



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD APOPTOGÉNICA DE UNA SERIE  
ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS SEMI-SINTÉTICOS EN LA LÍNEA  
CELULAR TUMORAL PC3.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Jennifer Josefina Triviño Partida** como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología

**Tutor:** Dr. Iván Galindo Castro.

**Asesor académico:** Lic. Annamil Álvarez.

CARACAS, VENEZUELA

MAYO - 2014

## DEDICATORIA

---

*Principalmente quiero dedicar este Trabajo Especial de Grado a **Dios** por ser mi fortaleza en mis momentos de debilidad, por darme la fuerza para seguir adelante y no decaer ante los problemas que se me presentaban, por iluminar mi camino cuando más oscuro se ha puesto, y por brindarme una vida llena de mucho aprendizaje, experiencia, felicidad y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, un sueño que creí distante y hoy en día lo estoy logrando.*

*A mis Padres, **Nieves y José**, quienes me ha apoyado tanto, no solo en la carrera universitaria si no durante toda la vida, dándome su amor verdadero, su cariño, comprensión, cuidando de mi cuando enfermaba, consolándome cuando lo necesitaba, sobre todo en aquellos momento que sentía que no podía más con la Tesis; haciendo siempre sacrificios para que estuviese bien y un montón de cosas que solo ellos sabía hacer con tal de verme feliz. Gracias a ustedes soy lo que soy. ¡Te Amo mamá! ¡Te Amo papá!*

*A mis hermanos, **Yesica y Javier**, por estar conmigo siempre. Los Adorooo!*

*A quienes en todo momento me brindaron su apoyo para seguir adelante.*

## AGRADECIMIENTOS

---

*En primer lugar quiero agradecer a Dios por guiarme, por darme la fe para seguir cada día y lograr mi meta, por darme una familiar maravillosa que me acompañó a lo largo de este camino que se llama vida, también te agradezco por haberme dado a unos hermanos muy comprensivos, porque ellos me acompañaron en este largo camino que ahora estoy concluyendo. De no ser por la increíble familia que tú me regalaste, nada de esto hubiera sido posible.*

*A toda mi familia, a mi padre, a mi madre, a mis hermanos, por darme su apoyo incondicional, por estar a mi lado todo el tiempo apoyándome en las buenas y en las malas, por darme la fuerza para continuar cada día, por ayudarme en todo momento, por creer en mí y por demostrar que el amor que nos tenemos como familia es único y lo debemos conservar siempre. Gracias mamá por ser mi mejor ejemplo a seguir y enseñarme que con constancia y perseverancia puedo lograr todo aquello que me proponga. Gracias papá por demostrarme que puedo contar contigo para lo que sea y motivarme a seguir adelante superando cada obstáculo que tenga en el camino. Gracias mana por ser mi mejor amiga, por aguantarme, por acompañarme en mis noches de desvelo cuando tenía que estudiar para un parcial o escribir mi tesis y por tantas cosas que solo nosotras sabemos. Gracias gordito por darme ánimo y sacarme una sonrisa en esos momentos que más lo necesitaba. A mis tías, Thais y Gilma por acompañarme en cada paso, por darme su cariño, su amistad y consejos.*

*A mis primas Anyi y Yuli por ser fieles compañeras y demostrarme su amistad incondicional.*

*A Dr. Iván Galindo por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por haber confiado en mí, por su asesoría, por sus sabios concejos, por su comprensión, por toda su disposición y colaboración, así como también la calidad humana que demostró en todo momento hacia mi persona.*

*A todas las personas que me ayudaron y me brindaron su amistad desde el primer día que asistí al Laboratorio de Biotecnología, en especial a Annamil, Sabrina, Irina, Katherine, Jais, Pedro, Leandro, Riward, José, María Gabriela, Mayorie, María Alejandra, Nardy, Iraima y Carolina. A Blanca por ser como mi segunda mamá en el laboratorio, por su cariño, por sus concejos y darme ánimo a seguir adelante. A Dolly, mi compañera de laboratorio, por su ayuda incondicional, por recordarme la ilusión por la investigación, por escucharme mientras tomábamos el respectivo café, por acompañarme entre tantos tiempos de incubación y sobre todo por ser mi amiga. A la Dra. Alirica Suárez por toda su colaboración y disposición.*

