



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA**

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

# **TESIS DOCTORAL**

**Programa de Doctorado:**  
Investigación aplicada a las Ciencias Sanitarias

## **CITOTOXICIDAD DE LA EUPATORINA EN CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS**

**Sara Estévez Sarmiento**

**2016**

**Las Palmas de Gran Canaria**







**D JUAN FRANCISCO LORO FERRER,  
COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
INVESTIGACIÓN APLICADA A LAS CIENCIAS SANITARIAS, DE  
LA ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE LAS  
PALMAS DE GRAN CANARIA, EN CALIDAD DE PRESIDENTE  
DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO**

**CERTIFICA,**

Que la citada Comisión en su sesión de uno de Junio tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "**Citotoxicidad de la Eupatorina en células leucémicas humanas**" presentada por la doctoranda D<sup>a</sup> Sara Estévez Sarmiento y dirigida por los Doctores Francisco Estévez Rosas y José Quintana Aguiar.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 8 del Reglamento de Estudios de Doctorado de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a 1 de Junio de dos mil dieciséis



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**Programa de Doctorado**

Investigación aplicada a las Ciencias Sanitarias

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

**TÍTULO**

**CITOTOXICIDAD DE LA EUPATORINA EN CÉLULAS LEUCÉMICAS  
HUMANAS**

**Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de  
Gran Canaria presentada por la Licenciada en Medicina D<sup>a</sup>. Sara Estévez  
Sarmiento**

---

**La Doctoranda**

**El Director**

**El Director**

**D<sup>a</sup> Sara  
Estévez Sarmiento**

**Dr. Francisco  
Estévez Rosas**

**Dr. José  
Quintana Aguiar**

Las Palmas de Gran Canaria, a 8 de Abril de 2016





# ÍNDICE

---



# ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Importancia biomédica de los flavonoides.	21
1.2. Estructura química de los flavonoides.	21
1.3. Actividades biológicas de los flavonoides.	23
1.4. Inhibición de la proliferación celular. Detención del ciclo celular.	27
1.5. Apoptosis.	31
1.5.1. Caspasas.	33
1.5.2. Vía intrínseca. Proteínas de la familia Bcl-2.	36
1.5.3. Vía extrínseca. Receptores de la muerte.	39
1.5.4. Estrés oxidativo y apoptosis.	42
1.5.5. Lisosomas y Retículo Endoplasmático en la apoptosis.	43
1.6. Vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).	44
1.7. Fuentes de eupatorina, ensayos biológicos previos en células de cáncer y planteamiento de investigación.	49
2 OBJETIVOS	53
3 MATERIAL Y MÉTODOS	57

## Índice

3.1. Reactivos.	59
3.2. Grandes equipos utilizados	61
3.3. Modelo experimental.	62
3.3.1. Cultivo de células leucémicas humanas HL-60, U937 y MOLT-3.	62
3.3.2. Tratamiento de las células con eupatorina.	62
3.4. Métodos.	63
3.4.1. Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> y estudios de la proliferación celular: MTT.	63
3.4.2. Tinción con el fluorocromo bisbenzimidida.	64
3.4.3. Fragmentación del ADN.	64
3.4.4. Cuantificación de células hipodiploides (subG <sub>1</sub> ) y de las fracciones G <sub>1</sub> , S y G <sub>2</sub> /M por citometría de flujo.	65
3.4.5. Determinación de las células apoptóticas mediante el análisis de la externalización de fosfatidilserina.	66
3.4.6. Determinación de la actividad caspasa.	67
3.4.7. Inmunodetección de proteínas por transferencia Western.	68
3.4.8. Determinación de la generación intracelular de especies reactivas de oxígeno.	70
3.5. Métodos estadísticos.	71
4. RESULTADOS	
Evaluación de la actividad antiproliferativa de la eupatorina.	73
4.1. La eupatorina inhibe el crecimiento y la viabilidad de la línea celular de leucemia humana HL-60.	75

	<i>Índice</i>
4.2. La eupatorina induce apoptosis en células de leucemia mieloide humana.	76
4.3. La eupatorina induce la muerte celular mediada por la activación de caspasas.	80
4.4. La eupatorina activa las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).	85
4.5. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son necesarias para la muerte celular inducida por la eupatorina.	87
5. DISCUSIÓN	91
6. CONCLUSIONES	99
7. BIBLIOGRAFÍA	103
8. ANEXO: Publicación a la que ha dado lugar esta tesis.	113



## **ABREVIATURAS**

---





## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
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
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-tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis- <i>N,N'</i> -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 <i>N</i> -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
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

## *Abreviaturas*

NAC	<i>N</i> -acetil-L-cisteína
NF-κB	Factor nuclear κB
p21	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclinas
p38	Proteína quinasa activada por mitógenos p38
p53	Proteína supresora de tumores
PARP	Poli(ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PD98059	Inhibidor de MEK1
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 del 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
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -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-VAD-fmk	Inhibidor general de caspasas

# **INTRODUCCIÓN**

---



### **1.1. Importancia Biomédica de los Flavonoides**

Dentro del gran grupo de los compuestos polifenólicos, los flavonoides constituyen una clase de metabolitos secundarios de las plantas que poseen un amplio espectro de actividades farmacológicas incluyendo actividades anti-cancerígenas. Se ha descrito que estos compuestos interfieren en la iniciación, en la promoción y en la progresión del cáncer a través de la modulación de diferentes enzimas y receptores en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la inflamación, la angiogénesis, la metástasis y en la reversión de la multirresistencia a fármacos. Debido a sus múltiples mecanismos de acción se está llevando a cabo un importante esfuerzo en la investigación de las potenciales aplicaciones en la terapia anti-cancerígena de los flavonoides tanto naturales como sintéticos.

### **1.2. Estructura Química de los Flavonoides.**

El término 'flavonoide' se usa generalmente para describir un amplio grupo de productos naturales que poseen un esqueleto carbonado C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, o más específicamente un esqueleto fenilbenzopirano [el sistema cíclico benzopirano también se denomina cromano, (1)] (Figura 1). Químicamente los flavonoides son polifenoles que poseen una estructura básica que consta de dos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de un anillo C heterocíclico de pirano o pirona (con un doble enlace) central. De acuerdo a la nomenclatura IUPAC [1], estos grupos se dividen en flavonoides (2), isoflavonoides (3) y los neoflavonoides (4), basado en la posición del enlace del anillo fenilo al núcleo benzopirano. El núcleo básico fenilbenzo- $\gamma$ -pirona (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) de los flavonoides puede existir tanto como aglicona libre o conjugado con azúcares formando glucósidos. Los flavonoides se subdividen además en

## *Introducción*

flavanonas (**5**), flavonas (**6**), dihidroflavonoles (**7**), flavonoles (**8**), flavanoles (**9**, **10** y **11**, incluyendo las catequinas) y antocianidinas (**12**) (Figura 1). Esta clasificación se basa en la presencia (o ausencia) de un doble enlace en la posición 4 del anillo C central, la presencia (o ausencia) de un doble enlace entre los átomos de carbono 2 y 3 del anillo C, el patrón de sustitución del anillo C y la apertura del anillo de pirano central [2] (Figura 1). En la estructura flavonoide, un grupo fenilo ocupa normalmente la posición 2 del anillo de pirona. Los flavonoides y los tocoferoles (vitamina E) comparten una estructura común, el anillo de cromano.

En los isoflavonoides, la sustitución del grupo fenilo tiene lugar en la posición 3. Constituyen una subclase distinta de la familia flavonoides que contiene el esqueleto 3-fenilbenzopirano, biosintéticamente derivada por la migración 1,2-arilo de un precursor 2-fenilbenzopirano. Los neoflavonoides son estructuralmente y biogénicamente relacionados con los flavonoides y los isoflavonoides. Las neoflavonas son conocidas en la literatura como 4-arilcumarinas. Los productos naturales como las chalconas (**13**) y las auronas (**14**) se consideran flavonoides minoritarios y también contienen el esqueleto C6–C3–C6.

Todas las plantas son capaces de sintetizar flavonoides. La biosíntesis comienza invariablemente a partir del aminoácido fenilalanina y toma diferentes rutas, pero relacionadas, dependiendo del tipo de flavonoides. Los flavonoides son abundantes en la dieta humana y presentan una toxicidad relativamente baja comparada con otros principios activos de plantas, por ejemplo los alcaloides, un grupo compuestos nitrogenados derivados de aminoácidos, que poseen potente acción fisiológica en los animales incluso a bajas dosis.

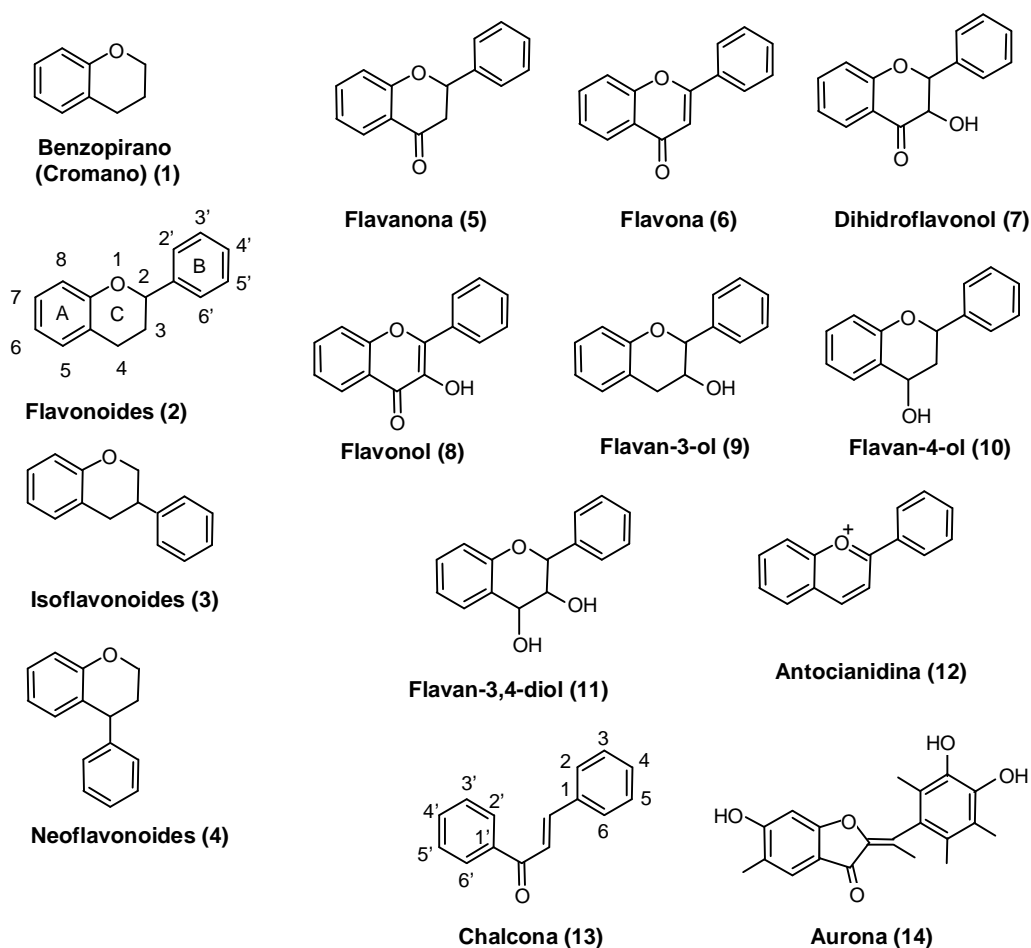


Figura 1. Estructuras de tipos de flavonoides.

### 1.3. Actividades Biológicas de los Flavonoides.

Determinados flavonoides inducen parada del ciclo celular y muerte celular, que son características clave de la acción de los compuestos utilizados en la quimioterapia en células leucémicas [3]. Dentro del grupo de los flavonoides, las flavonas aisladas de fuentes vegetales se caracterizan por poseer múltiples patrones de sustitución en el esqueleto fenilbenzo- $\gamma$ -pirona. Esta diversidad estructural es la que les confiere su amplio espectro de actividades biológicas. Además de proteger a las plantas de enfermedades microbianas, se ha demostrado que las flavonas exhiben

## *Introducción*

una serie de actividades biológicas útiles, incluyendo actividades frente a enfermedades metabólicas e infecciosas. Específicamente presentan actividades antiinflamatorias, antiestrogénicas, antimicrobianas, antialérgicas, antioxidantes, antitumorales y citotóxicas. Las primeras revisiones de Middleton y colaboradores y de Harborne y Williams describieron la interacción de flavonoides y flavonas con células de mamíferos [2,4]. Desde entonces, ha habido un gran progreso en el conocimiento del efecto de las flavonas sobre determinadas enfermedades metabólicas como la arterioesclerosis, la diabetes, el cáncer y la enfermedad de Alzheimer, y también sobre las enfermedades infecciosas como la malaria. Muchos de estos efectos de las flavonas son el resultado de sus actividades como (i) inhibidores de proteínas tirosina quinasa, (ii) inhibidores de Ser/Thr (serina/treonina) quinasa, (iii) inhibidores de topoisomerasas, (iv) agentes antiangiogénicos, (v) agentes antioxidantes y (vi) moduladores de la multirresistencia a fármacos.

Las tirosina quinasa son enzimas que catalizan la fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas y median la transducción de muchas señales extra- e intracelulares. Estas proteínas quinasa están implicadas en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular así como en la oncogénesis. La comparación del efecto inhibitor sobre la proteína tirosina quinasa p40 de las diferentes clases de flavonoides ha puesto de manifiesto que las flavonas y los flavonoles son mejores inhibidores de esta tirosina quinasa que sus correspondientes flavanonas o isoflavonas, así como el requerimiento de un doble enlace C-2 y C-3 y la posición del anillo B en el C-2 para la actividad inhibidora proteína tirosina quinasa [5].



Las flavonas crisina y baicaleína (Figura 2) poseen actividad inhibidora de la DNA topoisomerasa II [6,7]. Mientras que la acacetina, la apigenina y la luteolina inhiben la re-ligación del ADN catalizada por la topoisomerasa I [8]. Se ha descrito que la flavona luteolina (Figura 2) se une a la proteína quinasa C (PKC) inhibiéndola [9]. PKC es una Ser/Thr quinasa que cataliza la fosforilación de los grupos hidroxilos de los residuos de serina y treonina en las proteínas celulares. Este enzima juega un importante papel en varias cascadas de transducción de la señal. Cuando se activa por un promotor de tumores (por ejemplo, un éster de forbol), puede fosforilar a potentes activadores de la transcripción, lo que conduce de esta manera a una expresión de oncogenes que promueven la progresión del cáncer [10].

Determinadas flavonas inhiben a las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) que son serina/treonina quinasas implicadas en la regulación del ciclo celular. De los estudios estructura-actividad se pone de manifiesto que el C4-oxo y el doble enlace C2–C3 son cruciales para la actividad inhibidora. La presencia de un grupo 3'-OH en el anillo B como en luteolina está correlacionada con un bloqueo en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, mientras que su ausencia como en la apigenina (Figura 2) está asociada con una detención en la fase G<sub>2</sub> [11].

La tangeretina (5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona, Figura 2) inhibe la proliferación de las células de carcinoma de colon COLO 205 a través de la modulación de las actividades de varias proteínas reguladoras clave de G<sub>1</sub>, tales como Cdk2 y Cdk4, e induce la expresión de los inhibidores de Cdk p21 y p27 [12]. La flavona eupatorina reduce la migración de las células endoteliales HUVEC y su capacidad para formar tubos [13] y la wogonina presenta propiedades antiangiogénicas [14,15].

