies on HL-60 indicate that this compound induces G₂-M cell cycle phase arrest and apoptotic cell death that involves activation of several caspases. The effect of Tamarixetin was associated with changes in the expression and/or phosphorylation of cell cycle regulators and also with reactive oxygen species generation.

Presentación

Los flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos de origen vegetal y que forman parte de la dieta humana. Sus efectos biológicos son variados, destacando especialmente los relacionados con la prevención y supresión del cáncer.

Introducción

Los flavonoides son un grupo de compuestos con una estructura común fenil benzo-γ-pirona (C₆-C₃-C₆) que se encuentran en las plantas y que se clasifican en chalconas y auronas (amarillas), flavo-

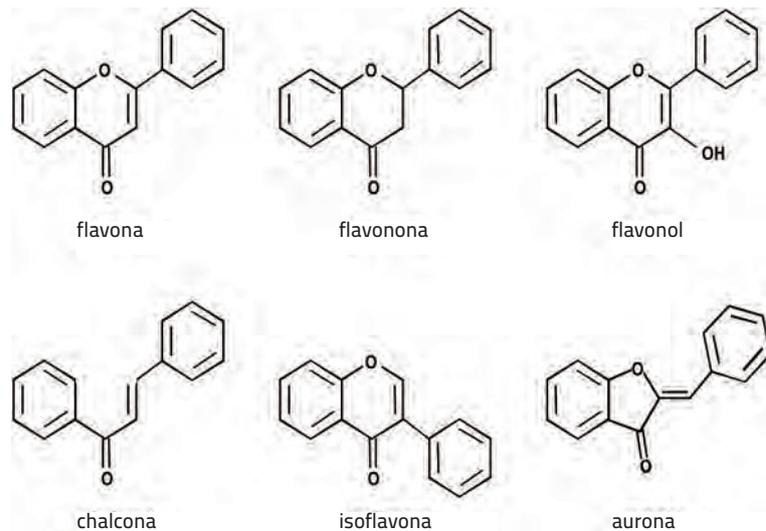


Figura 1. Clasificación de los flavonoides

nas, flavanonas, flavonoles y sus glucósidos (amarillo pálido o color marfil) e isoflavonas (incolores).

En las plantas los flavonoides se encuentran en estado libre o unidos a azúcares formando heterósidos, que es lo más frecuente debido a que les confiere mayor estabilidad química. Estos heterósidos son polares y por lo tanto son generalmente solubles en agua.

Se han identificado alrededor de 9000 flavonoides que podemos encontrar en frutas, verduras, semillas y flores, así como en la cerveza, el vino, el té (verde o negro) y en la soja. Estos se consumen en la dieta humana de forma habitual y también se utilizan en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Así pues los flavonoides representan una contribución importante al potencial antioxidante de la dieta humana.

Los flavonoides ingeridos a través de la dieta son absorbidos en el tracto gastrointestinal y su modificación tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos, o glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del

colon, y los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina. La biodisponibilidad es uno de los factores más importantes a tener en cuenta al evaluar los efectos biológicos de los flavonoides, así como de cualquier fármaco o componente alimenticio.

En cuanto a su actividad, los flavonoides desempeñan importantes funciones bioquímicas y fisiológicas en las plantas: protección frente a la luz UV, defensa ante los herbívoros, regulación del transporte de la hormona auxina, atracción de animales polinizadores, inducción de la nodulación por parte de las bacterias fijadoras de nitrógeno y protección contra hongos. Los flavonoides muestran un gran espectro de actividades biológicas en los seres humanos, las más importantes y que han sido extensamente estudiadas están relacionadas con las enfermedades cardiovasculares y con el cáncer.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación inversa entre el consumo de flavonoides y el riesgo de desarrollar cáncer. Estudios experimentales y ensayos clínicos han indicado que poseen efectos importantes en la prevención y en el tratamiento del cáncer, siendo capaces de interferir en las cuatro etapas de la carcinogénesis: iniciación, promoción, progresión e invasión. Los flavonoides modulan la acción y la biosíntesis de varios citocromos P450 que están implicados en el

cáncer y en el metabolismo de fármacos, aumentando su interés como potenciales agentes terapéuticos. Existen amplias evidencias científicas que demuestran que los flavonoides son capaces de inhibir la proliferación de las células cancerígenas, inducir la parada del ciclo celular, promover la muerte celular selectiva de células tumorales por apoptosis, estimular la diferenciación celular, inhibir la metástasis y la angiogénesis, activar la respuesta inmune frente a las células tumorales, y además, tienen un efecto antioxidante y modulan la resistencia a fármacos.

En este contexto, la apoptosis como mecanismo fisiológico para la eliminación de células tumorales junto con la inhibición de la proliferación celular son las principales estrategias en la lucha contra el cáncer. En general, han sido descritas dos vías que conducen a la activación de la apoptosis. En la vía extrínseca están involucrados los receptores de muerte e implica la activación de la caspasa-8, mientras que en la vía intrínseca o mitocondrial diversas señales apoptóticas promueven la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma y la activación de la caspasa -9. Ambas vías son capaces de desencadenar la activación de la caspasa -3, principal proteasa ejecutora de la apoptosis y que es responsable de la degradación de múltiples proteínas celulares.

Material y métodos

Cultivo de líneas tumorales humanas

Las células tumorales humanas (HL-60, Raji, U937, SK-MEL-1, MCF7, Molt-3) se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía 10% de suero bovino fetal inactivado por calor, 50 mg/ml gentamicina y 2 mM de L-glutamina, a 37 °C y 5% CO₂. Las células se sembraron 24 h antes de los tratamientos a una densidad de 2,5 x 10⁵/ml.

Detección de apoptosis por microscopía fluorescente

Las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se fijaron con paraformaldehído (3%, en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugaron (1500 x g, 10 min), se eliminó el paraformaldehído y las células se tiñeron con 20 ml de una disolución 10 mM de Hoechst 33258 en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. La morfología nuclear se analizó con un microscopio de fluorescencia Zeiss-Axiovert y se consideraron células apoptóticas aquellas cuyos núcleos presenten condensación de la cromatina, su compactación a lo largo de la periferia y la fragmentación nuclear en tres o más cuerpos apoptóticos.