*A “LA UNIVERSIDAD”, la casa que vence las sombras, por su excelencia, por ser mi segunda casa y darme los mejores años de mi vida.*

*A todos mis amigos en especial a Raibel, Carolina, Alejandro, Robert, Eleinis, Alicia, Mimi, Erick, Yaremis, Roberto, María, Kimberlyn y “El Gato”, por demostrarme una amistad verdadera en todo momento y por todos los momentos que hemos compartidos juntos. Los quiero muchísimo chi@s!.*

## INDICE GENERAL

---

|  |      |
|--|------|
| <i>Dedicatoria</i> .....   | II   |
| <i>Agradecimientos</i> .....   | III  |
| <i>Índice general</i> .....  | V    |
| <i>Índice de figuras</i> .....   | IX   |
| <i>Índice de tablas</i> .....  | XII  |
| <i>Resumen</i> .....   | XIII |
| 1. <i>Introducción</i> .....   | 1    |
| 1.1. <i>Cáncer</i> .....   | 1    |
| 1.2. <i>Apoptosis y cáncer</i> .....   | 2    |
| 1.3. <i>Estudios farmacológicos</i> .....  | 4    |
| 1.4. <i>Tipos de muerte celular: Apoptosis y necrosis</i> .....                              | 7    |
| 1.4.1. <i>Caspasas</i> .....   | 11   |
| 1.4.1.1. <i>Rutas de activación de caspasas</i> .....  | 16   |
| 1.4.1.2. <i>Proteínas reguladoras de la apoptosis</i> .....                                  | 27   |
| 2. <i>Antecedentes</i> .....   | 38   |
| 3. <i>Objetivos</i> .....  | 43   |
| 3.1. <i>Objetivo general</i> .....   | 43   |
| 3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....  | 43   |
| 4. <i>Materiales y Métodos</i> .....   | 45   |
| 4.1. <i>Serie estructural de compuestos semi-sintéticos derivados de la Caracasina</i> ..... | 45   |

|  |    |
|--|----|
| 4.2. Material Biológico.....   | 47 |
| 4.2.1. Línea celular PC3.....  | 47 |
| 4.2.2. Cultivos primarios de Fibroblastos.....   | 48 |
| 4.2.3. Mantenimiento del cultivo celular.....  | 49 |
| 4.3. Ensayos de citotoxicidad.....   | 50 |
| 4.3.1. Ensayo de citotoxicidad mediante el uso de MTT.....   | 50 |
| 4.4. Ensayos para evaluar la capacidad proapoptótica de los compuestos.....  | 52 |
| 4.4.1. Ensayo de Anexina V para la detección de células apoptóticas.....   | 52 |
| 4.4.2. Ensayo de TUNEL para la detección de fragmentación del ADN...55   |    |
| 4.4.3. Determinación de la actividad de Caspasa<br>3/7.....  | 58 |
| 4.4.4. Evaluación del cambio en el potencial de membrana mitocondrial<br>( $\Delta\Psi_m$ ).....                                   | 61 |
| 4.4.5. Análisis de proteínas claves en la activación de la apoptosis mediante<br>Western Blot.....                                 | 63 |
| 4.4.5.1. Extracción de proteínas.....  | 64 |
| 4.4.5.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método<br>de Bradford.....  | 65 |
| 4.4.5.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones<br>desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia de proteínas. 66 |    |
| 4.4.5.4. Inmunodetección de proteínas.....   | 68 |
| 4.4.5.5. Reutilización de membranas ( <i>Stripping</i> ).....  | 70 |
| 4.4.5.6. Anticuerpos utilizados.....   | 71 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.5. Diseño experimental y análisis estadístico.....   | 72  |
| 5. <i>Resultados</i> .....   | 73  |
| 5.1. Determinación del efecto citotóxico de una serie estructural de compuestos tipo seco- <i>ent</i> -kauranos en la línea celular tumoral, PC3 y cultivos no tumorales (cultivos primarios de fibroblastos) mediante ensayo con MTT..... | 73  |
| 5.2. Ensayo de Anexina V a través de citometría de flujo en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.....   | 80  |
| 5.3. Evaluación de la fragmentación del ADN en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41, mediante el ensayo de TUNEL.....   | 84  |
| 5.4. Determinación de la actividad de Caspasa 3 y 7 en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.....  | 92  |
| 5.5. Evaluación de cambios en el potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) a través de citometría de flujo en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.....   | 94  |
| 5.6. Inmunodetección de proteínas claves en la activación de la apoptosis.....   | 98  |
| 6. <i>Discusión</i> .....  | 103 |
| 6.1. Citotoxicidad de la serie estructural de compuesto estudiados en la línea celular PC3.....  | 105 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.2. Los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen la translocación de la PS de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática en la línea celular PC3..... | 113 |
| 6.3. Los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen en la línea celular tumoral PC3 la fragmentación del ADN.....   | 116 |
| 6.4. Los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen en la línea celular tumoral PC3 la activación de caspasas efectoras 3/7.....  | 119 |
| 6.5. Los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen hiperpolarización de la membrana mitocondrial en la línea celular tumoral PC3.....                                    | 121 |
| 6.6. Los compuestos KSC-21 y KSC-41 no afectan los niveles de expresión de Bcl2, Bcl-xL o Bax, sino los niveles de expresión de Survivina y AKT.....              | 126 |
| 7. Conclusiones.....  | 136 |
| 8. Recomendaciones.....   | 137 |
| 9. Bibliografía.....  | 138 |