## Introducción

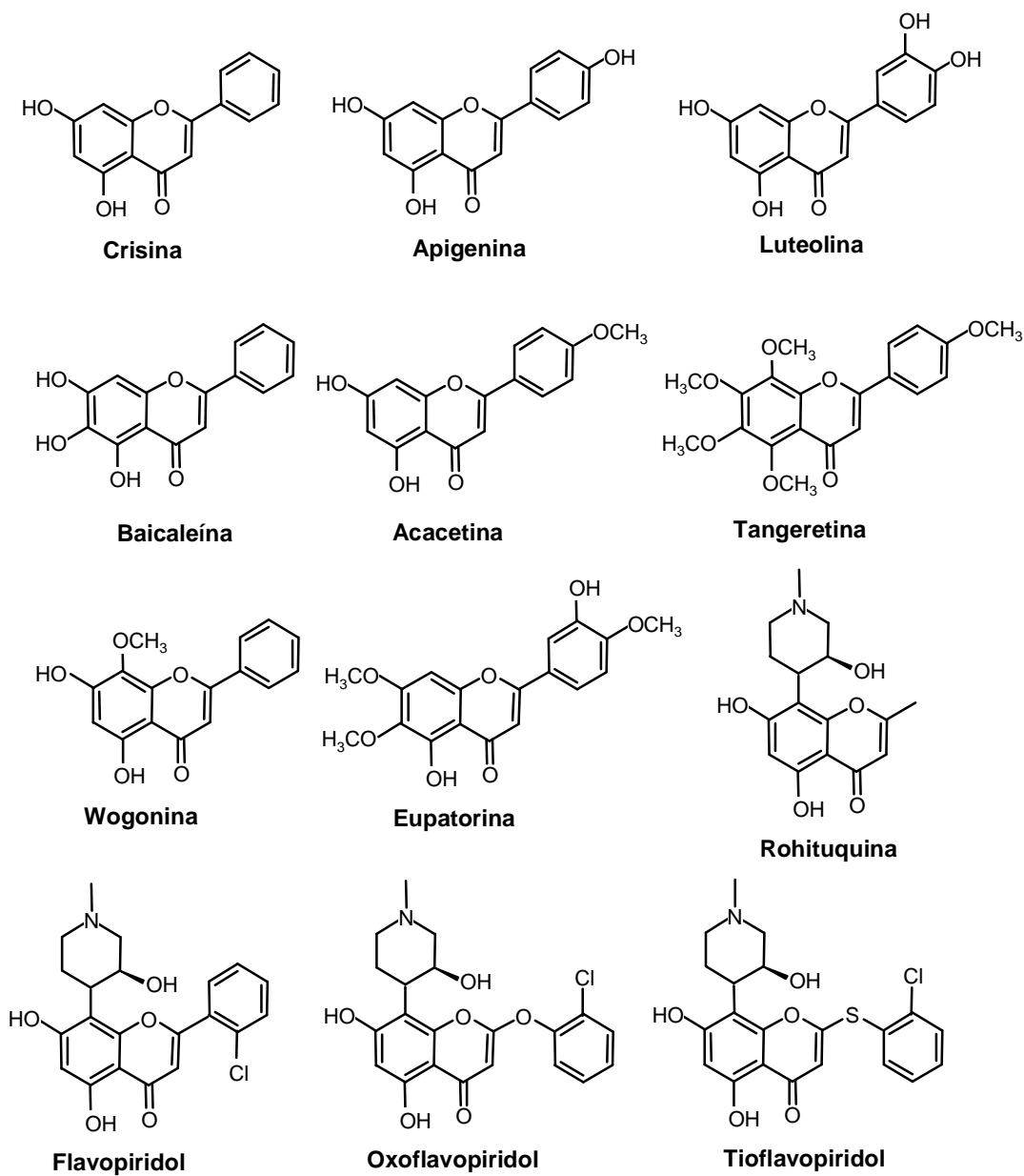


Figura 2. Estructuras Químicas de Flavonas. Esqueleto general de las flavonas y estructuras de flavonas naturales y los derivados semisintéticos flavopiridol, oxflavopiridol y tioflavopiridol. Se incluye la estructura del alcaloide natural rohituquina.

El flavopiridol (Figura 2) es un análogo semisintético del alcaloide natural rohituquina, aislada del árbol indio *Dysoxylum binectiferumun*. El flavopiridol

compite directamente con el sustrato ATP e inhibe múltiples CDKs, incluyendo CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, y CDK7. Se encuentra actualmente en desarrollo clínico para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica [16]. Los oxo- y tio-análogos del flavopiridol poseen mejor selectividad para CDK1, presentando valores de IC<sub>50</sub> de 130 y 110 nM, respectivamente [17].

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una correlación entre el consumo de flavonoides y una disminución del riesgo de padecer cáncer [18]. 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*, se ha llegado a la conclusión que muchos mecanismos pueden estar implicados en su acción. Entre ellos se incluyen: (i) la inactivación de carcinógenos, (ii) la actividad antiproliferativa, (iii) la detención del ciclo celular, (iv) la inhibición de la angiogénesis, (v) la actividad antioxidante y (vi) la modulación de la multirresistencia a fármacos [19]. Estos resultados han estimulado el desarrollo de los flavonoides en los ensayos clínicos humanos.

#### **1.4. Inhibición de la proliferación celular. Detención del ciclo celular.**

El ciclo celular de una célula eucariota se divide en cuatro fases diferenciadas (Figura 3) [20]:

- La fase G<sub>1</sub> del ciclo constituye el intervalo entre la mitosis y el inicio de la replicación del ADN. Durante esta fase la célula es metabólicamente activa y está creciendo.
- La fase S o de síntesis se produce la duplicación del ADN.

## Introducción

- La fase  $G_2$  tiene lugar justo después de la fase  $S$  y la célula prosigue su crecimiento y se sintetizan proteínas necesarias para la mitosis.
- Y finalmente, la fase  $M$  del ciclo corresponde a la mitosis, la división nuclear, en la que tiene lugar la separación de los cromosomas hijos y que, normalmente, finaliza en la división celular (citoquinesis).

La progresión de las células animales a través del ciclo celular se regula principalmente por factores de crecimiento extracelulares. Si estos factores no están disponibles en  $G_1$ , las células entran en un estado de reposo denominado  $G_0$  (células quiescentes). Las células en  $G_0$  son metabólicamente activas aunque no proliferan.

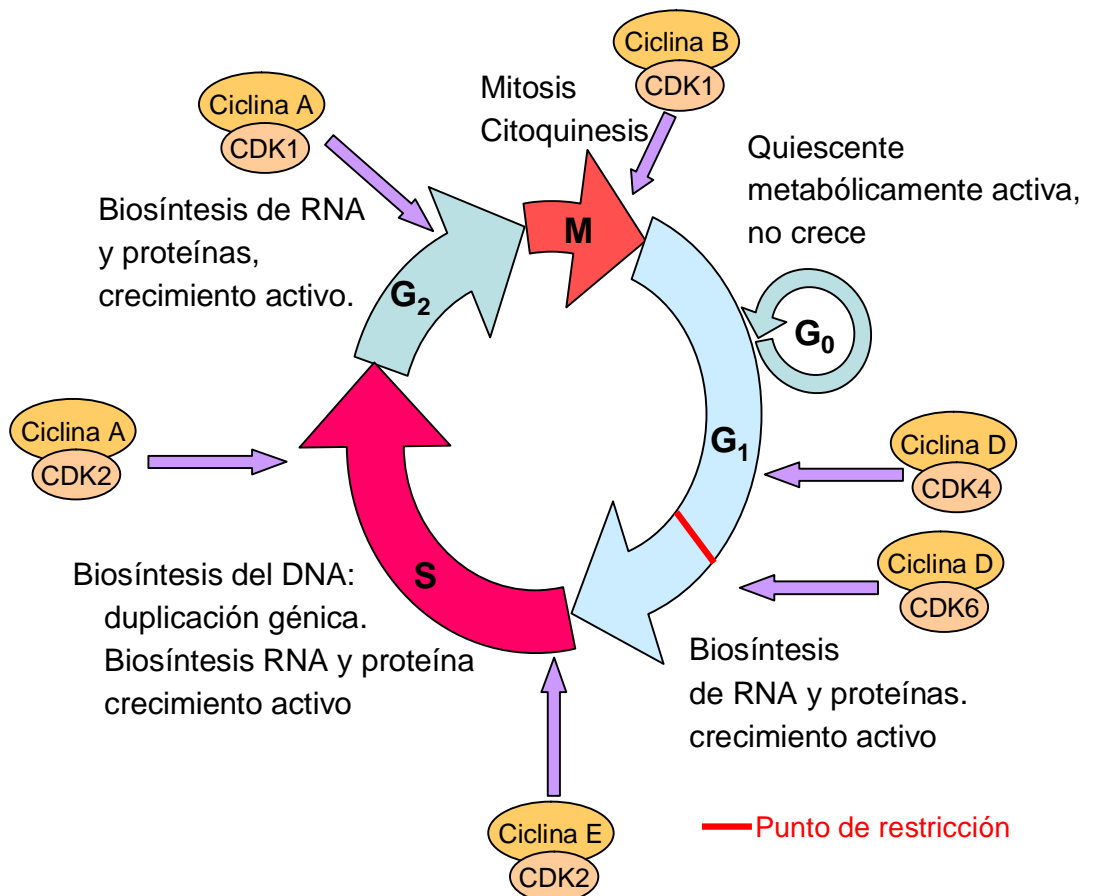


Figura 3. Regulación del ciclo celular. La presencia de factores de crecimiento apropiados controla el ciclo celular en un punto de la fase  $G_1$  denominado punto de

restricción. Los complejos de CDK4 y CDK6 con ciclinas del tipo D desempeñan un papel clave en la progresión del ciclo a través del punto de restricción. Más adelante en G<sub>1</sub> los complejos CDK2/ciclina E se requieren para el paso de G<sub>1</sub> 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<sub>2</sub> 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 proteínas 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 (quinasa activadora de CDK). Estas 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. En definitiva, existen al menos cuatro mecanismos moleculares de regulación de la actividad de las CDKs: (i) asociación de las CDKs con sus correspondientes ciclinas; (ii) la fosforilación activadora de la treonina 160; (iii) la fosforilación inhibidora de la Thr14 y la Tyr15 y (iv) unión de los complejos CDK/ciclinas con proteínas inhibidoras (inhibidores de CDK o CKIs).

## *Introducción*

Existen puntos de control adicionales (checkpoints) en cada fase. En respuesta al daño al ADN, los puntos de control 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  $G_1/S$ ) o después de la replicación del ADN (checkpoint  $G_2/M$ ) y probablemente en las fases S y M. En el checkpoint  $G_1/S$  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 elevación de su expresión. Las proteínas quinasas ATM y Chk2 se activan en respuesta al ADN dañado y fosforilan a p53 evitando su degradación. Este factor de transcripción induce diferentes genes, como por ejemplo p21 y Bax. La proteína p21 es un inhibidor de CDK (CKI), que una vez inducida inhibe CDK y detiene el ciclo celular evitando la replicación del ADN dañado.

En los diferentes tipos de cáncer hay una proliferación incontrolada de células debido a una alteración en el control de la división celular. 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 implicadas en la detención del ciclo celular en los puntos de control de  $G_1$ , S y  $G_2$  [21]. Existen distintas estrategias terapéuticas de modulación de la actividad de CDK, como la inhibición de la actividad catalítica de las CDKs (estrategia directa) o la modulación de los reguladores de la actividad de CDK (estrategia indirecta). Las estrategias indirectas incluyen la expresión elevada de inhibidores de CDK (CKI), la síntesis de péptidos que mimetizan 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 (un análogo del alcaloide natural rohituquina) y sus derivados oxoflavopiridol y tioflavopiridol [20].

La tubulina es una proteína heterodimérica con una estructura  $\alpha,\beta$ -dimérica, y se encuentra en equilibrio dinámico con los microtúbulos poliméricos. Estos desempeñan un papel crucial en múltiples funciones celulares como la proliferación y la división celular, la movilidad, la fagocitosis, el transporte y la localización intracelular de orgánulos [22]. Debido a que los microtúbulos son los principales constituyentes del huso mitótico, la tubulina desempeña un papel crucial en la división celular. Los compuestos que interfieren con este equilibrio, tanto estabilizando los microtúbulos o inhibiendo su formación, son potenciales anticancerígenos, haciendo de la tubulina una diana clave en el descubrimiento de fármacos contra el cáncer. Algunos compuestos que afectan a la polimerización de la tubulina como la colchicina, la vinblastina (agentes despolimerizantes) y el paclitaxel (agente polimerizante) ya están en el mercado. Estos fármacos 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 detención 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 acuñado por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 para describir una forma de la muerte celular distinta morfológicamente [23]. La apoptosis desempeña un papel esencial en la supervivencia de los organismos

## *Introducción*

multicelulares y su desarrollo. La desregulación de este proceso puede causar enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes y muchos tipos de cáncer.

Durante la apoptosis, las células sufren una serie de cambios morfológicos: disminuyen de tamaño, se condensan y luego se fragmentan, liberando pequeños cuerpos apoptóticos rodeados por membranas que son fagocitados por macrófagos, células parenquimales o células neoplásicas y son degradados en los fagolisosomas [24]. El núcleo de las células apoptóticas se condensa y el DNA se fragmenta, pero los constituyentes celulares no se liberan al medio extracelular. La membrana plasmática permanece intacta.

El mecanismo de apoptosis es complejo y sofisticado e incluye una cascada de eventos moleculares dependientes de energía. Existen al menos 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 convergen para iniciar la vía de ejecución.

Las modificaciones bioquímicas que presentan las células apoptóticas incluyen: (i) la hidrólisis y la reticulación de las proteínas, (ii) la fragmentación del ADN y (iii) la expresión de los marcadores de reconocimiento fagocítico en la membrana celular. La reticulación de las proteínas se induce por la expresión y la activación de la transglutaminasa tisular dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta enzima cataliza uniones específicas entre las cadenas laterales de glutamato y de lisina de las proteínas intra- y extracelulares, siendo responsable de la estabilización estructural observada en el proceso de la muerte celular apoptótica [25]. 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 [26]. Esta “escalera de ADN” característica se puede visualizar en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta. La expresión de los marcadores fagocíticos en la superficie celular constituye otra característica bioquímica de la apoptosis que permite a las células vecinas reconocer y fagocitar rápidamente a las células apoptóticas. La fosfatidilserina es un fosfolípido que normalmente se localiza en la cara interna de la membrana plasmática y se transloca a la cara externa en los estadios tempranos del proceso de apoptosis. La proteína anexina V se une a fosfatidilserina en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  permitiendo detectar las células apoptóticas por citometría de flujo, previa incubación de las células con anexina V unida al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) [27,28]. Aunque la externalización de la fosfatidilserina es un marcador bien establecido 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 mayoría de los cambios morfológicos detectados durante la muerte celular por apoptosis están causados por la activación de un grupo de enzimas proteolíticas o proteasas denominadas caspasas, llamadas así porque contienen un residuo de cisteína clave en el centro activo y cortan o hidrolizan selectivamente proteínas en los sitios inmediatos en dirección C-terminal de residuos de aspartato. Se han identificado al menos catorce caspasas siendo diez las más comunes, que se clasifican en iniciadoras (caspasas-2,-8,-9,-10), ejecutoras (caspasas-3,-6,-7) e inflamatorias

## *Introducción*

(caspasas-1,-4,-5) [29,30]. La especificidad de las caspasas viene determinada por los cuatro residuos de aminoácidos *N*-terminales del sitio de corte [31].