Análisis del ciclo celular

Las células se lavaron con PBS frío y fijaron en etanol al 70% a -20 °C,

durante al menos una hora. A continuación se lavaron con PBS y se incubaron con 1 ml de PBS en presencia de yoduro de propidio (50 µg/ml) y RNAsa A (100 µg/ml) a 37 °C durante 30 min. La fluorescencia emitida por el complejo propidio-DNA se evaluó por citometría de flujo. Se determinó el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular (G₁, S y G₂/M) mediante el análisis del contenido en DNA. Se determinó, además, la fracción sub-G₁; las células que contienen DNA hipodiploide, a la izquierda del pico G₁, que se consideraron apoptóticas.

Extracción y análisis del DNA de alto peso molecular

Las células se trataron con concentraciones crecientes del flavonoide seleccionado durante diferentes períodos de tiempo, se colectaron por centrifugación (500 x g, 10 min, 4 °C), se lavaron dos veces con PBS frío y se precipitaron nuevamente. Se resuspendieron con 30 ml de tampón de extracción [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,5% SDS y 1 mg/ml RNAasa A] a 37 °C durante 1 h. A continuación se añadió 3 ml de proteinasa K (10 mg/ml en agua) y la mezcla se incubó a 50 °C durante dos horas adicionales. El DNA se extrajo dos veces con 100 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) y la fase acuosa (DNA) se mezcló con 5 ml de disolución de carga [10 mM EDTA (pH 8,0) conteniendo 1% de agarosa de bajo punto de fusión, 0,25% azul de

bromofenol y 40% de sacarosa]. Para el análisis de las muestras, éstas se incubaron a 50 °C y se separaron por electroforesis (5V/cm) en tampón TAE [40 mM Tris-acético (pH 8,0), 1 mM EDTA] en un gel de agarosa al 2% en el mismo tampón anterior. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0,5 mg/µl en tampón TAE) durante 15 min, la presencia de DNA se detectó a 260 nm en un transiluminador y la imagen se captó con la cámara digital DC290 (Kodak).

Estudios de proliferación celular y citotoxicidad

La valoración de la proliferación/citotoxicidad celular se realizó usando el ensayo de la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Las células se cultivaron en placas de 96 pocitos, por cuadruplicado, a una densidad aproximada de 1x10⁴ células/pocito en 0,2 ml de medio de crecimiento completo y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto durante 24, 48 y 72 h. Las placas se centrifugaron (500 x g, 10 min) a temperatura ambiente y las células se lavaron con PBS. A cada pocito se le añadió 100 µl de MTT (0,5 mg/ml en medio de crecimiento sin suero), las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C y la reacción se paró añadiendo 100 µl de tampón de lisis (20% SDS en 50% N,N-dimetilformamida) e incubando la mezcla hasta la mañana siguiente. La cuantificación de la con-

versión del colorante amarillo en el púrpura por la deshidrogenasa mitocondrial se determinó a 570 nm en un lector de microplacas utilizando como blanco pocitos sin células a los que se le añadió medio de crecimiento sin suero. Los datos se analizaron con el programa informático Prism 4 (GraphPad) y se determinó la concentración inhibidora 50% (IC₅₀).

Determinación de la actividad caspasa

Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS y se homogeneizaron con 500 ml de tampón de lisis [20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol y los inhibidores de proteasas PMSF (0,1 mM), leupeptina (5 mg/ml), aprotinina (10 mg/ml) y pepstatina A (2,5 mg/ml)]. El lisado se centrifugó a 14.000 x g durante 20 min a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas. La medida de la actividad caspasa se llevó a cabo con sustratos colorimétricos: DEVD-pNA (caspasa 3/7), IETD-pNA (caspasa 8), LEHD-pNA (caspasa 9) y midiendo la liberación del cromóforo p-nitroanilida (pNA) que absorbe a 405 nm. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocitos a los que se añadió 80 ml de tampón de reacción [100 mM HEPES (pH 7,5), 20% (v/v) glicerol, 5 mM DTT y 0,5 mM EDTA] conteniendo 200 mM del correspondiente sustrato y 20 ml de lisado celular (~ 25

mg proteínas). Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 1 h y se determinó la liberación de p-nitroanilina (pNA) a 405 nm.

Western-blot

Las células se incubaron en medio de crecimiento con el compuesto de interés tamarixetina durante distintos tiempos a 37 °C. A continuación se colectaron por centrifugación (500 x g, 10 min, 4 °C), se lavaron dos veces con 5 ml de PBS frío y se procedió al fraccionamiento subcelular. El precipitado celular se resuspendió en 500 ml de tampón de homogeneización [20 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa] con inhibidores de proteasas (0,1 mM PMSF, 10 mg/ml de leupeptina, 10 mg/ml aprotinina y 10 mg/ml pepstatina A). Las células se lisaron usando un homogenizador Dounce, el extracto resultante se centrifugó a 1000 x g durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se centrifugó a 10.000 x g durante 20 min a 4 °C. El precipitado (fracción mitocondrial) se lavó con tampón de homogeneización y se resuspendió en 50 ml de tampón TNC [10 mM Tris-acetato (pH 8), 0,5% NP-40, 5 mM CaCl₂]. El sobrenadante anterior se centrifugó a 100.000 x g durante 60 min a 4 °C y el nuevo sobrenadante resultante se utilizó como citosol. Se determinó la concentración de proteínas de las fracciones mitocondrial y citosólica, y aproximadamente 25 ml (50 mg de

proteínas) de cada muestra se mezcló con 75 ml de disolución colorante de electroforesis [50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 15% sacarosa, 2mM EDTA, 3% SDS, 5 mM b-mercaptoetanol y 0,01% azul de bromofenol] y se hirvieron a 100 °C durante 3 min.