## INDICE DE FIGURAS

---

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama que ilustra la secuencia de cambios estructurales durante de la activación de la apoptosis (2-6) y necrosis (7 y 8).....                     | 8  |
| Figura 2: Estructura y organización del dominio de las caspasas de mamíferos.....   | 13 |
| Figura 3. Activación de las Caspasas.....   | 14 |
| Figura 4. Activación de caspasas inducida por proximidad.....   | 15 |
| Figura 5. Activación de caspasas por asociación a una subunidad reguladora.....   | 15 |
| Figura 6. Vías de activación de las caspasas.....   | 17 |
| Figura 7. Complejos que inducen la señalización de muerte (DISC).....   | 18 |
| Figura 8. La familia de proteínas Bcl-2 se divide en tres grupos basados en la homología de acuerdo a la organización de dominios BH.....                       | 21 |
| Figura 9. Estructura de las proteínas IAPs.....   | 29 |
| Figura 10: Vía de señalización PI3K/AKT1.....   | 36 |
| Figura 11. Estructura de dos seco- <i>ent</i> -kauranos, compuestos aislados de flores de <i>Croton micans</i> .....  | 42 |
| Figura 12. Curvas Dosis-Respuesta de cada uno de los compuestos semi-sintéticos, tipo seco- <i>ent</i> -kauranos, sobre la línea celular tumoral PC3. ....      | 77 |
| Figura 13: Curvas Dosis-Respuesta de Cada uno de los compuestos seco- <i>ent</i> -kauranos sobre cultivos no tumorales: cultivos primarios de Fibroblastos..... | 78 |
| Figura 14. Ensayo de Anexina V en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41, mediante citometría de flujo.....              | 83 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 15. Evaluación de la fragmentación del ADN en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de la $CI_{50}$ del compuestos KSC-21 (3,60 $\mu$ M), mediante el ensayo de TUNEL..... | 86  |
| Figura 16. Evaluación de la fragmentación del ADN en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de la $CI_{50}$ del compuestos KSC-41 (6,42 $\mu$ M), mediante el ensayo de TUNEL..... | 87  |
| Figura 17. Porcentaje de citotoxicidad en células PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.....   | 90  |
| Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular en la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.....   | 92  |
| Figura 19. Porcentaje de actividad de caspasas 3/7 en la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.....  | 94  |
| Figura 20. Evaluación de cambios en el potencial mitocondrial de la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.....   | 97  |
| Figura 21. Porcentaje de potencial mitocondrial de la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.....   | 98  |
| Figura 22. Análisis del patrón de expresión de proteínas claves de la apoptosis en la línea celular PC3 bajo el efecto del compuesto KSC-21, mediante Western blot...                   | 101 |
| Figura 23. Análisis del patrón de expresión de proteínas claves de la apoptosis en la línea celular PC3 bajo el efecto del compuesto KSC-41, mediante Western blot...                   | 102 |
| Figura 24. Cambios en el tiempo de las células PC3 bajo el tratamiento con el compuesto KSC-21 .....  | 133 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 25. Cambios en el tiempo de las células PC3 bajo el tratamiento con el compuesto KSC-41 .....                       | 134 |
| Figura 26. Modelo de inducción de apoptosis en las células PC3 bajo el tratamiento con los compuestos KSC-21 y KSC-41..... | 135 |