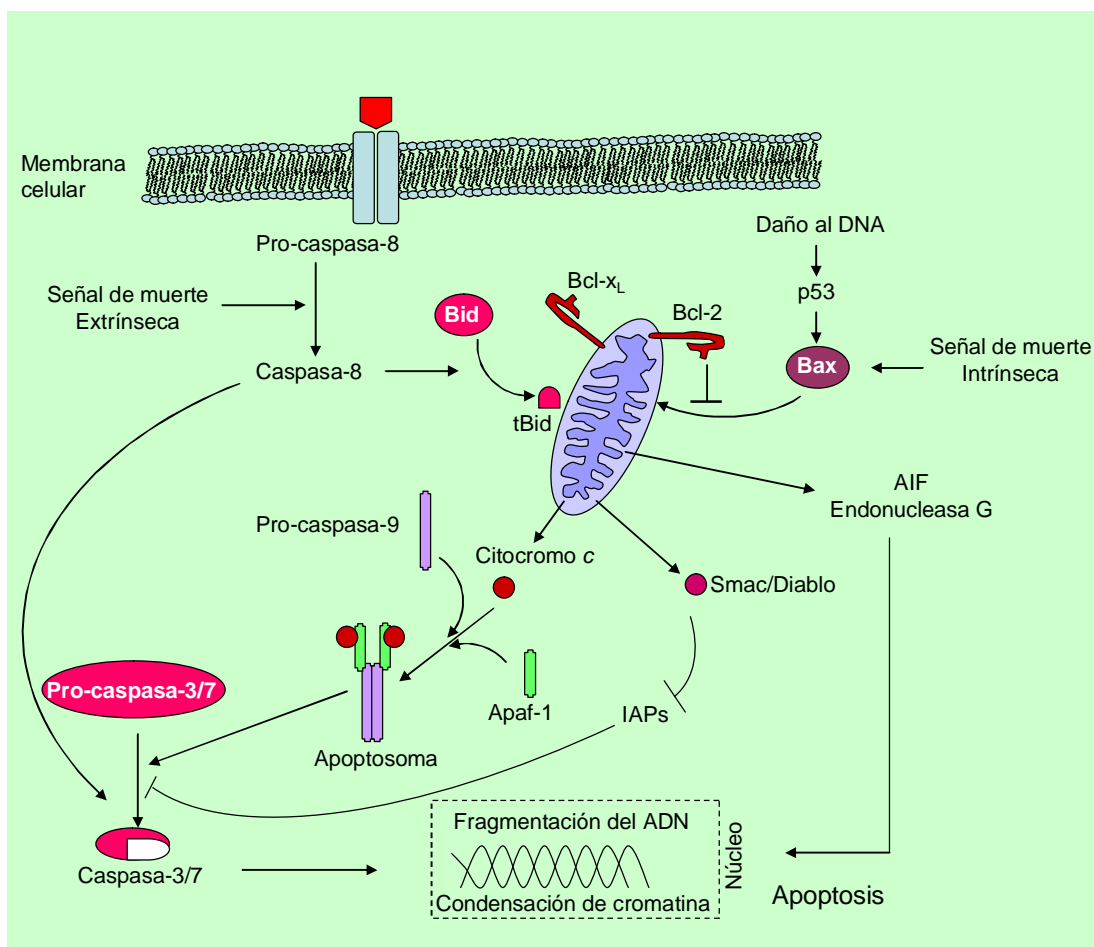
Como la mayoría de los enzimas proteolíticos, las caspasas se sintetizan como zimógenos o proenzimas inactivas denominadas procaspasas. Estas proenzimas contienen tres dominios: un prodominio *N*-terminal y dominios p20 y p10, que se encuentran en la enzima madura. En todos los casos examinados las enzimas activas son heterotetrámeros que contienen dos heterodímeros p20/p10 y dos centros activos. La mayoría de las caspasas se activan por escisión de la proenzima entre los dominios p20 y p10 y normalmente también entre el prodominio y el dominio p20. Todas estas escisiones tienen lugar después de residuos de aspartato, 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 [32]. La holoenzima formada por la caspasa-9, Apaf-1 y la proteína mitocondrial citocromo *c* se denomina apoptosoma. En condiciones normales de supervivencia celular, el citocromo *c* se localiza en el espacio intermembrana mitocondrial, mientras que Apaf-1 y la caspasa-9 en estado inactivo se encuentra en el citosol. Muchos estímulos que inducen la muerte celular inducen la liberación del citocromo *c* mitocondrial al citosol, formando con Apaf-1 y caspasa-9 el apoptosoma y activando la caspasa-9.

Se han descrito hasta el momento más de 400 sustratos potenciales de caspasas. Estos sustratos incluyen proteínas-componentes del citoesqueleto (actina, gelsolina,  $\beta$ -catenina) y del núcleo (lamina A y B, receptor de lamina B, proteínas del aparato mitótico), proteínas implicadas en la reparación y el metabolismo del ADN [poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP), subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs), ADN-topoisomerasa II], proteínas quinasas [proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa N (PKN), proteína quinasa 2 activa por p21 (PAK2), MEKK1, Raf1], proteínas involucradas en las vías de señalización (pro-interleuquinas, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y su regulador I $\kappa$ B), proteínas reguladoras del ciclo celular y la proliferación (p21, p27, pRb, CDC27), así como las proteínas cuya hidrólisis desempeña un papel crítico en la apoptosis (procaspasas, proteínas de la familia Bcl-2, ICAD (inhibidor de la DNasa activada por caspasa-3, endonucleasa responsable de la aparición de la “escalera de ADN”) [33].

La actividad de las caspasas está regulada por una familia de proteínas llamada IAPs (Proteínas Inhibidoras de Apoptosis) [34]. Se han identificado ocho IAPs humanas. Entre ellas, cIAP1, cIAP2, XIAP (IAP ligada al cromosoma X), ML-IAP (melanoma-IAP) y survivina son las más caracterizadas. XIAP es considerada como el miembro de la familia IAP con la actividad antiapoptótica más potente y bloquea la apoptosis al unirse e inhibir la activación de caspasa-3, -7, y -9. Todos los miembros de la familia IAP contienen de 1 a 3 dominios *N*-terminales BIR (repetición IAP de baculovirus, dominio de coordinación con  $Zn^{2+}$ ) y un dominio C-terminal RING. Los dominios BIR son necesarios para la unión y la inhibición de las caspasas.

### **1.5.2. Vía intrínseca. 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 [24]. Todos estos cambios pueden inducir la liberación de varias proteínas pro-apoptóticas de la mitocondria al citosol como el citocromo *c* (Figura 4). En las células sanas normales el citocromo *c*, localizado entre la membrana mitocondrial interna y la externa, funciona como un transportador electrónico móvil que transfiere los electrones desde el complejo III (Q-citocromo *c* reductasa) de la cadena de transporte electrónico al complejo IV (citocromo *c* oxidasa). . En las células que sufren apoptosis, el citocromo *c* se libera al citosol y se asocia con Apaf-1 favoreciendo su oligomerización dependiente de ATP y permitiendo el reclutamiento de la pro-caspasa-9 para formar una holoenzima denominada apoptosoma que activa a la caspasa-9. Por lo tanto, la activación de la caspasa-9 está mediada por los cambios conformacionales y no por proteólisis [35]. Otras proteínas liberadas de la mitocondria, Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, también estimulan la apoptosis ya que inhiben la actividad anti-apoptótica de las proteínas IAPs (Proteínas Inhibidores de Apoptosis).



*Figura 4. La vía intrínseca de la apoptosis.* Esta vía se inicia por una señal de muerte intracelular. Esta señal provoca la oligomerización y la translocación de Bax y Bak a la membrana externa mitocondrial, desencadenando un aumento de la permeabilidad de la membrana y la liberación de citocromo *c* y de proteínas de unión a IAP. El citocromo *c* forma el apoptosoma con Apaf-1 y la pro-caspasa-9, provocando la muerte celular. Las proteínas de unión a IAP, como Smac, se unen a XIAP y antagonizan su función.

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

## *Introducción*

liberadas estas proteínas inducen la fragmentación de ADN y la condensación de la cromatina [36].

La liberación de estas proteínas de la mitocondria está controlada 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 [37]. La familia Bcl-2 comprende al menos tres grupos de acuerdo a su estructura y su papel en la apoptosis [38]:

- proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w y Mcl-1. Estas proteínas se caracterizan por la presencia de los 4 dominios 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 y Noxa. 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 homodímeros y heterodímeros y desempeñan distintos papeles en el control del potencial de la membrana mitocondrial. Bax y Bak son esenciales para la liberación de citocromo *c* [39]. En las células sanas Bax está localizado en el citosol como un monómero. Durante la apoptosis Bax se transloca a la mitocondria [40], donde sufre homooligomerización. Por el contrario, Bak reside en la mitocondria constantemente y durante la apoptosis se oligomeriza [41]. Los miembros anti-apoptóticos de la

familia Bcl-2 previenen la liberación de citocromo *c* formando heterodímeros con Bax/Bak y desactivándolos. Las proteínas de la familia Bcl-2 no poseen 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 iónicos 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 [42]. 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 [43]. 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 de citocromo *c* [38].

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

La ruta extrínseca implica interacciones mediadas por los receptores transmembranales de muerte de la superfamilia del receptor de TNF (Factor de Necrosis Tumoral), como los receptores a TNF, a Fas y a TRAIL, y depende de las

## *Introducción*

caspasa-8 que corta y activa a las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7), induciendo una cascada de caspasas. Los miembros de la superfamilia del receptor de TNF comparten un dominio extracelular rico en cisteína y poseen un dominio citoplasmático de 80 residuos de aminoácidos denominado dominio de muerte (DD) [44]. Este último desempeña un papel importante en la transmisión de la señal de la muerte en la superficie celular de las vías de señalización intracelulares. Los ligandos y receptores de muerte mejor caracterizados incluyen FasL/FasR (CD95), TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L (TRAIL)/DR4 y Apo2L (TRAIL)/DR5. En la Figura 5 se presenta la secuencia de eventos de la vía extrínseca de la apoptosis referidos a FasL/FasR y TNF- $\alpha$ /TNFR1. Tras la unión del ligando Fas a los receptores Fas (asociados en trímeros), los receptores de muerte activados reclutan una proteína adaptadora FADD (Dominio de Muerte Asociada con Fas) que 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 pro-caspasa-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 pro-caspasa-8 [44,45]. En estas condiciones la baja actividad intrínseca de la pro-caspasa-8 es suficiente para que varias moléculas 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 [46].



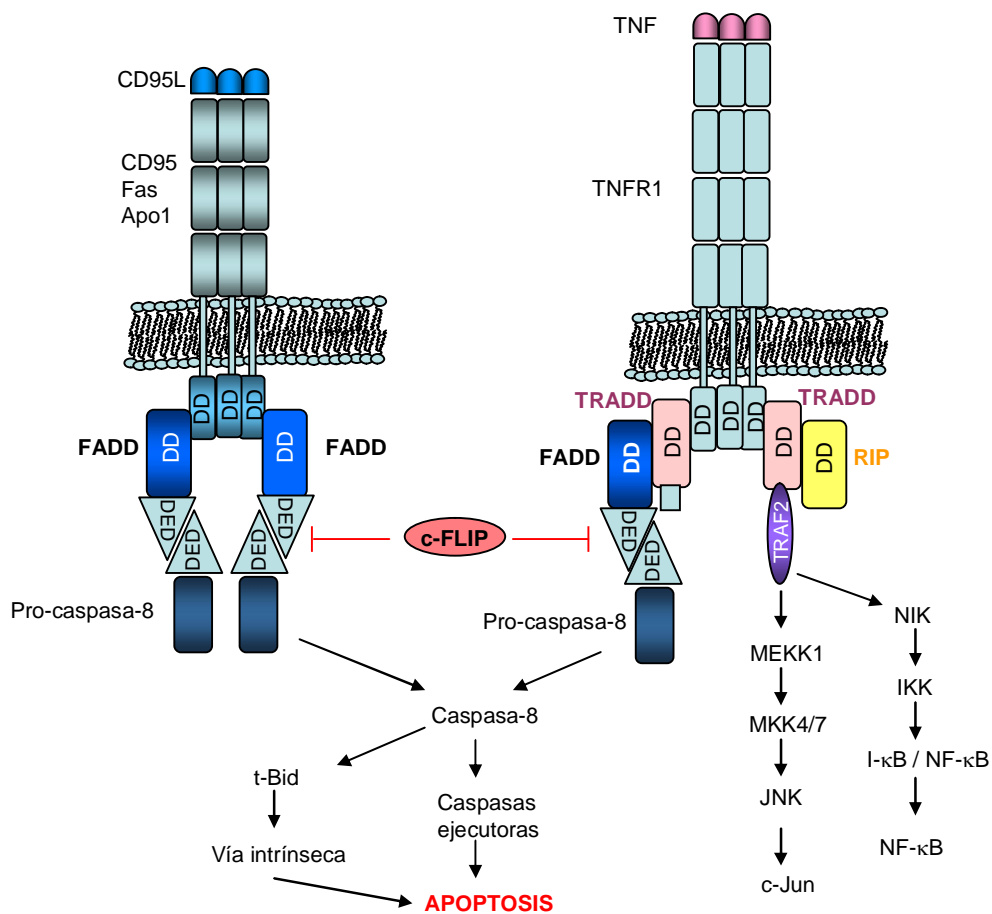


Figura 5. La vía extrínseca de la apoptosis. Esta vía implica la unión de señales de muerte, como el ligando Fas o el factor de necrosis tumoral, a sus correspondientes receptores y está asociada a la formación de un complejo de señalización inductor de muerte (DISC). En ciertas células, el complejo DISC activa directamente a las caspasas, conduciendo a muerte celular. Sin embargo, en la mayoría de las células, el DISC, a través de su componente caspasa-8, corta Bid para formar tBid, conduciendo a la oligomerización de Bax/Bak, a un aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, formación del apoptosoma, y 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-κB y JNK/AP-1, mientras FADD induce la ruta de apoptosis. A diferencia de Fas la unión de TNF a su

## *Introducción*

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 la proteína relacionada con caspasa-8 c-FLIP que no posee actividad proteolítica. Probablemente c-FLIP compete con la procaspasa-8 para unir a DISC [47].

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

El tratamiento oxidativo directo así como la producción intracelular no regulada de especies reactivas del oxígeno (ROS) son igual de peligrosos para la célula. Frente a estas situaciones existen varias defensas celulares y que pueden ser divididas en enzimáticas y no enzimáticas [48]. 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 [49]. La capacidad de antioxidantes como la catalasa y la *N*-acetil-L-cisteína (NAC), precursor de GSH, de bloquear la apoptosis inducida por diferentes agentes, indica el papel central del estrés oxidativo en el proceso de apoptosis [50]. 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 [51].

### **1.5.5. Lisosomas y Retículo Endoplasmático en la apoptosis.**

Los lisosomas son orgánulos ricos en hidrolasas ácidas y están involucrados en la degradación del material fagocitado y en la digestión de proteínas en general [52]. 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 ácido, mientras que a pH neutro son muy activas pero no tan estables.

La lisis de los lisosomas es letal para la célula ya que provoca la liberación de las catepsinas al citosol. Sin embargo, el citosol contiene inhibidores endógenos de cisteín-catepsinas denominados cistatinas. 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 [53]. 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.

## *Introducción*

Las proteínas destinadas a la secreción o a la membrana plasmática se translocan al retículo endoplasmático (RE), donde se modifican y se pliegan correctamente. La acumulación de las proteínas mal plegadas en el RE provoca estrés de RE y si éste es excesivo induce la apoptosis. IRE1 es una proteína quinasa transmembranal localizada en el RE y su función es la transmisión de las señales del estrés de RE. Una vez activada IRE1 recluta TRAF2 a la membrana del RE lo que desencadena la activación de la cascada de JNK (una de las proteínas quinasas activadas por mitógenos) [54]. 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 [55], Bax [56] y caspasa-7 [57]. La caspasa-4 localizada en la membrana de RE es procesada y activada cuando las células se tratan con los agentes inductores del estrés del RE [58].

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

La respuesta celular a la apoptosis inducida por determinados compuestos está asociada con la inactivación de las proteínas quinasas implicadas en la supervivencia celular y con la activación de proteínas quinasas que promueven la apoptosis. Uno de los aspectos más relevantes de la regulación de la apoptosis es que requiere la participación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Las cascadas de MAPK constituyen una de las vías de señalización que desempeñan papeles clave en la supervivencia, la diferenciación, el movimiento, la división y la muerte celular. Las MAPKs son una familia de serina/treonina proteína quinasa dirigidas a prolina que funcionan como mediadoras intracelulares en respuesta a

diversos estímulos. Las MAPKs son activadas por fosforilación en residuos de treonina y tirosina. 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 (Figura 6) [59].

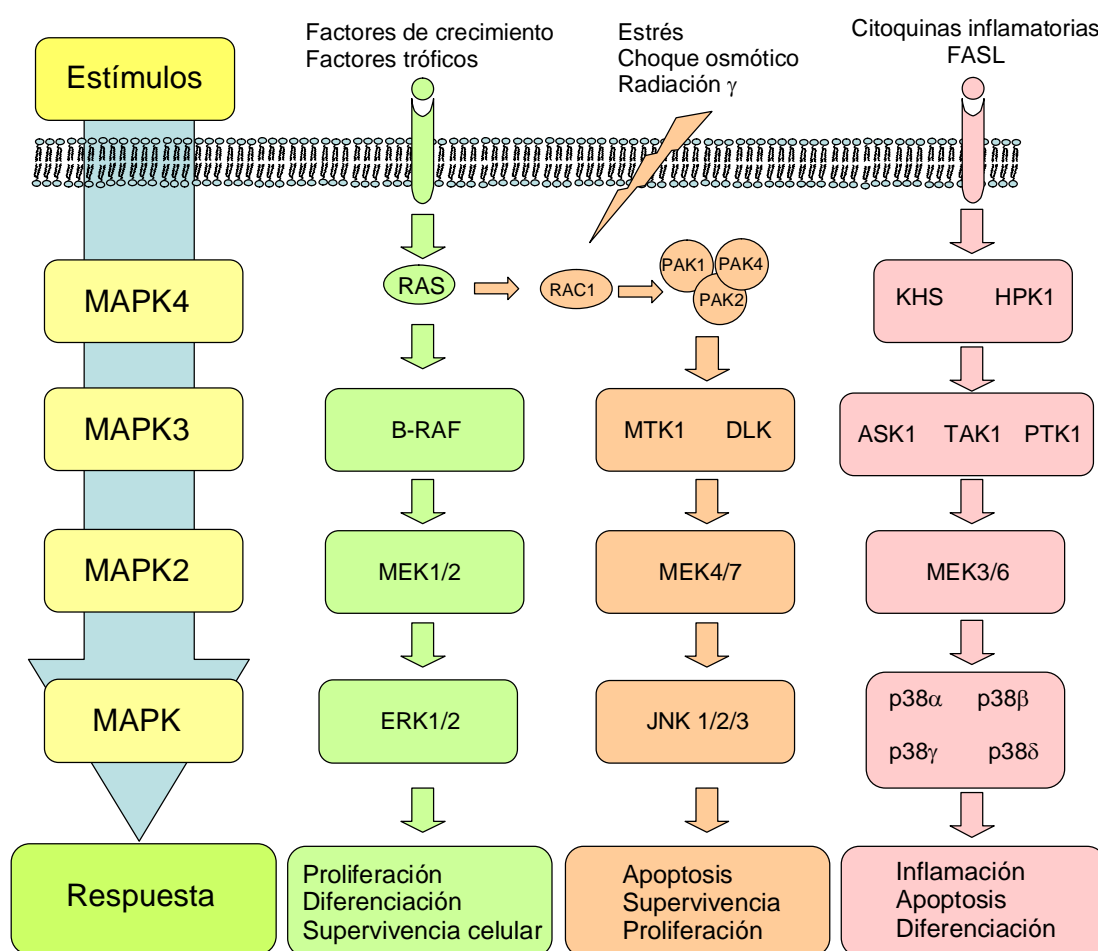


Figura 6. Las cascadas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Las rutas de señalización de las MAPKs median la transmisión de señales extracelulares hasta las proteínas efectoras que alteran la proliferación y la supervivencia celular.