Las muestras se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida (del 7,5% al 15%, dependiendo de la proteína bajo estudio) conteniendo 0,1% SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. 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 24 h a 4 °C, seguido por incubación con el anticuerpo específico. Como control que se ha cargado y transferido la misma cantidad de proteínas en todos los grupos experimentales utilizamos un anticuerpo dirigido contra b-actina o tubulina. En todos los casos, los anticuerpos se diluyeron en TBST conteniendo 2% de leche desnatada y las membranas se incubaron en presencia del anticuerpo de interés, durante 24 horas 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, acoplado a la actividad peroxidasa, 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

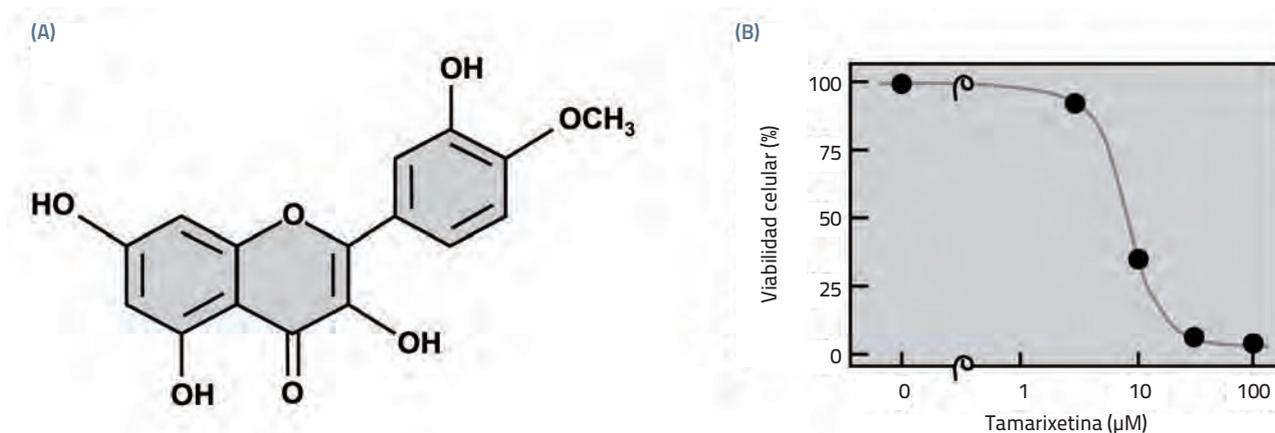


Figura 2. (A) Estructura química de la tamarixetina. **(B)** Estudio del efecto del uso de concentraciones crecientes de la Tamarixetina sobre la viabilidad de las células HL-60. Las células se cultivaron durante 72 horas en una placa de 96 pocillos, en presencia de las concentraciones indicadas en la figura. La viabilidad celular se determinó a 570 nm mediante el ensayo de la de la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y los datos se analizaron haciendo uso del programa informático Prism 4 (GraphPad).

de las membranas sobre películas de autorradiografía.

Determinación de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

La producción de intermediarios reactivos de oxígeno se determinó por citometría de flujo (Coulter Epics XL-MCL, Beckman Coulter) utilizando diacetato 2',7'-diclorodihidro-fluoresceína (H_2 -DCF-DA) como sonda fluorescente sensible a la oxidación. Las células se incubaron en ausencia o presencia de tamarixetina durante diferentes períodos de tiempo. Las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón conteniendo $5 \mu M$ H_2 -DCF-DA y se incubaron durante 30 min a $37^\circ C$. La intensidad de fluorescencia resultante de la oxidación de la sonda se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm y una de detección entre 515 y 550 nm.

Resultados

La tamarixetina inhibe la proliferación de células tumorales humanas

En el presente estudio evaluamos la actividad citotóxica del metoxiflavonoide tamarixetina (Figura 2A) e iniciamos los estudios para determinar el mecanismo de acción en células leucémicas humanas HL60. La actividad antiproliferativa, determinada mediante un ensayo colorimétrico que valora la reducción metabólica del MTT, claramente pone de manifiesto que la tamarixetina reduce la viabilidad celular, efecto que es dependiente de la concentración utilizada (Figura 2B).

La tamarixetina es altamente citotóxica frente a un amplio número de líneas tumorales leucémicas humanas que incluyen tanto a células de naturaleza mielóide (HL-60 y U937) como a células de origen lin-

foide (Molt-3 y Raji). Los resultados (Tabla 1) indican que la concentración con la que se consigue una inhibición del crecimiento celular del 50% (IC_{50}) es aproximadamente de 5-7 mM en HL-60, U937 y Raji mientras que Molt-3 demostró ser significativamente más sensible ($IC_{50} \sim 1$ mM). La actividad citotóxica se evaluó además en células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) y en células de melanoma (SK-MEL-1) que presentaron valores de IC_{50} alrededor de 20 mM. Globalmente, estos estudios indican que la tamarixetina presenta cierta especificidad tisular, y que es claramente más citotóxica frente a células tumorales de origen sanguíneo.

La tamarixetina induce apoptosis en células HL-60

Puesto que muchos agentes anti-tumorales manifiestan su actividad citotóxica mediante activación

Tabla 1. Tabla 1. Evaluación citotóxica de la tamarixetina en células tumorales humanas

| Línea celular | HL-60 | U937 | Molt-3 | Raji | MCF- | SK-MEL- |
|---------------|---------------|---------------|-----------|---------------|------------|------------|
| IC_{50} | $7,5 \pm 1,6$ | $5,5 \pm 2,0$ | $1,1 \pm$ | $6,1 \pm 0,4$ | $17,8 \pm$ | $23,1 \pm$ |

Las células se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de tamarixetina durante 72 horas y la evaluación citotóxica (IC_{50}) se determinó a 570 nm mediante el ensayo de la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) haciendo uso del programa informático Prism 4 (GraphPad) tal y como aparece reflejado en la figura 2B. Los valores recogidos en la tabla representan la media \pm desviación estándar de tres o cuatro experimentos independientes, realizados por triplicados.