## INDICE DE TABLAS

---

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Estructuras de la serie de compuestos tipo seco- <i>ent</i> kauranos derivados de la Caracasina (KSC-21).....   | 47 |
| Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas se específica el origen, dilución en la que se utilizan y su procedencia. ....                            | 71 |
| Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas analizadas por SDS-PAGE.....  | 71 |
| Tabla 4: Estructura y CI <sub>50</sub> de la serie de compuestos tipo seco- <i>ent</i> -kauranos en línea celular tumoral pC3 y en cultivos primarios de fibroblastos no tumorales. .... | 79 |

## RESUMEN

---

En la actualidad, muchos de los agentes anticancerígenos de uso clínico empleados para el tratamiento del cáncer corresponden a compuestos de origen natural, o derivados de éstos; aislados a partir de diversas fuentes, tales como plantas, animales y microorganismos. Debido a las diversas actividades biológicas que se le han atribuido, como la capacidad de activar las vías de señalización de muerte celular (apoptosis) en células tumorales, los compuestos naturales y sus derivados han atraído una gran atención en relación con la búsqueda de nuevos fármacos con potencial actividad apoptogénica. Hasta la fecha no existe ningún reporte de la serie estructural de compuestos semi-sintéticos derivados de la Caracasina en cuanto a su actividad citotóxica y su posible actividad proapoptótica, es por ello que el principal objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad apoptogénica de esos compuestos sobre la línea celular tumoral de origen protáctico PC3, con el fin de identificar compuestos líderes para el desarrollo de potenciales drogas antitumorales alternativas a las ya existentes en el mercado. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad (MTT) que permitieron establecer los valores de  $CI_{50}$  de los diferentes compuestos y, a través de ensayos de Anexina V, TUNEL, Caspase Glo 3/7 y la inmunodetección de proteínas claves en la activación de la apoptosis, se determinó que los compuestos KSC-21 y KSC-41 tienen una capacidad proapoptótica importante en las células PC3, mediada probablemente a través de la regulación de la vía de señalización PI3K/AKT1/Survivina.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1. El Cáncer

El cáncer se desarrollan en la mayoría de los tejidos y en todo tipo de células somáticas exceptuando las células germinales de organismos superiores (Luque y Herráez, 2002). Engloba un conjunto de enfermedades que se consideran de origen genético, ya que resultan de una acumulación de alteraciones genéticas que interfieren con el mantenimiento de la homeostasis tisular y conducen a la transformación de una célula normal en una célula cancerígena, la cual tiene la capacidad de proliferar rápidamente y de forma descontrolada formando un tumor (Hanaban y Weinberg, 2000). Las células cancerígenas del tumor maligno presentan la habilidad de invadir localmente o migrar a otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis (García, y col. 2000; Lowe y Lin, 2000).

El cáncer es un importante problema de salud pública, debido a que es la segunda causa de muerte en el mundo, siendo sólo superado por enfermedades cardiovasculares (Jemal y col., 2008; Jemal y col., 2011). Según los últimos registros de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2008 se encontró 7.6 millones de defunciones a causa del cáncer y se estima que este número siga aumentando en todo el mundo (Siegel y col., 2012).