## *Introducción*

La activación de ERK puede desencadenar tanto efectos anti-apoptóticos como pro-apoptóticos, dependiendo del estímulo y el tipo celular. En cambio, JNK/SAPK y p38<sup>MAPK</sup> son activadas principalmente por estímulos citotóxicos y están asociados con efectos pro-apoptóticos en muchos tipos celulares. Sin embargo, hay múltiples excepciones a esta regla.

Las cascadas de señalización de las MAPKs están altamente conservadas entre los diferentes tipos de células eucariotas y están compuestas de tres a cinco niveles de familias de quinasas [MAP4K, MAP3K, MAP2K, MAPK, y proteínas quinasas activadas por MAPK (MAPKAPK); (Figura 6)], con uno o más componentes de cada nivel fosforilando y activando a componentes del siguiente nivel. La vía de señalización MAPK es compartida por cuatro cascadas, que se clasifican por el miembro de la familia MAPK localizado al final de la cascada de fosforilación iniciada por los receptores tirosina quinasas: (i) las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) 1 y 2, (ii) *c-JUN* N-terminal quinasas (JNK) 1, 2, y 3, (iii) p38-MAPK, y (iv) ERK5. Los factores de crecimiento son los principales reguladores de la cascada ERK1/2, el estrés celular es el principal inductor de las cascadas de JNK y p38-MAPK, y tanto los factores de crecimiento o el estrés son activadores de la cascada de ERK5. No obstante, existen evidencias de conversación cruzada entre varios componentes de las rutas, es decir, las cascadas pueden cooperar en la transmisión de ciertas señales.

La cascada de ERK1/2 implica la señalización a través de proteínas G pequeñas, por ejemplo la familia RAS. Las proteínas G pequeñas son reclutadas por los receptores tirosina quinasas a través de los dominios SH2/SH3, resultando en la unión de RAS activo a los miembros de la familia RAF MAP3K. Una vez activado,

RAF fosforila y activa MAP2K 1 y 2 (también conocido como MEK1/2), que actúan como quinasas de especificidad dual, fosforilando residuos de Tyr y Thr de las proteínas MAPK ERK1/2. Las ERK1/2 activas fosforilan una serie de proteínas citoplasmáticas, como los miembros de la familia MAPKAPK y proteínas del citoesqueleto como vimentina y queratina-8 y también se transloca al núcleo, donde activa varios factores de transcripción, como FOS, p53 y ELK1.

La desfosforilación de las MAPKs por fosfatasas desempeña un papel clave en la regulación de su actividad [59]. 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 [61].

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 las especies reactivas del oxígeno (ROS) [62]. ERK fosforila a p53 en Ser15 potenciando su efecto apoptótico [63], y al miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 Bad bloqueando su translocación a la mitocondria [64]. La inhibición de ERK reduce la expresión de Bax y p53 [65].

La rama JNK de la vía MAPK se activa principalmente en respuesta al estrés, como la radiación UV, el daño al ADN, y por citoquinas inflamatorias; sin embargo, también puede ser débilmente activada por factores de crecimiento. Estos estímulos activan la proteína G RAC1 ya sea directamente, o alternativamente activan la

## *Introducción*

familia RAS, que a su vez también recluta y fosforila RAC1, que actúa entonces a través de la familia de proteínas quinasas activadas por la proteína p21 (PAK) para fosforilar miembros de la familia MAP3K. Se han asociado al menos 14 miembros de la familia MAP3K con la activación de la cascada de señalización de JNK, por ejemplo, MAP3K4 y MAP3K12. MAP3K fosforila de manera dual a MAP2K4 (MKK4) en Ser257 y Thr265, o a MAP2K7 (MKK7) en Ser271 y Thr275, que a su vez activan MAPK8 (JNK), MAPK9 (JNK2), y MAPK10 (JNK3). Las proteínas quinasas JNK1 y JNK2 se expresan de forma ubicua en los seres humanos, mientras que JNK3 se expresa principalmente en el cerebro, el corazón y los testículos. Una amplia variedad de procesos celulares se activan por la vía de JNK, incluyendo la apoptosis [66], moléculas de señalización [67] y factores de transcripción tales como JUN [68], JUND [69], y p53 [70].

Las JNKs de mamíferos están codificadas por tres genes distintos (JNK1, JNK2 y JNK3) y la maduración alternativa de estos genes genera diez productos génicos 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 múltiples 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. 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 la 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 [71].

Las p38<sup>MAPKs</sup> son fuertemente activadas por estrés y por citoquinas inflamatorias; sin embargo, los factores de crecimiento son capaces de activar débilmente esta ruta. Las p38<sup>MAPKs</sup> desempeñan un papel importante en puntos de control del ciclo celular. Las p38<sup>MAPKs</sup> requieren la fosforilación dual del motivo Thr-Gly-Tyr en el lazo de activación por MAP2K3 (MEK3) o MAP2K6 (MEK6) para ser completamente activas. Existen al menos cuatro isoformas de p38<sup>MAPK</sup>: MAPK11 (p38- $\alpha$ ), MAPK12 (p38- $\beta$ ), MAPK13 (p38- $\delta$ ), y MAPK14 (p38- $\gamma$ ), siendo la p38- $\alpha$  la más estudiada. La proteína quinasa p38<sup>MAPK</sup> activa fosforila varias dianas celulares, tanto factores de transcripción (p53, STAT1, MEF y NF- $\kappa$ B) como proteínas del citoesqueleto y otras quinasas. También se ha demostrado que p38<sup>MAPK</sup> fosforila y reduce los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-x<sub>L</sub> y aumenta los niveles del factor de transcripción p53 [72], favoreciendo de esta manera la apoptosis.

### **1.7. Fuentes de eupatorina, ensayos biológicos previos en células de cáncer y planteamiento de investigación.**

Las flavonas son miembros importantes de la familia de los flavonoides que se encuentran en frutas y verduras, y que han recibido un amplio interés por su potencial antioxidante y su capacidad para modular varios sistemas enzimáticos implicados en una serie de enfermedades [73]. Las flavonas son lipofílicas (debido a su esqueleto hidrocarbonado que contiene dos anillos aromáticos) así como

## *Introducción*

hidrofílicas (debido a la presencia del grupo carbonilo en C-4), presentando grupos polares en diferentes posiciones, y el esqueleto en sí es susceptible de generar grupos funcionales implicados en la modulación selectiva de diferentes enzimas. La eupatorina (3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona) es una flavona que ha sido previamente aislada de varias plantas medicinales, entre ellas *Tanacetum vulgare* [74], *Lantana montevidensis* [75] y *Orthosiphon stamineus* [76], y se ha descrito la inhibición de la proliferación en líneas celulares de cáncer humano y murino [75]. El efecto anti-proliferativo de la eupatorina frente a las células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 se ha atribuido al metabolismo mediado por los enzimas citocromos P450 CYP1 [77]. Sin embargo, la importancia potencial de la eupatorina en la terapia antitumoral en células de leucemia no se ha explorado aún. En el presente estudio hemos investigado los efectos de la eupatorina en tres líneas de leucemia humana, sus efectos sobre el ciclo celular y la apoptosis y el papel de las caspasas y la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Además, se investigó la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) para dilucidar si éstas juegan un papel fundamental en el efecto apoptótico de la eupatorina en células de leucemia.

En este trabajo demostramos que la eupatorina induce parada del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>-M y muerte celular por apoptosis en células leucémicas humanas, implicando la activación de múltiples caspasas, la liberación de citocromo *c* mitocondrial y el procesamiento del enzima de reparación del ADN poli(ADP-ribosa) polimerasa. Esta flavona indujo la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos y la muerte celular fue atenuada por la inhibición de las proteínas

quinasas *N*-terminal de *c-jun*/proteínas quinasas activadas por estrés. En la presente Tesis Doctoral se describen las rutas de muerte celular desencadenadas por la eupatorina que implican tanto las vías intrínseca y extrínseca de activación de caspasas y la generación de las especies reactivas del oxígeno.



## **OBJETIVOS**

---



## **OBJETIVOS**

1. Analizar la citotoxicidad de la flavona natural eupatorina utilizando como modelo de estudio líneas celulares de leucemia humana.
2. Evaluar si la eupatorina induce muerte celular por apoptosis.
3. Investigar su mecanismo de acción. Específicamente la contribución de las cascadas de las caspasas, la ruta de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos y la generación e implicación de las especies reactivas del oxígeno.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---



### **3.1. Reactivos.**

La eupatorina se adquirió de Extrasynthese (Genay Cedex, Francia). El suero bovino fetal se obtuvo de Gibco (Life Technologies, Paisley, Reino Unido). El medio de cultivo RPMI 1640, el HEPES (ácido *N*-[2-hidroxiethyl] piperazino *N'*-[2-etanosulfónico]), la L-glutamina, el azul de tripán, el bicarbonato sódico, los antibióticos (estreptomicina y penicilina G), el yoduro de propidio, la RNasa A, la proteinasa K, el paraformaldehído, la bisbencimida (Hoechst nº 33258), el fenol y el bromuro de etidio fueron de Sigma Chemical Co. (San Luis, EE.UU.). 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, NaOH, HCl y otros compuestos utilizados en la preparación de reactivos y tampones se adquirieron de Sigma Chemical Co. o de BDH (Poole, Reino Unido).

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 (Erembodegem, Bélgica). El cloroformo y alcohol isoamílico se obtuvieron de BDH (Poole, Reino Unido). La agarosa se obtuvo de Bio-Rad (Hercules, EE.UU.). La anexina V se obtuvo de BD Pharmigen<sup>TM</sup> (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit).

Para la obtención de los lisados celulares se utilizaron los siguientes inhibidores de proteasas: (i) la aprotinina (inhibidor de serínproteasas: inhibe a la tripsina, a la quimiotripsina y a la plasmina); (ii) la leupeptina (inhibidor de cisteín y serínproteasas: inhibe a la plasmina, a la tripsina, a la papaína y a la catepsina B); (iii) la pepstatina A (inhibidor potente de proteasas ácidas); (iv) el fluoruro de

## *Material y Métodos*

fenilmetilsulfonilo (PMSF) (inhibidor de cisteín- y de serín-proteasas y de la acetilcolinesterasa). En la preparación de los lisados también se empleó el ditioneol (DTT: agente reductor estereoselectivo para puentes disulfuro en complejos moleculares), el ortovanadato sódico (inhibidor de fosfatasas alcalinas) y el detergente tritón X-100. Todos los inhibidores de proteasas, el agente reductor DTT, el ortovanadato sódico y el tritón X-100 se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

El inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk (benciloxi-carbonil-Val-Ala-Asp (OMe)-fluorometilcetona) y los inhibidores de MAPKs (SP600125, PD98059, SB203580, U0126) fueron 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 (Darmstadt, Alemania).

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 (Hercules, EE.UU.). El azul de bromofenol, el BSA (albúmina de suero bovino) y el  $\beta$ -mercaptoetanol fueron de Sigma.

Los siguientes anticuerpos se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante: poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), monoclonal de ratón; citocromo *c*, monoclonal de ratón; caspasa-7, monoclonal de ratón; caspasa-8, policlonal de

conejo; Bax, policlonal de conejo; Bid, policlonal de conejo; y AIF, policlonal de conejo (BD PharMingen, San Diego, EE.UU.); Smac/DIABLO, monoclonal de ratón (BD Transduction Laboratories); caspasa-3, policlonal de conejo (Assay Designs, Ann Arbor, EE.UU.); caspasa-4, caspasa-6 y caspasa-9, monoclonal de ratón (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japón); Bcl-2, monoclonal de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.);  $\beta$ -actina, monoclonal de ratón (Sigma, San Luis, EE.UU.); citocromo *c* oxidasa (Cox IV), monoclonal de ratón (Abcam, Cambridge, Reino Unido); JNK/SAPK, Fosfo-JNK/SAPK (fosfo T183 + Y185), p44/42 MAP quinasa, Fosfo-p44/42 MAP quinasa (T202/Y204), p38<sup>MAPK</sup> y Fosfo- p38<sup>MAPK</sup> (T180/Y182), policlonal de conejo (New England BioLabs, Cell Signaling Technology, Beverly, EE.UU.). Las membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) y el sustrato de revelado por quimioluminiscencia se obtuvieron de Millipore (Billerica, EE.UU.). Las placas para autorradiografía se adquirieron de Kodak. Los anticuerpos secundarios fueron de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Little Chalfont, Reino Unido). Los fluorocromos H<sub>2</sub>-DCF-DA (diacetato 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína) y dihidroetidio (DHE) y todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma (San Luis, EE.UU.).

El agua desionizada y bidestilada se obtuvo con un equipo Mili-Q (Water Purification System, Millipore Ibérica, Madrid, Spain).

### **3.2. Grandes equipos utilizados.**

Para la obtención de las imágenes de fluorescencia se utilizó un microscopio LSM 5 PASCAL de ZEISS. Para los experimentos de citometría de flujo se utilizó un citómetro FACS Verse de BD.

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

#### *3.3.1. Cultivo de células leucémicas humanas HL-60, U937 y MOLT-3.*

Las células HL-60, U-937 y MOLT-3 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 estreptomina) 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> células/ml [78,79]. La determinación del número de células y de la viabilidad celular se llevó a cabo utilizando un hematocitómetro. Para la realización de los experimentos se emplearon células cuya viabilidad siempre fue superior al 95% utilizando el método de exclusión de azul de tripán. A las células se les cambió el medio de cultivo tres veces por semana y se dividieron aproximadamente cada 24 horas.

#### *3.3.2. Tratamiento de las células con la eupatorina.*

La eupatorina se preparó 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.

La citotoxicidad de la eupatorina frente a las células leucémicas humanas se analizó midiendo actividad metabólica por el método colorimétrico del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que es reducido por la actividad deshidrogenasa mitocondrial [80]. 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 eupatorina durante 72 h a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, las placas se centrifugaron (500 g, 10 min) a temperatura ambiente y el medio se eliminó por aspiración. Se añadió 100 µl de 0,5 mg/ml MTT (en medio de cultivo RPMI 1640 con antibiótico) a cada pocito y las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C. La reacción se paró añadiendo 100 µl de SDS (20%) con HCl 0,02 M y se incubó 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 de cultivo RPMI 1640. Los datos se analizaron con el programa informático Prism 4.0 (GraphPad) y se determinó la concentración de producto que reduce la viabilidad celular a la mitad (IC<sub>50</sub>) [81]. Los valores que se presentan son medias ± errores estándar de tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

## *Material y Métodos*

### *3.4.2. Tinción con el fluorocromo trihidrocloruro de bisbencimida.*

El primer método utilizado para la evaluación de inducción de apoptosis utilizado fue la tinción con la sonda fluorescente Hoescht 33258. Se basa en la capacidad del fluorocromo para unirse al ADN, permitiendo visualizar la aparición de cambios morfológicos del núcleo, como son la segmentación nuclear y la condensación de la cromatina y su compactación a lo largo de la periferia nuclear. Este método permite cuantificar el porcentaje de células apoptóticas a través del conteo de un total de 500 células y aplicando el criterio de célula apoptótica (núcleo fragmentado y/o condensado). Para ello, 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, se lavaron con PBS y las células se tiñeron con 20  $\mu$ l de una disolución que contenía 20  $\mu$ g/ml de bisbencimida (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 [78].