de la muerte celular por apoptosis, a continuación decidimos evaluar si la tamarixetina presenta también esta capacidad. Como modelo de estudio utilizamos células tumorales humanas HL-60, línea celular promielocítica ampliamente utilizada en los estudios antitumorales *in vitro* y que presenta entre otras características una morfología redondeada, crecimiento en suspensión y una duración del ciclo celular de aproximadamente 24 horas. Siguiendo diversas aproximaciones metodológicas, los resultados (Figura 3) demuestran que la tamarixetina induce apoptosis en células HL-60. El análisis por citometría de flujo (Figura 3A) revela que este metoxiflavonoide altera el ciclo celular, induce acumulación de células en la fase G₂M e incrementa la fracción de células con contenido hipodiploide de DNA (SubG₁, células apoptóticas). La tamarixetina induce, además, fragmentación del DNA celular (Figura 3B) y que está considerado como un marcador terminal en la apoptosis. El efecto fue más evidente con concentraciones elevadas del compuesto. Una característica típica de las células apoptóticas es, además, la condensación y fragmentación del núcleo en varios fragmentos que permanecen próximos entre sí, conocidos como cuerpos apoptóticos, que pueden visualizarse mediante microscopía de fluorescencia en presencia de un agente fluorescente con afinidad por el DNA (bisbenzimidá). Como se aprecia (Figura 3C), la incubación con tamarixetina promue-

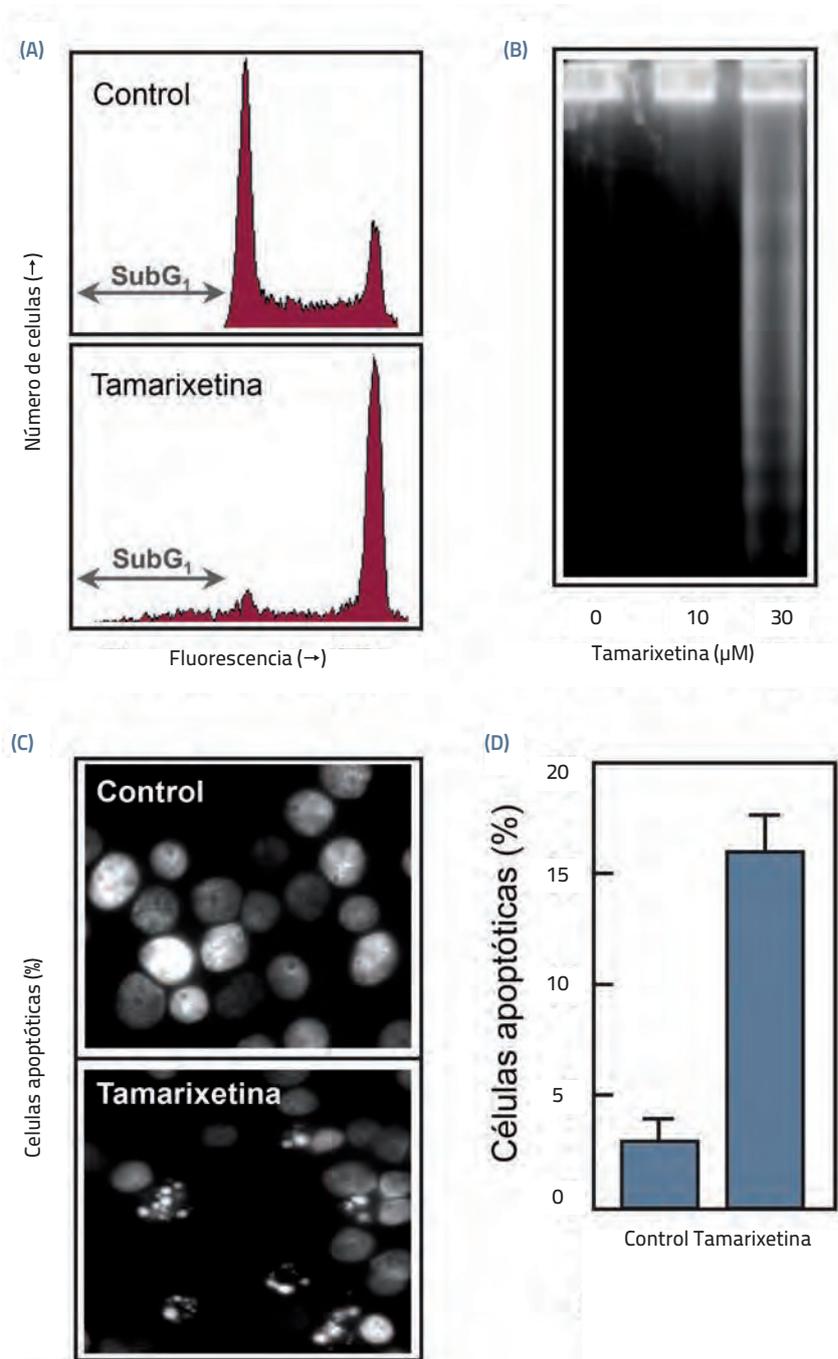


Figura 3. La tamarixetina induce apoptosis en células tumorales promielocíticas humanas HL-60. (A) Las células se incubaron en ausencia (control) o presencia tamarixetina durante 24 horas y el contenido de DNA celular se determinó por citometría de flujo previa fijación con etanol y tinción con yoduro de propidio. (B) Las células se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas del compuesto durante 24 horas y el análisis de la integridad del DNA celular se valoró por electroforesis en un gel de agarosa. (C) Las células se incubaron en ausencia (control) o presencia de tamarixetina durante 24 horas y el efecto sobre la fragmentación nuclear se analizó por microscopía de fluorescencia. (D) Efecto de la tamarixetina sobre el porcentaje de células apoptóticas, determinado a partir de la fracción de células con contenido hipodiploide de DNA (apartado A).