Entre los diferentes tipos de cáncer, en el caso de las mujeres, el de mayor incidencia es el cáncer de mama y cuello uterino, mientras que en el caso de los hombres es el cáncer de pulmón y de próstata (Siegel y col., 2012).

En Venezuela encontramos para el año 2005, de acuerdo a lo publicado en el Anuario de Mortalidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), que el cáncer ocupa el segundo lugar entre las diversas causas de muerte, posición, que ha mantenido en los últimos 25 años, después de las enfermedades cardiovasculares y representando el 15 % de la mortalidad diagnosticada en el país para aquel tiempo (Capote, 2006).

El Ministerio del Poder Popular de la Salud en el 2006 mostro cifras actualizadas sobre el cáncer en Venezuela en el I simposio de AstraZeneca Oncología y corroboró que el cáncer de próstata es uno de los tipos de cáncer que más se diagnostican en la población masculina de Venezuela, después del cáncer de piel, manteniendo un ascenso moderado desde 1960 hasta 1980 (Aponte y col., 2006).

## **1.2. Apoptosis y cáncer**

Las investigaciones sobre la fisiología y genética del cáncer en los últimos años han desencadenado grandes avances; entre los más importantes se encuentra aquellos relacionados con el tema de la apoptosis, debido a que se han encontrado evidencias que indican que los genes que controlan este proceso tienen efectos sobre el fenotipo maligno (Lowe y Lin, 2000).

La apoptosis, un tipo de muerte celular; se activa mediante un programa regulado genéticamente, el cual permite a la mayoría de las células animales la capacidad de autodestruirse cuando no son necesarias o cuando sufren un daño irreversible en su ADN, es decir, la apoptosis controla la proliferación celular favoreciendo así el mantenimiento de la homeostasis tisular (Ghobrial y col., 2005). La desregulación de este proceso se encuentra relacionada con numerosas anomalías en el desarrollo embrionario, así como también con la patogénesis de múltiples enfermedades, como el cáncer (Pardo y col., 2004).

Las mutaciones que presenta la célula cancerígena convierten los genes reguladores de la proliferación o diferenciación en oncogenes desencadenantes de cáncer, ya que las mutaciones tienen la capacidad de inactivar las vías de señalización que inducen la apoptosis o activar las vías de regulación que inhiben dicho proceso (Pardo y col., 2004).

Hasta la fecha, la mayoría de los puntos clave en la regulación de la apoptosis celular se han identificado y pueden ser objetivo de estrategias terapéuticas. La identificación de los principales reguladores de la apoptosis ha impulsado una intensa investigación en el desarrollo de enfoques terapéuticos contra el cáncer. Un denominador común para muchos de estos enfoques es la eliminación de las células cancerosas mediante la inducción preferencial de la apoptosis en estas células sin afectar las células normales. (Bremer y col., 2006)



### **1.3. Estudios farmacológicos**

Las plantas se han usado como recurso terapéutico natural desde tiempos muy remotos. La ciencia confirma hoy en día la presencia en estas de compuestos químicos con acciones farmacológicas, las cuales muchas veces constituyen los elementos primarios empleados por laboratorios farmacéuticos como punto de partida en el desarrollo de formas comerciales que posteriormente serán patentadas para su uso terapéutico.

Una de las ciencias encargadas del estudio terapéutico de las plantas es la Fitoterapia, la cual se basa en la prevención, atenuación o curación de un estado patológico, usando para ello extractos obtenidos mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de las plantas, con el uso de solventes (alcohol, agua, mezcla de estos u otros solventes selectivos) y un proceso de extracción adecuado (Domínguez, 1973).