### *3.4.3. Fragmentación del ADN.*

La fragmentación del ADN es un 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. Después de los tratamientos, las células ( $5 \times 10^5$  células/ml) se



recolectaron por centrifugación (12.000 g, 1 minuto) y se lavaron dos veces con PBS frío. Las células se resuspendieron con 30 µl de tampón de lisis [50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 0,5% SDS] y se incubaron sucesivamente con 1 µg/µl de RNasa A (1 hora a 37 °C) y con 1 µg/µl de Proteinasa K (1 h a 50 °C). Se añadió a cada muestra 2 µl de azul bromofenol (0,25%) y el ADN se extrajo con 100 µl 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 se lavó nuevamente con 100 µl de cloroformo. A las muestras se les añadió 5 µl de tampón de carga (10 mM EDTA, pH 8,0, conteniendo 1% (p/v) de agarosa de bajo punto de fusión y 40% de 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, Hercules, EE.UU.).

#### *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.*

Esta técnica permite distinguir las células en las diferentes etapas del ciclo celular en función de la cantidad de ADN. Se trata de un 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

### *Material y Métodos*

primer pico, en la fase S las células están sintetizando ADN y en fase G2/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 G1 constituyendo la fracción SubG1 [78].

Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron durante al menos una hora en etanol al 70 %, a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuación se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos y se incubaron (1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en oscuridad) con 1 ml de PBS conteniendo 100  $\mu\text{g/ml}$  de RNasa A y 50  $\mu\text{g/ml}$  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 FACS Verse (BD) usando el detector FL3 ( $620\pm 15$  nm). Se analizaron 10.000 células en cada muestra y los resultados se analizaron con el software Flowing (Turku Centre of Biotechnology, Universidad de Turku, Finlandia) [81].

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

La doble tinción con anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) y yoduro de propidio permite la cuantificación de células apoptóticas y necróticas. 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, isotiocianato de fluoresceína) [28]. A partir de los histogramas obtenidos por citometría de flujo se pueden cuantificar los porcentajes de: (i) células viables, no unen anexina V y excluyen yoduro de propidio, (ii) células en apoptosis temprana, unen anexina V y excluyen yoduro de propidio, (iii) células en apoptosis tardía, unen anexina V e incorporan yoduro de propidio y (iv) 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 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. Se mezcló suavemente y las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente (25 °C) en la oscuridad. Se añadió 400  $\mu\text{l}$  del anterior tampón a cada tubo y se analizó cada muestra por citometría de flujo.

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.

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

La actividad caspasa se evaluó midiendo la rotura proteolítica de los sustratos cromogénicos específicos. Los sustratos colorimétricos específicos utilizados en el ensayo para la actividad caspasa-3/-7, la actividad caspasa-6, la actividad caspasa-8 y la actividad caspasa-9 fueron respectivamente Ac-DEVD-pNA (*N*-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilina), Ac-VEID-pNA (*N*-acetil-Val-Glu-Ile-Asp-p-nitroanilina),

## *Material y Métodos*

Ac-IETD-*p*NA (*N*-acetil-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilina) y Ac-LEHD-*p*NA (*N*-acetil-Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilina).

Para ello, 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 incubaron 5 min en hielo. Las células se lisaron usando una aguja 21G, 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 [82] 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.

### *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.

*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 NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 2 mM de pirofosfato de sodio, 20 mM glicerofosfato de sodio, 10 mM NaF, 2 mM ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, leupeptina (5 µg/ml), aprotinina (5 µg/ml) y pepstatina A (5 µg/ml)] y se 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 [78,79].

*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 [78]. La pureza de las fracciones mitocondriales y citosólicas se determinaron utilizando anticuerpos contra citocromo *c* oxidasa y  $\beta$ -actina, respectivamente.

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 [78].

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

### *Material y Métodos*

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 peróxidos y de anión superóxido intracelular se determinó por citometría de flujo usando las sondas diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>-DCFDA) y dihidroetidio (DHE), respectivamente. La sonda H<sub>2</sub>-DCF-DA se incorpora a las células y se desacetila por esterasas intracelulares generando el compuesto no fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>-DCF). Las sondas H<sub>2</sub>-DCF y DHE se oxidan por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (y por otros peróxidos) y por los aniones superóxido, respectivamente, para generar los compuestos altamente fluorescentes

2',7'-diclorofluoresceína (DCF) y etidio. La intensidad de la fluorescencia de DCF y del etidio es proporcional a la cantidad de peróxidos y superóxido, respectivamente, producidas por las células. Las células se trataron con o sin eupatorina y posteriormente se añadió H<sub>2</sub>-DCF-DA (2 μM) o DHE (2 μM) al medio de cultivo 30 min antes de la finalización de la incubación con eupatorina. Las células se lavaron con PBS y la fluorescencia emitida por DCF (525 nm) y DHE (568 nm) se determinó por citometría de flujo.

### **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 ± 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  $P < 0,05$ .





## **RESULTADOS**

---

*Evaluación de la actividad antiproliferativa de la eupatorina*



## RESULTADOS

### 4.1. La eupatorina inhibe la proliferación y la viabilidad celular e induce apoptosis en líneas celulares de leucemia humana

En esta Tesis hemos evaluado el efecto del flavonoide natural eupatorina (Figura 7A) sobre la proliferación de tres líneas celulares de leucemia humana y encontramos que las líneas celulares mieloides (HL-60 y U-937) y la linfoide (MOLT-3) fueron sensibles al efecto anti-proliferativo de este flavonoide. El tratamiento con la eupatorina indujo inhibición de la viabilidad celular dependiente de la concentración, sin diferencias significativas entre las tres líneas celulares, con valores de  $IC_{50}$  de  $\sim 5 \mu M$  (Figura 7B). La eupatorina también indujo cambios morfológicos significativos y una importante reducción en el número de células (Figura 7C).

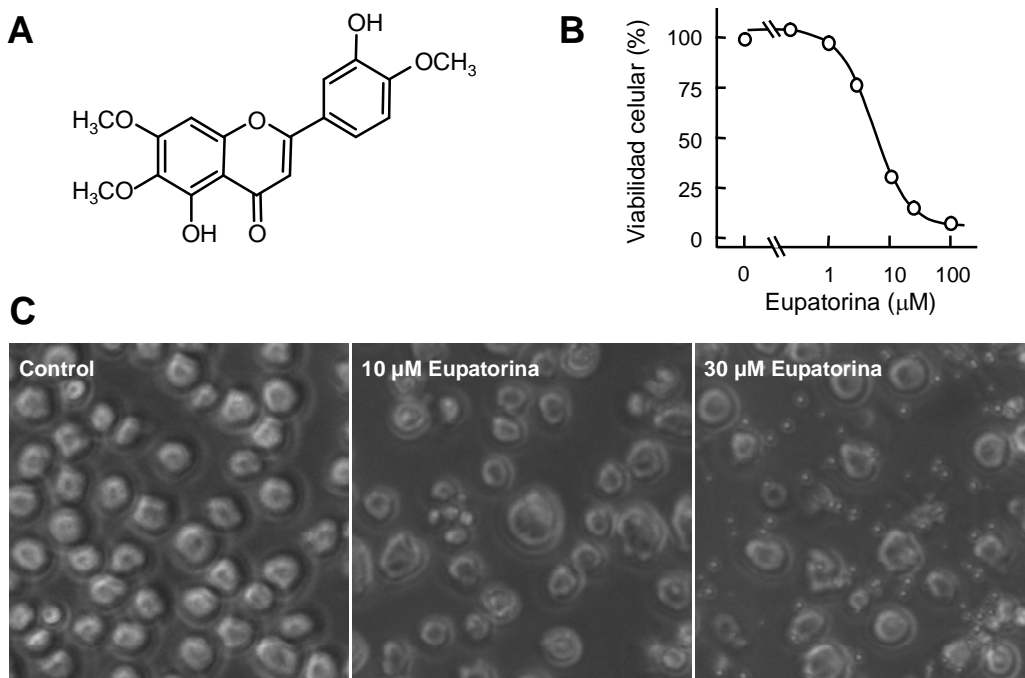


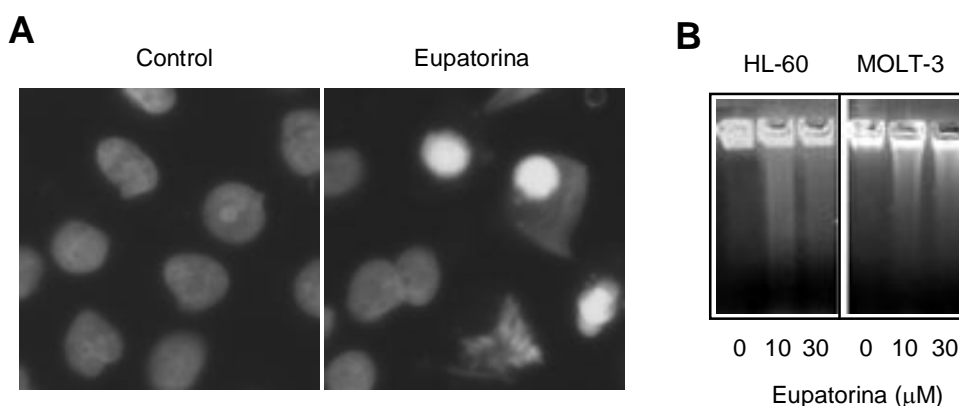
Figura 7. Estructura química de la eupatorina y su efecto sobre la viabilidad de la línea celular humana HL-60. (A) Estructura de la eupatorina. (B) Viabilidad celular

## Resultados

determinada por el ensayo del MTT. Las células HL-60 se cultivaron en presencia de las concentraciones indicadas durante 72 h, y los resultados son representativos de aquellos obtenidos en al menos tres experimentos independientes. (C) Las células se incubaron con vehículo (control) o las concentraciones indicadas de eupatorina durante 24 h y se analizaron con un microscopio invertido de contraste de fases.

### 4.2. La eupatorina induce apoptosis en células leucémicas humanas

Para estudiar el mecanismo implicado en la citotoxicidad inducida por la eupatorina, analizamos los núcleos de células tratadas usando microscopía fluorescente y observamos las características morfológicas típicas de las células apoptóticas tales como la condensación nuclear y la cromatina fragmentada (Figura 8A). La electroforesis en gel de agarosa mostró que la incubación con la eupatorina indujo fragmentación del ADN, que es característica de células apoptóticas (Figura 8B).



*Figura 8. La eupatorina induce apoptosis en células leucémicas humanas.*

(A) Imágenes obtenidas con un microscopio de fluorescencia Zeiss de células HL-60 tratadas con 3  $\mu\text{M}$  eupatorina o vehículo (control) durante 24 h después de la tinción con el trihidrocloruro de bisbencimida para evaluar la condensación de cromatina nuclear. (B) Efecto de la eupatorina sobre la fragmentación del ADN en las líneas celulares leucémicas. Las células HL-60 y MOLT-3 se incubaron con las

concentraciones indicadas de eupatorina durante 24 h y el ADN genómico se extrajo, se separó en un gel de agarosa y se tiñó con bromuro de etidio.

Para determinar si la disminución de la proliferación celular está mediada por alteraciones en la progresión del ciclo celular, la distribución de las fases del ciclo celular se evaluó por citometría de flujo. Como se observa en la Tabla 1 y en la Figura 9, la eupatorina (3  $\mu$ M) causó una acumulación de las células en la fase G<sub>2</sub>-M a expensas de la población de células en la fase G<sub>1</sub> comenzando a las 6 h de tratamiento en las líneas celulares HL-60, U-937 y MOLT-3.

**Tabla 1.** Efecto de diferentes tiempos de tratamiento con eupatorina sobre la distribución de las fases del ciclo celular de células leucémicas humanas.

		% Sub-G <sub>1</sub>	%G <sub>1</sub>	%S	%G <sub>2</sub> -M
U-937					
6 h	Control	0,9 $\pm$ 0,1	45,2 $\pm$ 1,1*	22,9 $\pm$ 0,4	30,1 $\pm$ 1,3*
	Eupatorina	1,5 $\pm$ 0,1	18,5 $\pm$ 1,4*	26,4 $\pm$ 0,3	52,7 $\pm$ 1,3*
12 h	Control	0,5 $\pm$ 0,1	45,8 $\pm$ 0,8*	26,3 $\pm$ 0,5*	26,1 $\pm$ 0,4*
	Eupatorina	10,5 $\pm$ 1,0*	19,0 $\pm$ 2,0*	17,4 $\pm$ 0,7*	51,6 $\pm$ 1,1*
24 h	Control	1,2 $\pm$ 0,4	46,9 $\pm$ 0,5*	22,2 $\pm$ 0,4*	28,2 $\pm$ 0,3*
	Eupatorina	19,4 $\pm$ 1,3*	35,7 $\pm$ 1,7*	20,6 $\pm$ 0,5*	21,2 $\pm$ 1,0*
HL-60					
6 h	Control	6,7 $\pm$ 0,3	44,5 $\pm$ 0,7*	15,0 $\pm$ 0,5	29,1 $\pm$ 0,4*
	Eupatorina	8,6 $\pm$ 0,5	32,3 $\pm$ 0,9*	16,0 $\pm$ 0,2	36,7 $\pm$ 1,2*
12 h	Control	5,1 $\pm$ 0,6	45,5 $\pm$ 0,4*	18,0 $\pm$ 0,3	27,7 $\pm$ 0,2*
	Eupatorina	12,8 $\pm$ 0,4*	32,2 $\pm$ 1,1*	11,6 $\pm$ 0,3	38,4 $\pm$ 1,4*
24 h	Control	7,8 $\pm$ 0,7	49,7 $\pm$ 0,3*	17,9 $\pm$ 0,2*	21,8 $\pm$ 0,8
	Eupatorina	12,9 $\pm$ 0,1*	42,2 $\pm$ 0,4*	17,4 $\pm$ 0,5*	21,9 $\pm$ 0,8
MOLT-3					
6 h	Control	6,2 $\pm$ 0,8	70,2 $\pm$ 1,2	7,6 $\pm$ 0,4	16,2 $\pm$ 0,4
	Eupatorina	5,1 $\pm$ 0,3	64,9 $\pm$ 0,4*	9,6 $\pm$ 0,3	21,1 $\pm$ 0,4*
12 h	Control	9,1 $\pm$ 1,4	70,7 $\pm$ 1,7	7,2 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,2
	Eupatorina	13,3 $\pm$ 1,7*	64,8 $\pm$ 3,5	5,2 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 0,6
24 h	Control	7,1 $\pm$ 0,2	70,2 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 0,3	13,4 $\pm$ 0,2*
	Eupatorina	18,6 $\pm$ 1,8*	67,9 $\pm$ 1,7	4,0 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,4

Las células se cultivaron con 3  $\mu$ M eupatorina durante los períodos de tiempo indicados y la distribución de las fases del ciclo celular se determinó por citometría de flujo. Los valores son medias  $\pm$  errores estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los asteriscos indican una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) comparado con los controles correspondientes.