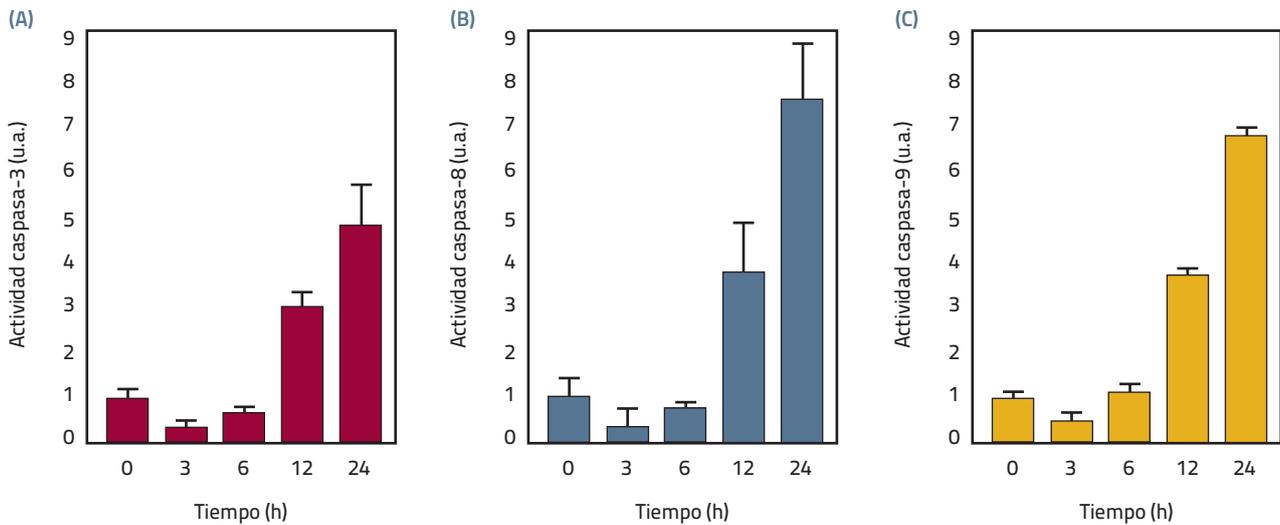


Figura 4. Evaluación del efecto de la tamarixetina sobre la actividad caspasa en células HL-60. Las células se incubaron en presencia del flavonoide durante los períodos de tiempo indicados, se lisaron y se obtuvo la fracción citosólica. La actividad caspasa-3 (A), caspasa-8 (B) y caspasa-9 (C) se determinó a 405 nm en un lector de microplacas, a partir de las fracciones citosólicas incubadas con tetrapéptidos específicos para las tres actividades enzimáticas.

ve aumento del número de células con el núcleo fragmentado respecto al grupo no tratado con el compuesto (células control). La cuantificación del número de células apoptóticas pone de manifiesto que la tamarixetina incrementa hasta en cuatro veces el porcentaje de células apoptóticas, 16% en las células tratadas frente al 4% en las células control (Figura 3D).

PaPel que desempeñan las caspasas

Las caspasas ocupan un lugar central en la maquinaria apoptótica que irreversiblemente conduce a la muerte celular. Estas constituyen una familia de cisteínproteasas específicas de ácido aspártico que son sintetizadas como precursores inactivos (procaspasas) o zimógenos. Dependiendo de la función que desempeñan se distinguen dos tipos, iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras son las primeras en activarse en respuesta al estímulo y conducen a la activación proteolítica de las caspasas efectoras (efectoras), estas últimas responsa-

bles del dismantelamiento de las estructuras celulares y de la inhibición de importantes procesos bioquímicos vitales, resultando en la muerte controlada de la célula.

Con el fin de conocer si la tamarixetina induce activación de las caspasas, las células HL-60 se incubaron en presencia del flavonoide durante 3, 6, 12 y 24 horas, y se evaluó la actividad caspasa a partir de fracciones citosólicas mediante un ensayo colorimétrico a 405 nm y utilizando tetrapéptidos específicos conjugados con el cromóforo *p*-nitroanilina (pNA) para caspasa-3 (DEVD-pNA), caspasa-8 (IETD-pNA) y caspasa-9 (LEHD-pNA). Los resultados demuestran que la principal caspasa ejecutora, caspasa-3 (Figura 4A), así como las caspasas iniciadoras de las vías extrínseca (caspasa-8, Figura 4B) e intrínseca (caspasa-9, Figura 4C), respectivamente, son activadas a partir de las 12 horas de tratamiento y que la actividad aumenta con el tiempo de incubación, al menos hasta las 24 horas.

Muchas proteínas son específicamente hidrolizadas por acción de

las caspasas durante el proceso apoptótico. La identificación de estos fragmentos permite juzgar indirectamente sobre la activación de las caspasas. La caspasa-3, dado su papel central como proteasa ejecutora de la apoptosis, actúa sobre múltiples sustratos proteicos que afectan a la arquitectura celular, al metabolismo del DNA y al control de la proliferación y la apoptosis. Uno de estos sustratos es poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), enzima nuclear de 116 kDa involucrado en la reparación del DNA y que es digerida para rendir un fragmento inactivo de 86 kDa. Los experimentos por Western-blot demuestran que la tamarixetina induce hidrólisis e inactivación de PARP (Figura 5A, derecha) y consistente con este resultado y con los experimentos sobre la actividad enzimática evaluada previamente (Figura 4A), el zimógeno de la caspasa-3 es hidrolizado en los correspondientes fragmentos con actividad catalítica (Figura 5A, izquierda).

La activación proteolítica de la caspasa-3 puede implicar la vía ex-

trínseca (caspasa-8), la vía intrínseca (caspasa-9) o ambas, tal y como parece ocurrir en la muerte celular inducida por tamarixetina (Figuras 4B y 4C, respectivamente). La activación de la vía intrínseca normalmente habitualmente implica la formación en el citosol de un complejo multiproteico (apoptosoma) que engloba, entre otros, a varias moléculas de caspasa-9 y de citocromo c, aunque otros mecanismos de activación independientes de citocromo c también han sido descritos. Puesto que la tamarixetina induce aumento de la actividad caspasa-9 (Figura 4C) decidimos evaluar el papel del citocromo c en este proceso. Los resultados en células HL-60 (Figura 5B) sugieren que el citocromo c está directamente involucrado en el efecto antitumoral de la tamarixetina, sus niveles aumentaron espectacularmente en el citosol en respuesta a concentraciones crecientes del flavonoide. La evaluación en paralelo de los niveles de citocromo c mitocondrial, orgánulo donde esta proteína reside en condiciones normales y en donde desempeña su función como transportador electrónico en la respiración celular, claramente pone de manifiesto que disminuyen proporcionalmente con concentraciones crecientes de tamarixetina.