## Resultados

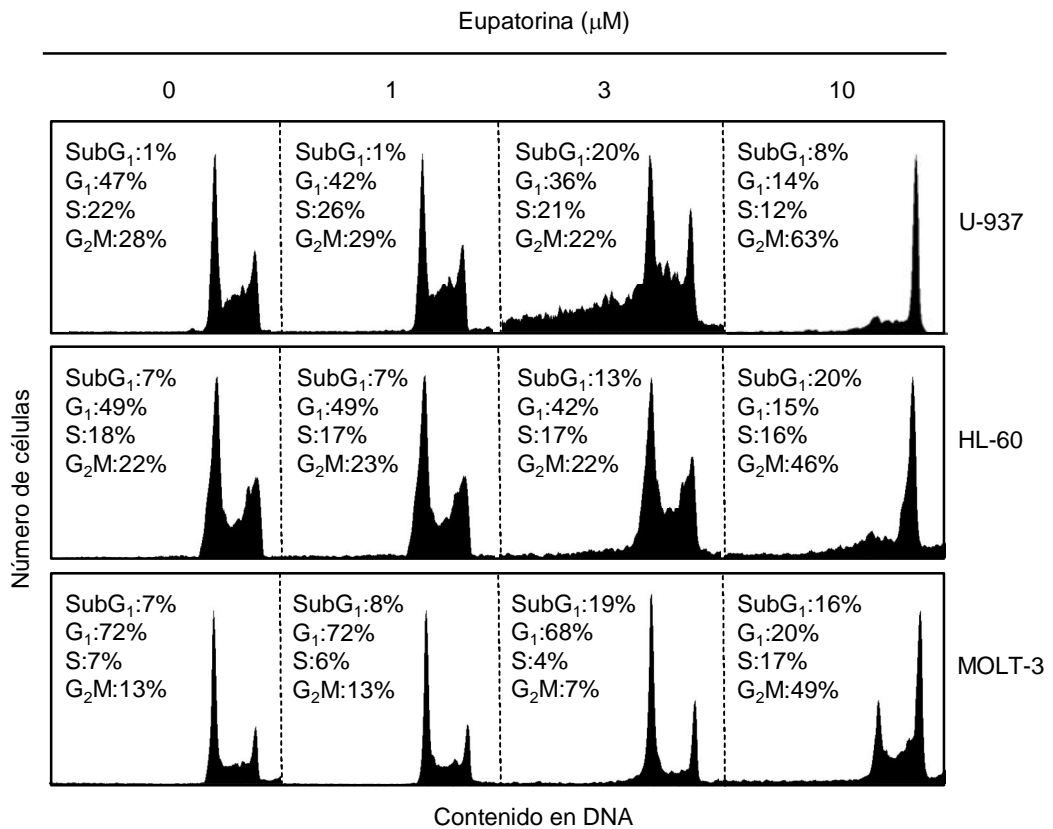
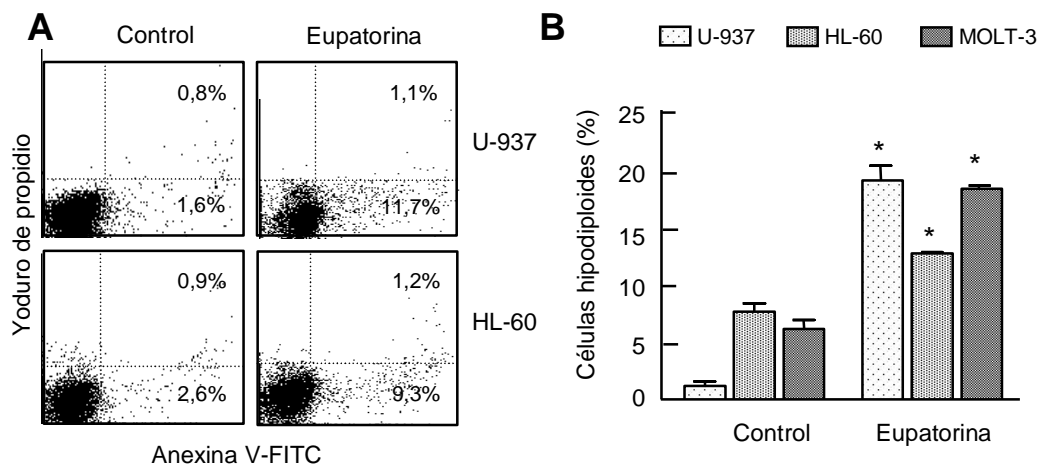


Figura 9. La eupatorina induce una detención del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>-M. Las células se incubaron durante 24 h en presencia de las concentraciones indicadas de eupatorina y la distribución de las fases del ciclo celular se determinó por citometría de flujo. Los datos mostrados proceden de tres experimentos independientes.

La detención del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>-M fue mayor en las células U-937 que en las otras líneas celulares, y este efecto fue sostenido hasta las 12 h en HL-60 y en U-937 pero no en MOLT-3. El porcentaje de células en sub-G<sub>1</sub> aumentó después de 12 h en las tres líneas celulares.

El tratamiento con este flavonoide también indujo la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática en las células HL-60 y

U-937, detectada por la tinción con anexina V-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Figura 10A). El porcentaje de células apoptóticas correspondiente a la población de células hipodiploides aumentó ~20-veces, ~2-veces y ~3-veces en las células U-937, HL-60 y MOLT-3, respectivamente, después de 24 h de exposición a una baja concentración de eupatorina (Figura 10B).



*Figura 10. La eupatorina induce la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática y el aumento de células apoptóticas.* (A) Detección de células apoptóticas por doble tinción con anexina V-FITC (anexina V marcada con isotiocianato de fluoresceína) y yoduro de propidio después del tratamiento con 3  $\mu$ M de eupatorina durante 24 h. Las células que aparecen en el cuadrante inferior derecho presentan tinción positiva con anexina V-FITC, lo que indica translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, y tinción negativa con yoduro de propidio, lo que demuestra membranas celulares intactas, ambas características de apoptosis temprana. Las células en el cuadrante superior derecho son doble positivas para anexina V-FITC y para yoduro de propidio y son células necróticas. Los datos proceden de tres experimentos independientes. (B) Las células se incubaron con 3  $\mu$ M eupatorina durante 24 h y el porcentaje de células en la región sub- $G_1$  se determinó por citometría de flujo. Las barras de error representan medias  $\pm$  errores estándar de tres experimentos independientes cada uno realizado por triplicado. \* Indica  $P < 0,05$  por comparación con el control sin tratar.

### **4.3. La muerte celular inducida por eupatorina es dependiente de caspasas**

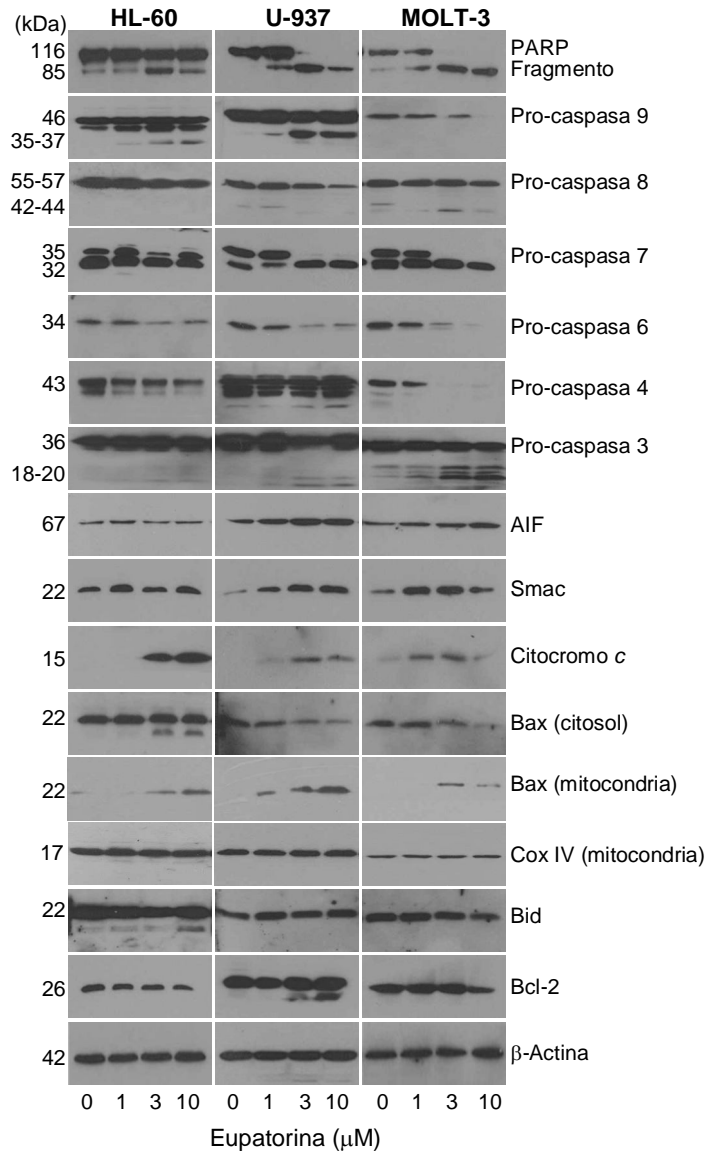
Para explorar el papel de las caspasas, las células se trataron con concentraciones crecientes de eupatorina durante 24 h y las caspasas se determinaron por transferencia Western. Los resultados indican que este compuesto estimula el procesamiento de las pro-caspasas-9 y -8 iniciadoras y el procesamiento proteolítico de las procaspasas ejecutoras -3, -6 y -7 (Figura 11). La proteína poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), uno de los sustratos de la caspasa-3, fue procesada generando un fragmento de 85 kDa en células expuestas a eupatorina. También se observa una disminución de la pro-caspasa-4, sugiriendo que la eupatorina induce el procesamiento de este zimógeno que está implicado en el estrés del retículo endoplasmático [83]. Para conocer si la apoptosis inducida por la eupatorina implica la liberación del citocromo *c* mitocondrial, se analizaron las preparaciones citosólicas y se observó un aumento significativo en los niveles de citocromo *c* en el citosol después del tratamiento con 1  $\mu$ M (MOLT-3) o 3  $\mu$ M (HL-60 y U-937) de eupatorina. Además, la eupatorina también indujo la liberación de otras proteínas mitocondriales al citosol, tales como el factor inductor de apoptosis (AIF) y Smac/DIABLO.

Puesto que las mitocondrias son importantes en las rutas de señalización que conducen a la apoptosis y puesto que esta ruta de muerte celular está regulada por la familia de proteínas Bcl-2, seguidamente se investigaron si los cambios en la expresión o en la localización de estas proteínas estaban asociados con la muerte celular. El tratamiento de las células HL-60 y MOLT-3 con eupatorina a concentraciones suficientes para inducir apoptosis disminuyó la expresión de la



proteína Bcl-2, mientras que en células U-937 el tratamiento con 3  $\mu$ M de eupatorina indujo el procesamiento de la proteína Bcl-2. Sin embargo, en células no tratadas la proteína Bax se localizó predominantemente en la fracción citosólica y la incubación con eupatorina indujo una redistribución de este factor pro-apoptótico desde el compartimento citosólico al mitocondrial. Curiosamente, un fragmento de 18 kDa generado a partir de la proteína completa Bax de 22 kDa se detectó solamente en las células HL-60 tratadas con el flavonoide. Para explorar si la eupatorina conduce a la activación de Bid, se analizó los niveles y/o el procesamiento de esta proteína solo BH3 que media la liberación de citocromo *c* de la mitocondria inducida por caspasa-8 en respuesta a la activación de receptores de muerte de la superficie celular. Los experimentos demostraron una disminución de los niveles de la proteína Bid en las células HL-60 y MOLT-3, presumiblemente reflejando procesamiento o activación. Aunque no hubo un claro procesamiento de Bid en las células U-937, la pro-caspasa-8 disminuyó significativamente evidenciado por la disminución en la cantidad de la pro-enzima de 55-57 kDa. Para confirmar que la muerte celular desencadenada por la eupatorina requiere la activación de las caspasas, las células HL-60 y MOLT-3 se trataron con eupatorina en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk, y posteriormente se determinó la extensión de apoptosis. Los resultados (Figura 12) muestran una reducción significativa en el porcentaje de células hipodiploides en presencia del inhibidor general de caspasas, lo que sugiere que la eupatorina induce apoptosis por un mecanismo dependiente de caspasa.

## Resultados



*Figura 11. Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por la eupatorina en células leucémicas humanas. Las células se incubaron en presencia de las indicadas concentraciones de eupatorina y los lisados celulares (o los extractos citosólicos en el caso de citocromo *c*, AIF y Smac) se ensayaron por transferencia Western. La  $\beta$ -actina y la Cox IV (citocromo *c* oxidasa) se usaron como controles de carga en el citosol y en la mitocondria, respectivamente.*

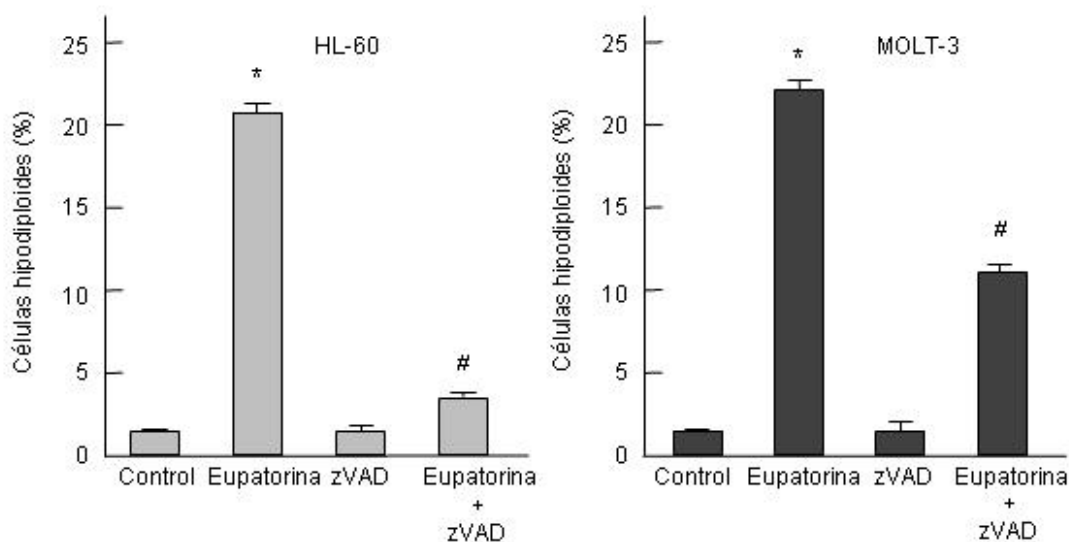
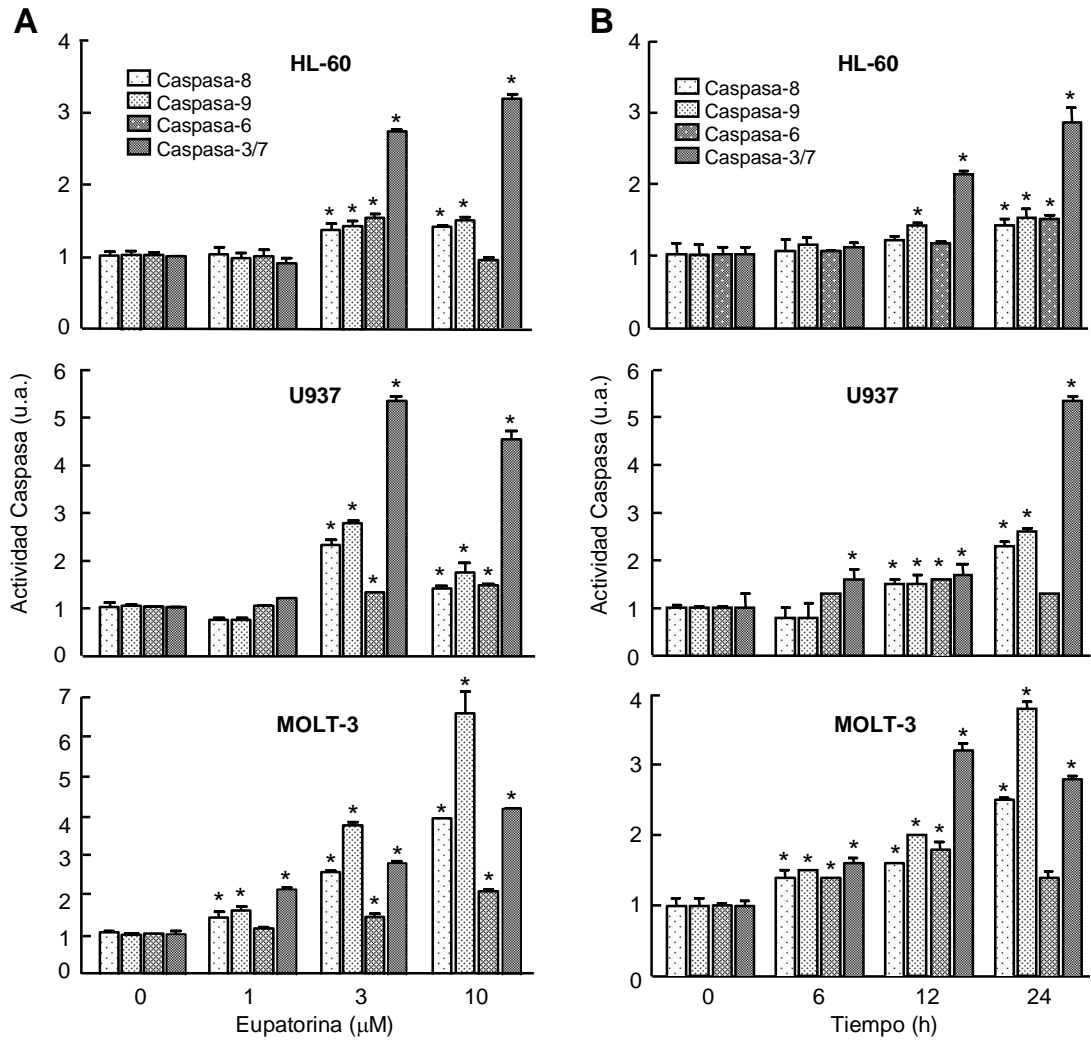


Figura 12. Efecto del inhibidor permeable general de caspasas z-VAD-fmk sobre la apoptosis inducida por la eupatorina. Las células HL-60 y MOLT-3 se incubaron con 10  $\mu$ M de eupatorina durante 24 h, en ausencia o presencia de z-VAD-fmk (100  $\mu$ M) y las células apoptóticas (es decir, con ADN hipodiploide) se cuantificaron por citometría de flujo después de la tindi3n con yoduro de propidio. \* indica  $P < 0,05$  por comparaci3n con el control no tratado, # indica  $P < 0,05$  por comparaci3n con el tratamiento con la eupatorina sola.