Modulación de las proteínas reguladoras del ciclo celular

La proliferación y la muerte celular son complejos procesos que están estrechamente conectados de mo-

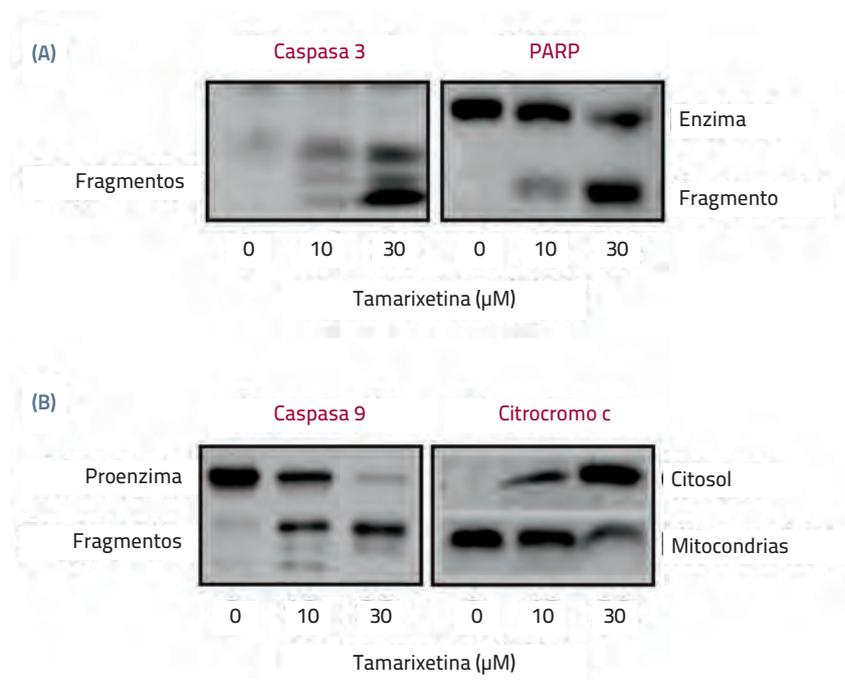


Figura 5. La tamarixetina induce activación proteolítica de la caspasa-3 y liberación de citocromo c al citosol en células HL-60. Las células se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de Tamarixetina durante 24 horas, se lisaron y se obtuvo el citosol y las fracciones mitocondrial y nuclear. Las muestras se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida y se analizaron por Western-blot, haciendo uso de anticuerpos específicos para caspasa-3, caspasa-9 y citocromo c, y un sistema de detección por quimioluminiscencia. (A) Efecto sobre la activación proteolítica de la caspasa-3 y sobre la inactivación por proteólisis de la proteína nuclear PARP. (B) Efecto sobre la activación proteolítica de caspasa-9 y sobre los niveles de citocromo c en el citosol y en la fracción mitocondrial.

do que la apoptosis puede desencadenarse como consecuencia de la perturbación del ciclo celular. El análisis por citometría de flujo demuestra que la tamarixetina incrementa notablemente la proporción de células en la fase G_2-M (Figura 3A), sugiriendo que este compuesto interfiere en la transición a la siguiente fase del ciclo celular, la fase G_1 (de G_2 a M o de M a G_1). Para conocer con más detalle el mecanismo de acción de este metoxiflavonoide, se evaluaron por Western-

blot diversos factores reguladores del ciclo celular. Las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) constituyen una amplia familia de serina/treonina quinasas involucradas en el control de la progresión del ciclo celular. Las Cdks aportan la subunidad catalítica y requieren de su asociación con otro factor proteico (ciclinas) para ser plenamente funcionales. La fosforilación / desfosforilación del complejo constituye un mecanismo adicional de control. El miembro más importan-

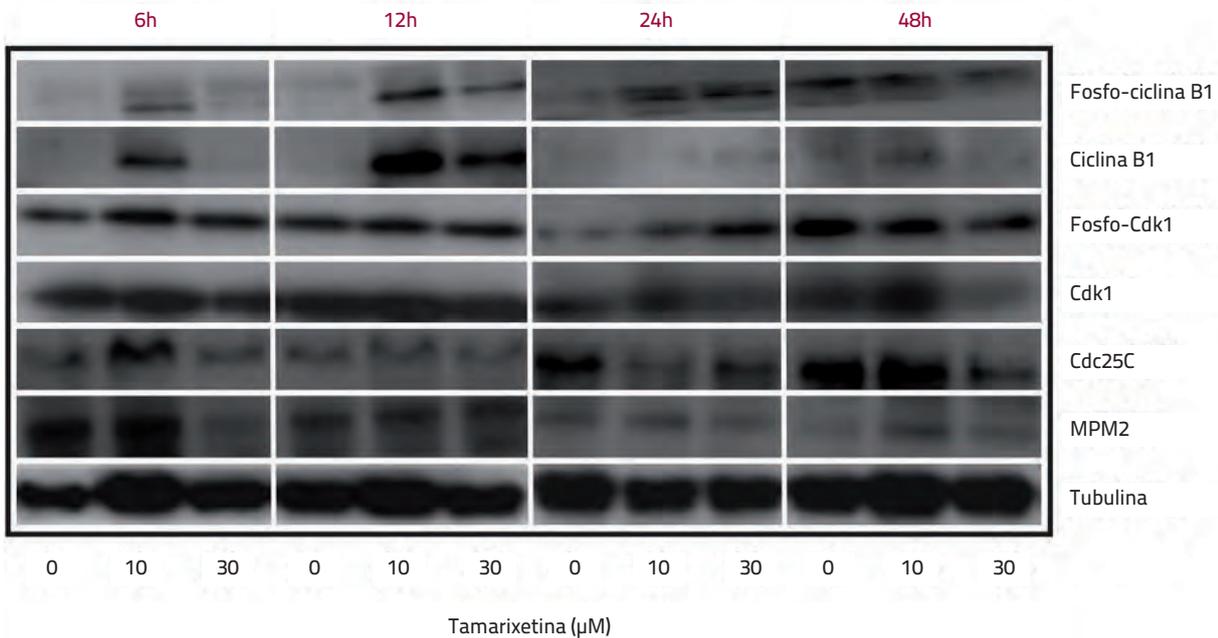


Figura 6. Determinación del efecto de la tamarixetina sobre las proteínas del ciclo celular en células promielocíticas humanas HL-60. Las células se incubaron durante tiempos variables (6, 12, 24 ó 48 horas) en presencia de las concentraciones indicadas de tamarixetina y las muestras se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida y se analizaron por Western-blot con anticuerpos específicos para las proteínas del ciclo celular ciclina B1 (fosforilada y no fosforilada), Cdk1 (fosforilada y no fosforilada), MPM2 y Cdc25C. Como control que se ha cargado y transferido la misma cantidad de proteínas en todos los grupos experimentales en el estudio se incluyó a la tubulina.

te de esta familia, Cdk1, interviene en el control sobre las diferentes fases del ciclo celular y es activado en la fase G₂ mediante formación de un heterodímero con la ciclina B1. Los resultados en HL-60 ponen de manifiesto que la tamarixetina incrementa significativamente los niveles de la ciclina B1 y de su forma fosforilada, efecto que es apreciable desde las seis horas de tratamiento, mientras que los niveles de Cdk1 y su forma fosforilada no parecen verse afectados.

Las especies reactivas del oxígeno, ROS, actúan como mediadores

Durante la respiración celular el oxígeno molecular es mayoritariamente reducido a agua en la matriz mitocondrial mientras que una pequeña proporción (1-2%) se reduce parcialmente a anión superóxido (O₂⁻), que a su vez puede ser trans-

formado en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y en el radical hidroxilo (OH[•]). Desde el punto de vista cuantitativo, la cadena transportadora mitocondrial representa el principal lugar de formación de estas especies altamente reactivas del oxígeno, especies oxidantes conocidas genéricamente por ROS. Aunque inicialmente consideradas como productos tóxicos secundarios al metabolismo energético, estas especies químicas pueden también generarse por reacciones enzimáticas no relacionadas con la generación de energía celular (NADPH oxidasa, lipooxigenasa, ciclooxigenasa, triptófano hidrolasa) y desempeñan importantes funciones en la señalización intracelular que regula la proliferación y la muerte celular.

Para conocer si ROS actúa como mediador en el efecto citotóxico de la tamarixetina, las células HL-60

se incubaron en presencia del flavonoide y se analizaron por citometría de flujo haciendo uso de una sonda fluorescente (DCF-DA) que es sensible al estado oxidativo celular. Los resultados ponen de manifiesto la existencia de un aumento evidente en la concentración intracelular de ROS en las células tratadas con tamarixetina (Figura 7A) y demuestran que los máximos niveles de estas especies oxidantes se alcanzan rápidamente, dentro de los primeros 30 minutos de tratamiento (Figura 7B). Cuando las células se preincubaron en presencia del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC), éstas se volvieron completamente resistentes al efecto citotóxico de la tamarixetina (Figura 7C) lo que sugiere que la producción de ROS es un elemento esencial en la acción antitumoral de este metoxiflavonoide.

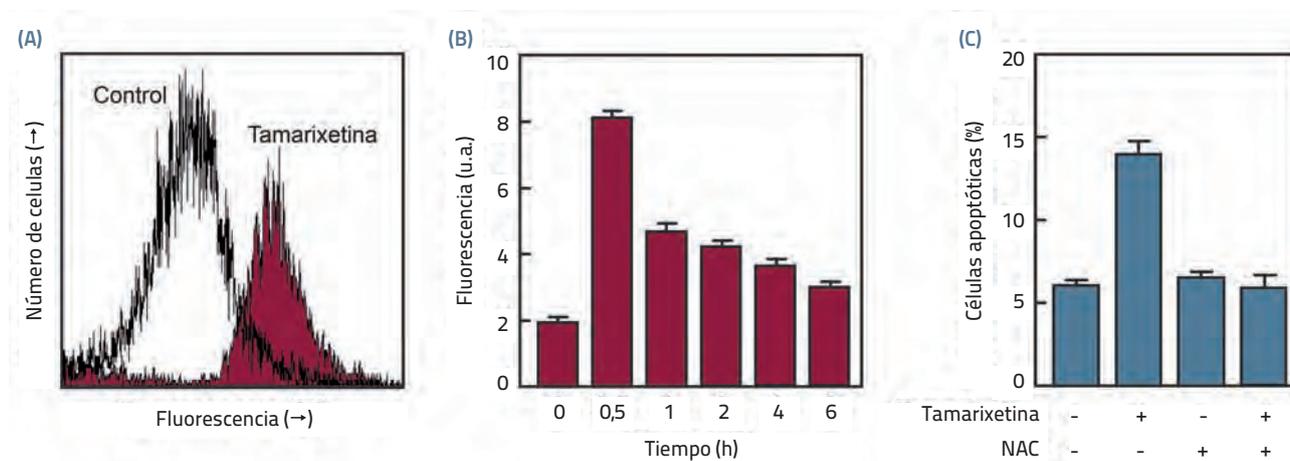


Figura 7. Estudio del efecto de la tamarixetina sobre la producción de ROS y su relación con la apoptosis en células HL-60. (A) Las células se incubaron en presencia de Tamarixetina durante 30 minutos y se analizaron por citometría de flujo en presencia de una sonda fluorescente (H2-DCF-DA) que es altamente sensible al estado oxidativo intracelular. (B) La tamarixetina induce generación de ROS de forma rápida y transitoria. Las células se incubaron en presencia del flavonoide durante los tiempos indicados y se analizaron por citometría de flujo, en presencia de H2-DCF-DA. (C) Efecto de los antioxidantes sobre la inducción de la apoptosis activada por Tamarixetina. Las células se preincubaron con el antioxidante N-acetil-cisteína y el efecto del flavonoide sobre el porcentaje de células apoptóticas se determinó por citometría de flujo.