Dado que el procesamiento de las caspasas no siempre se correlaciona con la actividad, tambi3n se investigaron las actividades enzimáticas. Tal como se muestra (Figura 13A), la estimulaci3n de las actividades caspasa-3/7, caspasa-8 y caspasa-9 aument3 en presencia de eupatorina despu3s de 24 h de tratamiento y este efecto fue dependiente de la concentraci3n. Para estudiar la cin3tica de activaci3n de las caspasas, las c3lulas se trataron con esta flavona y despu3s se recogieron en varios intervalos. El aumento de las actividades de las caspasas iniciadoras, caspasa-8 y -9, fue significativamente detectable a las 6 h (MOLT-3) o a las 12 h (HL-60 y U-937) de tratamiento (Figura 13B). Estos hallazgos indican que la eupatorina activa

## Resultados

simultáneamente a las caspasas-8 y -9 y también promueve una marcada activación de las caspasas-3/7, mientras que la caspasa-6 ejecutora mostró un menor grado de activación.



*Figura 13. Dependencia de la concentración y cinéticas de la activación de caspasas en respuesta a eupatorina en células leucémicas humanas. (A) Activación de las caspasas en respuesta a eupatorina. Las células se trataron con la concentración indicada de eupatorina y se recolectaron a las 24 h. Los lisados celulares se ensayaron para determinar las actividades caspasa-9, caspasa-8, caspasa-6 y caspasa-3/7 usando los sustratos colorimétricos Ac-LEHD-pNA, Ac-IETD-pNA, Ac-VEID-pNA y Ac-DEVD-pNA, respectivamente. Los valores representan el aumento de la actividad caspasa respecto al control no tratado. (B) Cinéticas de activación de las caspasas en*

respuesta a eupatorina. Las células se trataron con 3  $\mu$ M de eupatorina, se recolectaron a los tiempos indicados, y los lisados celulares se ensayaron y los resultados se expresan como el aumento de la actividad caspasa respecto al control no tratado. \* indica  $P < 0,05$  por comparación con el control no tratado.

#### 4.4. La eupatorina activa a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs)

Dado que las MAPKs desempeñan un papel esencial en la proliferación celular y la apoptosis, los efectos de la eupatorina en la activación de estas proteínas quinasas se investigaron en células HL-60. Los resultados muestran una fosforilación rápida (1-2 h) de ERK 1/2 y de JNK / SAPK que permanecieron aumentadas durante al menos 8 h, mientras que no se detectó la activación de p38<sup>MAPK</sup> (Figura 14).

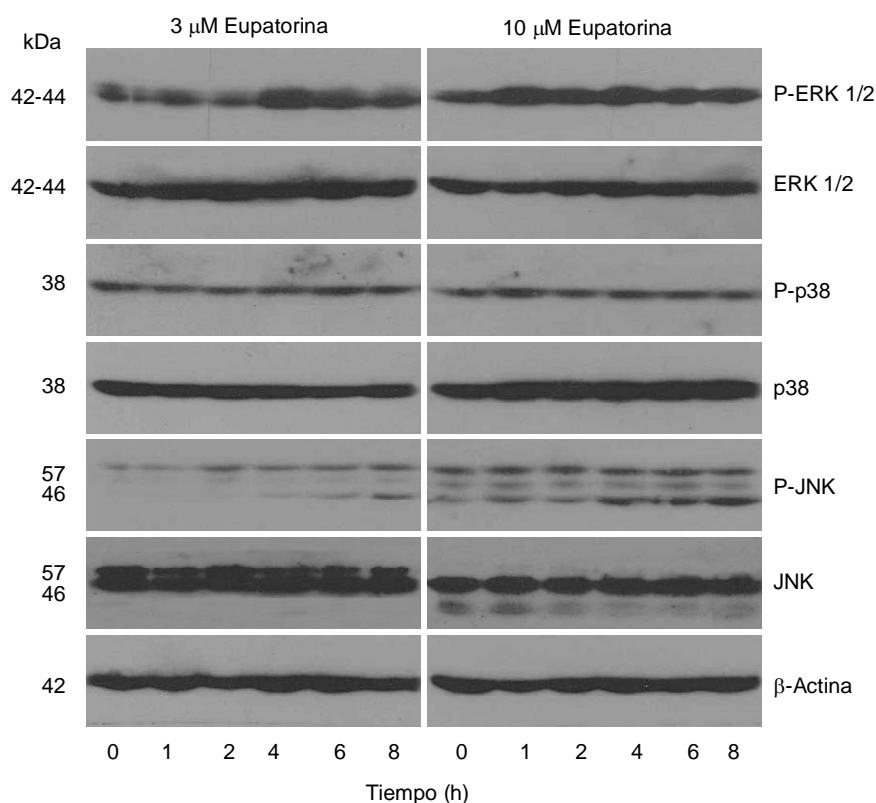


Figura 14. La eupatorina induce la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Las células HL-60 se trataron con la concentración indicada

## Resultados

de eupatorina durante los tiempos especificados y los lisados celulares se ensayaron para determinar la fosforilación de las MAPKs por transferencias Western.

Para determinar la posible implicación de las MAPKs en la apoptosis inducida por eupatorina, se investigó el efecto de inhibidores específicos de las proteínas quinasas activadas por mitógenos extracelulares 1/2 (MEK1 / 2) (PD98059 y U0126), p38<sup>MAPK</sup> (SB203580) y JNK / SAPK (SP600125). Ni la inhibición de las quinasas activadas por mitógenos extracelulares 1/2 (MEK1/2), ni la inhibición de p38<sup>MAPK</sup> afectó a la muerte celular inducida por eupatorina. Sin embargo, el tratamiento de las células con el inhibidor de JNK / SAPK redujo significativamente la apoptosis mediada por eupatorina (Figura 15).

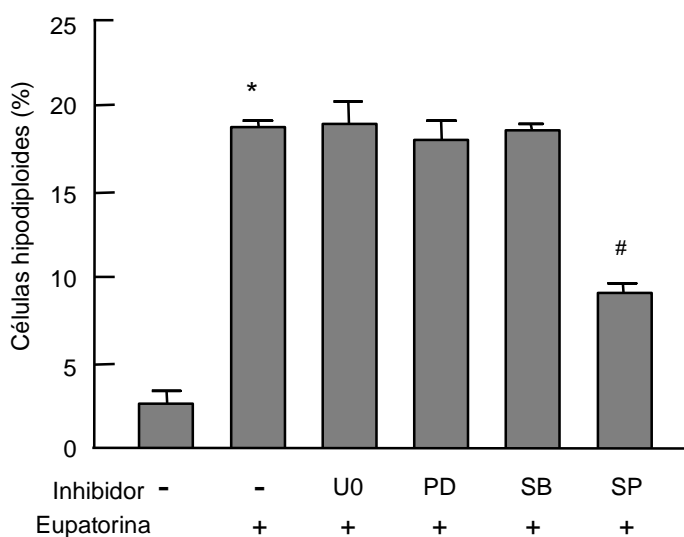


Figura 15. Efecto de los inhibidores de la vía de MAPKs sobre la apoptosis inducida por la eupatorina. Las células se pretrataron con U0126 (U0, 10  $\mu$ M), PD98059 (PD, 10  $\mu$ M), SB203580 (SB, 2  $\mu$ M) y SP600125 (SP, 10  $\mu$ M) durante 1 h y después se incubaron con eupatorina durante 24 h y las células hipodiploides se cuantificaron por citometría de flujo. \* indica  $P < 0,05$  por comparación con el control no tratado, # indica  $P < 0,05$  por comparación con el tratamiento con eupatorina sola.

#### 4.5. Las especies reactivas del oxígeno están implicadas en la muerte celular inducida por eupatorina

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se consideran los principales mediadores de la señalización de apoptosis y el aumento de las concentraciones intracelulares pueden dar lugar a la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos y la muerte celular. Para verificar si las ROS están involucrados en la apoptosis inducida por eupatorina, las células se tiñeron con las sondas de 2',7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>-DCFDA) y dihidroetidio (DHE) y después se analizaron por citometría de flujo.

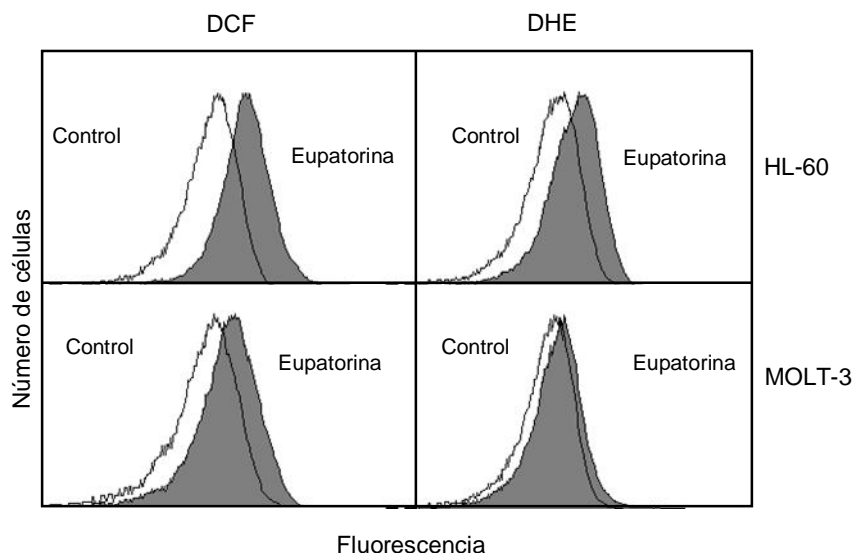


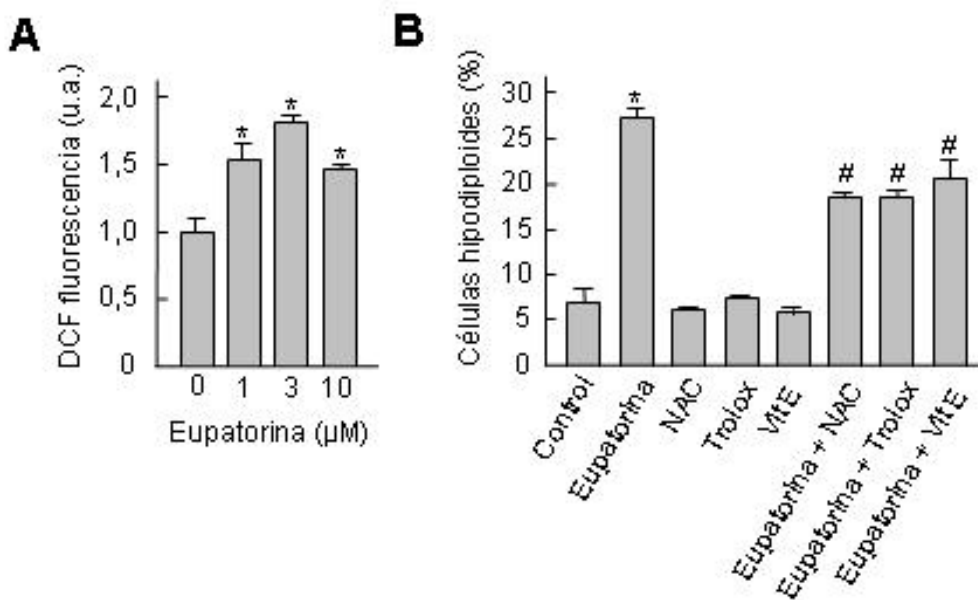
Figura 16. La eupatorina induce la generación de las especies reactivas del oxígeno. (A) Las células HL-60 y MOLT-3 se incubaron con 10  $\mu$ M eupatorina durante 24 h y 6 h, respectivamente, y la fluorescencia de las sondas oxidadas H<sub>2</sub>-DCF o DHE se determinó por citometría de flujo.

Como se muestra en la Figura 16 y 17A, el tratamiento con la eupatorina aumenta la fluorescencia derivada de DCF en las células HL-60 y en MOLT-3 lo que sugiere que la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros peróxidos se vió afectada por eupatorina

## Resultados

en ambas líneas celulares. Se observó un incremento de 2,4 veces y de 1,8 veces en la fluorescencia derivada de DCF en las células HL-60 y en MOLT-3, respectivamente.

Para valorar la producción de anión superóxido, las células se incubaron con DHE, una sonda fluorescente que es relativamente específica para el anión superóxido y que reacciona sólo mínimamente con peróxido de hidrógeno. La eupatorina aumentó la fluorescencia derivada de DHE (aproximadamente 2 veces) en células HL-60. Por el contrario, no se observaron cambios en la fluorescencia derivada de DHE en células MOLT-3 tratadas con eupatorina.



*Figura 17. La eupatorina induce la generación de las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes bloquean la muerte celular. (A) Las células MOLT-3 se incubaron con eupatorina durante 6 h y la fluorescencia derivada de H<sub>2</sub>-DCF se determinó por citometría de flujo. (B) Las células MOLT-3 se preincubaron con N-acetil-L-cisteína (NAC, 10 mM), trolox (2 mM) y vitamina E (25  $\mu\text{M}$ ) durante 1 h y después se incubaron con eupatorina (10  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h y las células apoptóticas*



se cuantificaron por citometría de flujo. Los valores representan medias  $\pm$  errores estándar de dos experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado.

\* indica  $P < 0,05$  por comparación con el control no tratado, # indica  $P < 0,05$  por comparación con el tratamiento con eupatorina sola.

Para investigar si se requiere la producción de ROS para la muerte celular inducida por eupatorina, las células MOLT-3 se preincubaron con 10 mM de *N*-acetil-L-cisteína (NAC), 25  $\mu$ M  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y 2 mM trolox, derivado hidrosoluble de la vitamina E. Los resultados demuestran que estos antioxidantes bloquean significativamente la apoptosis, lo que indica que la generación de ROS juega un papel importante en el mecanismo de la muerte celular provocada por eupatorina (Figura 17B).



## DISCUSIÓN

---

*Evaluación de la actividad antiproliferativa de la eupatorina*



**Discusión**

Aunque existen tratamientos eficaces para la leucemia mielógena crónica y la leucemia linfocítica aguda, se necesitan tratamientos más eficaces para otras formas de leucemia aguda. Este objetivo ha llevado a un interés creciente en la investigación y desarrollo de compuestos de origen natural para la quimioprevención o recurrencia del cáncer. En los últimos años, los flavonoides han despertado un creciente interés porque muestran una amplia gama de actividades biológicas, incluidas las propiedades antitumorales [84]. En este estudio, hemos demostrado que la eupatorina muestra un efecto anti-proliferativo en tres líneas celulares de leucemia humana, con valores de  $IC_{50}$  similares. Aunque este compuesto promueve la condensación y la fragmentación de la cromatina, no se observó el patrón típico en “escalera” durante el análisis del ADN. Este resultado sugiere que otros factores pueden estar implicados. Por ejemplo, la flavoproteína mitocondrial denominada factor inductor de apoptosis, AIF, es una molécula de señalización que se transloca al núcleo e induce fragmentación del ADN a gran escala sin generar una escalera de ADN, condensación de la cromatina y muerte celular [85]. El análisis de la distribución de las fases del ciclo celular puso de manifiesto que la eupatorina induce acumulación de células en fase  $G_2$ -M y aumenta el porcentaje de células en la región sub- $G_1$  que se considera la fracción de células apoptóticas. Por otra parte la muerte celular estuvo asociada con la externalización del fosfolípido fosfatidilserina.

Se ha demostrado que muchos fármacos contra el cáncer causan la muerte de las células sensibles mediante la inducción de apoptosis. Este tipo de muerte celular se considera una importante respuesta a la mayoría de los fármacos

## *Discusión*

quimioterapéuticos en las células de leucemia [86-88] y puede ocurrir con o sin la activación de caspasas.