Conclusiones

Muchos fármacos utilizados actualmente en quimioterapia son derivados de productos de origen vegetal como es el caso del paclitaxel, los alcaloides de vinca, camptotecin, etopósido etc. Los flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos fenólicos sintetizados por las plantas y que poseen múltiples actividades biológicas en organismos superiores. Estudios epidemiológicos y evaluaciones experimentales realizadas tanto *in vitro* como *in vivo* demuestran que ciertos flavonoides presentan propiedades antitumorales y sugieren que estos puedan ser utilizados en el futuro como base para el desarrollo de compuestos más potentes y más específicos. En el presente trabajo hemos evaluado la actividad citotóxica de la tamarixetina, derivado natural metoxilado del flavonoide más abundante en la naturaleza, la quercetina. Los resultados ponen de manifiesto que la Tamarixetina ejerce una intensa actividad antitumoral en células leucémicas humanas a través de un mecanismo que implica muerte celular por apoptosis. El proceso es dependiente de la activación de las caspasas -3, -8 y -9 y de la generación de especies químicas derivada del oxígeno, ROS, que actúan como intermediarios en el efecto citotóxico.

Referencias bibliográficas

- Hail N Jr, Lotan R (2009) *Mol Nutr Food Res* 53: 49-67.
 Arts IC (2008) *J Nutr* 138: 1561S-1566S.
 Ramos S (2007) *J Nutr Biochem* 18: 427-442.
 Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L and Zhang L (2003) *Med Res Rev* 23: 519-534.
 Havsteen B H (2002) *Pharmacol Ther* 96: 67-202.
 Middleton E, Kandaswami C and Theoharides TC (2000) *Pharmacol Rev* 52: 673-751.
 Watson W, Cai J, Jones D (2000) *Annu Rev Nutr* 108: 153-164.
 Karmakar S, Davis KA, Choudhury SR, Deeconda A, Banik NL, Ray SK (2009) *Biochem Biophys Res Commun* 388:705-710.
 Ishii K, Tanaka S, Kagami K, Henmi K, Toyoda H, Kaise T, Hirano T (2009) *Cancer Invest*.
 Ramos AM, Aller P (2008) *Biochem Pharmacol* 15: 1912-1923.
 Sasaki M, Nakamura H, Tsuchiya S et al (2007) *Biol Pharm Bull* 30: 682-6.
 Rubio S, Quintana J, López M et al (2006) *Eur J Pharm* 548: 9-20.
 Michels G, Watjen W, Niering P et al (2005) *Toxicology* 206: 337-348.

- Yu Z, Li W and Liu F (2004) *Cancer Lett* 215: 159-166.
- Tamura S, Bito T, Ichihashi M et al (2003) *Pigment Cell Res* 16: 470-476.
- Elattar T and Virji A (2000) *Anticancer Res* 20: 1733-1738.
- Wang I, Lin-Shiau S and Lin J (1999) *Eur J Cancer* 35: 1517-1525.
- Constantinou A, Kamath N and Murley J (1998) *Eur J Cancer* 34: 1927-1934-
- Sánchez Y, Amrán D, de Blas E, Aller P (2009) *Biochem Pharmacol* 77: 384-96.
- Torres F, Quintana J, Díaz JG, Carmona AJ, Estévez F (2008) *Apoptosis* 13:716-28.
- Sánchez Y, Amrán D, Fernández C, de Blas E, Aller P (2008) *Int J Cancer* 123:1205-14.
- Rubio S, Quintana J, Eiroa J et al (2007) *Carcinogenesis* 28: 2105-2113.
- Kim JH, Lee EO, Lee HJ et al (2007) *Ann N Y Acad Sci* 1095: 598-611.
- Perez-Vizcaino F, Bishop-Bailley D, Lodi F et al (2006) *Biochem Biophys Res Commun* 346: 919-925.
- Lee HJ, Wang CJ, Kuo HC et al (2005) *Toxicol Appl Pharmacol* 203: 124-131.
- Lee ER, Kang YJ, Kim JH et al (2005) *J Biol Chem* 280: 31498-507.
- Nguyen,TT, Tran E, NguyenTH et al (2004) *Carcinogenesis* 25: 647-659.
- Lee WR, Shen SC, Lin HY et al (2002) *Biochem Pharmacol* 63: 225-236.
- Linford N, Yang Y, Cook D et al (2001) *J Pharmacol Exp Ther* 299: 67-75.
- Chang YH et al (2009) *J Med Chem* 52:4883-4891.
- Rubio S, Quintana J, Eiroa JL, Triana J, Estévez F (2009) *Mol Carcinog* 49:32-43.
- Haïdara K, Zamir L, Shi QW, Batist G (2006) *Cancer Lett* 242:180-190.
- Beutler JA, Hamel E, Vlietinck AJ et al (1998) *J Med Chem* 41: 2333-2338.
- Gupta K and Panda D (2002) *Biochemistry* 41: 13029-13038.
- McDonnell MA, Wang D, Khan SM et al (2003) *Cell Death Differ* 10: 1005-1015.
- Forman HJ, Maiorino M, Ursini F (2010) *Biochemistry* 49: 835-842.
- Winyard PG, Moody CJ, Jacob C (2005) *Trends Biochem Sci* 30: 453-461.

Reseña curricular

María Cristina Hernández Alemán , nació en Las Palmas de Gran Canaria el 9 de Abril de 1980 y realizó la Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos en la Universidad de La Laguna. Actualmente realiza su tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria y participa activamente en el desarrollo de diversos proyectos de investigación sobre la actividad antitumoral de compuestos naturales y sintéticos. Es primera autora del trabajo *Evaluation of synthetic flavonoids on the growth of human leukaemia cell lines* presentado en el XXXI Congreso de la Sociedad Española de Farmacología, en Sevilla.

Dirección: Departamento de Bioquímica, Biología molecular, Fisiología, Genética e Inmunología.
 Facultad de Ciencias de la Salud.
 Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
 Plaza Dr. Pasteur s/n. Campus de San Cristóbal. 35016
 Las Palmas de Gran Canaria.
 Teléfono: 928 458792
 Correo electrónico: cris.haleman@gmail.com