Los resultados presentados aquí demuestran que el efecto antiproliferativo de la eupatorina depende de la actividad de las caspasas puesto que la apoptosis desencadenada por esta flavona se bloqueó completamente (HL-60) o parcialmente (MOLT-3) por el inhibidor pan-caspasa z-VAD-fmk. Estos resultados sugieren la implicación de las vías adicionales de muerte celular, tales como la vía lisosomal que implica una rotura parcial de la membrana de los lisosomas y posterior liberación de las catepsinas en el citosol [89]. Se requieren más estudios para determinar si las catepsinas lisosomales podrían estar también implicadas en la muerte celular inducida por la eupatorina.

En muchas respuestas apoptóticas, las mitocondrias desempeñan un papel importante en la coordinación de la activación de las caspasas mediante la liberación de factores apoptogénicos, tales como el citocromo *c*, el Smac / DIABLO y el factor inductor de apoptosis AIF. La eupatorina induce la liberación de citocromo *c* desde el espacio intermembrana, y por lo tanto la activación de la caspasa-9 y la caspasa-3, lo que indica que la vía apoptótica intrínseca juega un papel importante en la muerte celular. La presencia de citocromo *c* en el citosol es esencial para la formación y la activación del apoptosoma. También se observó la liberación de otras proteínas mitocondriales tales como Smac / DIABLO y el factor inductor de apoptosis AIF después del tratamiento con eupatorina. La proteína Smac / DIABLO es un factor proapoptótico mitocondrial que también participa junto con el citocromo *c* en la

activación de esta cascada, mientras que el factor inductor de apoptosis AIF se transloca al núcleo donde contribuye a la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN a gran escala [90].

Estos datos sugieren que la vía intrínseca desencadenada por la eupatorina puede operar también a través de mecanismos independientes de caspasa. Sin embargo, los experimentos demuestran claramente el procesamiento proteolítico y la activación de la pro-caspasa-8 iniciadora, lo que sugiere que esta cisteína proteasa puede ser importante para la citotoxicidad inducida por la eupatorina en células de leucemia. Este resultado es interesante porque la caspasa-8 provoca la activación directa de las caspasas ejecutoras y desencadena la apoptosis a pesar de la protección mitocondrial conferida por los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. El aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica de Bcl-2 se asocia con la resistencia celular a los fármacos quimioterapéuticos convencionales, especialmente en el caso de neoplasias hematológicas [91]. En esta Tesis describimos que el tratamiento con la eupatorina disminuye los niveles de la proteína Bcl-2 en las células HL-60 y MOLT-3 e induce la escisión de la proteína mitocondrial Bcl-2 en las células U-937. Estudios previos han demostrado que la proteína anti-apoptótica Bcl-2 se convierte en un factor pro-apoptótico potente y puede potenciar la muerte celular mediante la amplificación de la cascada de las caspasas, y que la escisión de Bcl-2 por la caspasa-3 genera un fragmento de 22 kDa que induce la liberación del citocromo *c* mitocondrial [92]. Además, la eupatorina también indujo la escisión de la proteína Bax en las células HL-60 para generar un fragmento de 18 kDa conocido

## *Discusión*

por presentar una mayor eficacia que la proteína completa en promover el aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial [93].

La caspasa-8 activa induce la escisión de Bid y la translocación de Bid truncado a la mitocondria aumenta la permeabilidad mitocondrial, lo que conduce a la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales [94]. En este trabajo hemos encontrado que la eupatorina indujo una disminución (MOLT-3) o una escisión (HL-60) de la proteína Bid. Aunque en la mayoría de los casos la proteína Bid truncada parece ser necesaria para inducir un aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, también se ha sugerido que la proteína completa Bid desempeña un posible papel pro-apoptótico [95,96].

La eupatorina también estimuló el procesamiento proteolítico y la activación de otras caspasas ejecutoras, tales como la caspasa-6 y la caspasa-7, que podrían cooperar con la caspasa-3 para inducir la muerte celular. Por otra parte, la vía de señalización de estrés del retículo endoplasmático podría estar implicada ya que la eupatorina también indujo el procesamiento de la pro-caspasa-4.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) regulan la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Dos miembros de esta familia, *c-Jun N-terminal* quinasas / proteínas quinasas activadas por estrés (JNK / SAPK) y p38<sup>MAPK</sup> juegan un papel esencial en el desencadenamiento de la muerte celular en respuesta a diversos factores de estrés, incluyendo el estrés oxidativo.



En el presente estudio, mostramos que la fosforilación de JNK / SAPK se produjo después de 1-2 h de tratamiento con eupatorina y la fosforilación permaneció elevada durante al menos 8 h y que la inhibición de esta quinasa por SP600125 disminuye significativamente la muerte celular inducida por eupatorina. Estos resultados sugieren que JNK / SAPK se requiere al menos en parte, para la muerte celular.

La eupatorina también estimuló la activación de la vía MEK / ERK 1/2 pero la combinación de este flavonoide y los inhibidores específicos de las quinasas activadas por mitógenos extracelulares (MEK) 1/2 PD98059 y U0126 ni atenuaron ni potenciaron la muerte celular. La señalización p38<sup>MAPK</sup> no parece ser necesaria para la apoptosis inducida por la eupatorina ya que no hay una clara activación / fosforilación de p38<sup>MAPK</sup> y el inhibidor de p38<sup>MAPK</sup> SB203580 no atenuó la apoptosis.

Se ha descrito que las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden actuar como segundos mensajeros en varias vías de señalización, incluyendo la muerte celular apoptótica y necrótica [97]. El efecto antiproliferativo de la eupatorina está asociado con un aumento en la concentración intracelular de ROS, que parecen jugar un papel crucial en el proceso de apoptosis ya que diferentes antioxidantes bloquearon parcialmente la muerte celular.

En resumen, los resultados del presente estudio indican que la eupatorina induce la muerte celular en líneas celulares de leucemia humana a concentraciones

### *Discusión*

que podrían ser alcanzados *in vivo*. La eupatorina induce citotoxicidad a través de un mecanismo que implica detención del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>-M y apoptosis. Esta modalidad de muerte celular es dependiente de caspasa, está asociada con la liberación del citocromo *c*, y es dependiente de la generación de las especies reactivas del oxígeno. La eupatorina induce la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos y la activación de las proteínas *c-Jun N-terminal* quinasas / proteínas quinasas activadas por estrés (JNK / SAPK) es esencial para la muerte celular. Estos resultados proporcionan una base para evaluar las posibles aplicaciones de la eupatorina y / o compuestos estructuralmente similares en la lucha contra el cáncer.

## **CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

1. La flavona natural eupatorina induce muerte celular en tres líneas celulares de leucemia humana a concentraciones que podrían ser alcanzadas *in vivo*.
2. La eupatorina inhibe la viabilidad celular sin diferencias significativas en las tres líneas celulares presentando valores de IC<sub>50</sub> de ~ 5 µM.
3. La citotoxicidad inducida por eupatorina fue precedida por la detención del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>-M.
4. La muerte celular desencadenada por la eupatorina es dependiente de caspasas. La ausencia de un bloqueo total de la muerte celular inducida por el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk sugiere la existencia de otras rutas de inducción de muerte adicionales.
5. La eupatorina induce una activación simultánea de las caspasas iniciadoras caspasas-8 y -9 y también promueve una marcada activación de las caspasas ejecutoras -3 y -7.
6. La muerte celular inducida por la eupatorina está asociada con la liberación de las proteínas mitocondriales citocromo *c*, Smac/DIABLO y AIF (factor inductor de apoptosis).
7. La eupatorina disminuye la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en HL-60 y MOLT-3 o induce su procesamiento en U-937.
8. La eupatorina induce la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos.
9. La activación de las proteínas *c*-Jun *N*-terminal quinasas / proteínas quinasas activadas por estrés (JNK / SAPK) es esencial para la muerte celular.
10. La muerte celular inducida por la eupatorina es dependiente de la generación de las especies reactivas del oxígeno.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---





## BIBLIOGRAFÍA

1. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 1995, p. 1335.
2. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000; 52:673-751.
3. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016; 79:629-661
4. J. B. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55:481–504.
5. Geahlen RL, Koonchanok NM, Mclaughlin JL, Pratt DE. Inhibition of protein-tyrosine kinase activity by flavonoids and related compounds. *J Nat Prod* 1989; 52:982–986.
6. Bandele OJ, Osheroff N. Bioflavonoids as poisons of human topoisomerase II alpha and II beta. *Biochemistry* 2007; 46:6097–7108.
7. Austin CA, Patel S, Ono K, Nakane H, Fisher LM. Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem J* 1992; 282:883–889.
8. Boege F, Straub T, Kehr A, Bosenberg C, Christiansen K, Andersen A, et al. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J Biol Chem* 1996; 271:2262–2270.
9. Byun S, Lee KW, Jung SK, Lee EJ, Hwang MK, Lim SH, et al. Luteolin inhibits protein kinase C (epsilon) and cSrc activities and UVB-induced skin cancer. *Cancer Res* 2010; 70:2415–2423.
10. Yamasaki T, Takahashi A, Pan J, Yamaguchi N, Yokoyama KK. Phosphorylation of activation transcription factor-2 at serine 121 by protein kinase C controls c-Jun-mediated activation of transcription. *J Biol Chem* 2009; 284:8567–8581.
11. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:1205–1215.
12. Pan M-H, Chen W-J, Lin-Shiau S-Y, Ho C-T, Lin J-K. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2002; 23:1677–1684.

## Bibliografía

13. Dolečková I, Rárová L, Grúz J, Vondrusová M, Strnad M, Kryštof V. Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves. *Fitoterapia*. 2012; 83:1000-1007.
14. Lin CM, Chang H, Chen YH, Wu IH, Chiu JH. Wogonin inhibits IL-6-induced angiogenesis via down-regulation of VEGF and VEGFR-1, not VEGFR-2. *Planta Med* 2006; 72:1305–1310.
15. Lin CM, Chang H, Chen YH, Li SY, Wu IH, Chiu JH. Protective role of wogonin against lipopolysaccharide-induced angiogenesis via VEGFR-2, not VEGFR-1. *Int Immunopharmacol* 2006; 6:1690–1698.
16. Wang LM, Ren DM. Flavopiridol, the first cyclin-dependent kinase inhibitor: recent advances in combination chemotherapy. *Mini Rev Med Chem* 2010; 10:1058–1070.
17. Kim KS, Sack JS, Tokarski JS, Qian L, Chao ST, Leith L, Kelly YF, Misra RN, Hunt JT, Kimball SD, Humphreys WG, Wautlet BS, Mulheron JG, Webster KR. Thio- and oxoflavopiridols, cyclin-dependent kinase 1-selective inhibitors: synthesis and biological effects. *J Med Chem* 2000; 43: 4126–4134.
18. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev* 2003; 23:519-534.
19. Ravishankar D, Rajora AK, Greco F, Osborn HM. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013; 45:2821-2831.
20. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36:131-149.
21. McDonald ER 3rd, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol* 2000; 16:871-886.
22. Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 413-450.
23. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; 181–182: 471–474.
24. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35:495-516.
25. 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.

26. Bortner CD., Oldenburg NB, Cidlowski, JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1995; 5:21–26.
27. 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; 272:26159–26165.
28. 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.
29. Cohen, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1–16.
30. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 2008; 27:6194-6206.
31. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 2009; 284:21777-21781.
32. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.* 2010;123:3209-3214.
33. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:383-424.
34. Fulda S. Inhibitor of apoptosis proteins in pediatric leukemia: molecular pathways and novel approaches to therapy. *Front Oncol* 2014; 4:3.
35. 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; 274:22686–22692.
36. 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; 192:571–580.
37. 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; 83:5214–5218.
38. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13:1899-1911.
39. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX

## Bibliografía

- and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292:727-730.
40. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3668–3672.
  41. 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; 144:903-914.
  42. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettlesheim 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; 381:335-341.
  43. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399:483–487.
  44. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions. *J Clin Invest* 2015;125:487-489.
  45. Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:337-356.
  46. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813:558-563.
  47. Safa AR, Pollok KE. Targeting the anti-apoptotic protein c-FLIP for cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2011;3:1639-1671.
  48. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007;12:913-922.
  49. 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; 141:1423–1432.
  50. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15:7–10.
  51. 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; 67:1259-1267.
  52. Linder S, Shoshan MC. Lysosomes and endoplasmic reticulum: targets for improved, selective anticancer therapy. *Drug Resist Updat* 2005; 8:199-204.

53. 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; 279:3578-3587.
54. 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; 287:664-666.
55. Mandić 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; 22:3003-3013.
56. 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; 17:1069-1078.
57. 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.
58. 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; 165:347-356.
59. Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:3525-3544.
60. 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; 19:3551-3560.
61. 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; 17:7337-7350.
62. 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.
63. Cagnol S, Van Obberghen-Schilling E, Chambard JC. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-independent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis* 2006; 11:337-346.

## Bibliografía

64. 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; 87:619-628.
65. 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; 215:115-125.
66. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; 27:6245–6251.
67. Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* 2003; 278:2896–2902.
68. Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, et al. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994; 369:156–160.
69. Lamb JA, Ventura JJ, Hess P, Flavell RA, Davis RJ. JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell* 2003; 11:1479–1489.
70. Saha MN, Jiang H, Yang Y, Zhu X, Wang X, Schimmer AD, et al. Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma. *PLoS ONE* 2012;7:e30215.
71. 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; 21:701-710.
72. Bradham C, McClay DR. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle* 2006; 5:824-828.
73. Verma AK, Pratap R. The biological potential of flavones. *Nat Prod Rep*. 2010; 27:1571-1593.
74. Schinella GR, Giner RM, Recio MC, Mordujovich de Buschiazzo P, Ríos JL et al. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50:1069-1074.
75. Nagao T, Abe F, Kinjo J, Okabe H. Antiproliferative constituents in plants 10, Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull* 2002; 25:875-879.
76. Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, Awale S, Tran KQ et al. Constituents of the Vietnamese medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2000; 48:1711-1719.

77. Androutsopoulos V, Arroo RR, Hall JF, Surichan S, Potter GA. Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R39.
78. 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.
79. 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; 28:2105-2113.
80. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65:55-63.
81. 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.
82. 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; 72:248-254.
83. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003; 22: 8608-8618.
84. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96: 67-202.
85. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.
86. Dive C, Hickman JA. Drug-target interactions: only the first step in the commitment to a programmed cell death?. *Br J Cancer* 1991; 64:192-196.
87. Fisher DE. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994; 78: 539-542.
88. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metast Rev* 1992; 11:121-139.
89. Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ. Lysosomes in cell death. *Oncogene* 2004; 23: 2881-2890.

## *Bibliografía*

90. Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396:95-100.
91. Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC et al. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2000; 60:6101-6110.
92. Bellows DS, Chau BN, Lee P, Lazebnik Y, Burns WH et al. Antiapoptotic herpesvirus Bcl-2 homologs escape caspase-mediated conversion to proapoptotic proteins. *J Virol* 2000; 74:5024-5031.
93. Wood DE, Newcomb EW. Cleavage of Bax enhances its cell death function. *Exp Cell Res* 2000; 256:375-382.
94. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94:491-501.
95. Wang K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 1996; 10:2859-2869.
96. Sarig R, Zaltsman Y, Marcellus RC, Flavell R, Mak TW et al. BID-D59A is a potent inducer of apoptosis in primary embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* 2003; 278:10707-10715.
97. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004; 55:373-399.



**ANEXO**

---



## PUBLICACIÓN A LA QUE HA DADO ORIGEN ESTA TESIS

Autores (p. o. de firma): **Estévez S**, Marrero MT, Quintana J, Estévez F.  
Título: Eupatorin-Induced Cell Death in Human Leukemia Cells is Dependent on Caspases and Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway  
Revista PLoS ONE  
PLoS ONE 9(11): e112536. doi:10.1371/journal.pone.0112536. Fecha: 2014  
Lugar de publicación: EE.UU.

Indicios de calidad:

- A) Base de datos de indexación: Journal Citation Reports
- B) Año: 2014
- C) Índice de impacto: 3,534
- D) Posición que ocupa en la categoría: 8 de 55
- E) Categoría: Multidisciplinary Sciences.





En la presente Tesis Doctoral se describen los efectos de la flavona natural eupatorina sobre la viabilidad celular de tres líneas de leucemia humana y se aportan evidencias sobre su mecanismo de acción. Este compuesto induce parada del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>-M y muerte celular por apoptosis implicando la activación de múltiples caspasas, la liberación de citocromo *c* mitocondrial y el procesamiento del enzima de reparación del ADN poli(ADP-ribosa) polimerasa. Esta flavona activa la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos y la muerte celular es atenuada por la inhibición de las proteínas quinasas *N*-terminal de *c-jun*/proteínas quinasas activadas por estrés. Las vías de señalización de muerte celular desencadenadas por la eupatorina implican las vías intrínseca y extrínseca de activación de caspasas y la generación de las especies reactivas del oxígeno.