Desde hace mucho tiempo, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad y existen evidencias de cuatro clases de ellos importantes para el ser humano, entre los cuales se encuentran los terpenoides, alcaloides y compuestos nitrogenados relacionados, fenilpropanoides y compuestos fenólicos relacionados y flavonoides (Oscanoa, 2005)

En la actualidad, muchos de los agentes anticancerígenos (fármacos) de uso clínico empleados para el tratamiento del cáncer, corresponden a compuestos de origen natural o derivados de éstos, los cuales han sido aislados no solo de plantas,

sino también de animales y microorganismos. Entre las diversas actividades biológicas que se les han atribuido a dichos compuestos se encuentra la capacidad de activar las vías de señalización que inducen la apoptosis en células tumorales. Por esta razón, los productos naturales han atraído gran atención en relación a la búsqueda de nuevos fármacos con potencial actividad propapoptótica y anticancerígena (Cavagnari, 2011), es decir, fármacos u otras sustancias que bloquean el crecimiento y la propagación del cáncer (Blagosklonny, 2004).

Las terapias dirigidas contra el cáncer al centrarse en los cambios moleculares y celulares que son específicos para esta enfermedad, pueden ser más eficaces que otros tipos de tratamiento, incluyendo la quimioterapia y la radioterapia, y menos perjudicial para las células normales. Muchas terapias dirigidas contra el cáncer han sido aprobadas por la agencia de drogas y alimentos (por sus siglas en inglés, FDA) para el tratamiento de determinados tipos de cáncer. Otros están siendo estudiados en ensayos clínicos, estudios de investigación con personas, y muchos más están en pruebas preclínicas y estudios de investigación con animales. Terapias dirigidas contra el cáncer están siendo estudiados para su solo uso, en combinación con otras terapias dirigidas, y en combinación con otros tratamientos contra el cáncer, como la quimioterapia. (Blagosklonny, 2004)

Hasta el año 2004 la FDA aprobó 34 drogas para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, además de Avastin. Todos los medicamentos pueden ser clasificados como semi-selectivo, citotóxicos, o selectivos a un tejido, algunos de ellos son: Alimta (Pemetrexed), Avastin (Bevacizumab), Erbitux (Cetuximab), Bexxar

(Tositumonab), Velcade (Bortezomib), Iressa (Gefitinib), Eloxatin (Oxaliplatin), Zevalin (Ibritumomab), Temodar (Temozolomide), Leustatin (Cladribine), Docetaxel (Taxotere), Taxol, Paclitaxel, entre otros. (Blagosklonny, 2004)

Para el cáncer de próstata uno de los tratamientos más utilizados es el uso del agente Docetaxel; además de ser estabilizador de los microtúbulos en las células e inductor de la fosforilación, es también inactivador del gen bcl-2, por lo que su uso, combinado con un agente antiproliferativo, representa una alternativa en el tratamiento de este. Por otra parte, nuevos tratamientos con el mismo agente han resultado prometedores, como ha sido el caso de combinar el Docetaxel con la vitamina D o con inhibidores de la angiogénesis, como la telidomida. El tratamiento con Docetaxel incrementa la apoptosis mediada por el factor TRAIL en células del cáncer de próstata. (Mayora y Arvelo, 2011)

En la terapia utilizada contra el cáncer de próstata también se han estado empleando diferentes productos encontrados en diversos vegetales y frutos los cuales actúan a través de señales celulares induciendo la apoptosis e inhibiendo la proliferación celular. Entre muchos ejemplos destacaremos los más resaltantes y prometedores, como lo son: el licopeno, la curcumina y el fitoestrógeno genisteína.

El licopeno induce la apoptosis e inhibe la proliferación en las células malignas del cáncer de próstata. En el caso de la Curcumina, ésta induce la apoptosis en células del cáncer de próstata a través de la vía de inhibición de NF-kB y AP-1; también reduce la expresión de MDM2 a través de la activación de PI3K/mTOR/ETS2 independiente de p53 e incrementa el efecto a la radiación sobre las células tumorales. Por otra parte, la Genisteína reduce la expresión de MDM2 y se ha encontrado, en estudios

realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, que la misma inhibe la proliferación celular e induce a la apoptosis. En las células de la línea celular DU145, originada de un cáncer de próstata, la genesteína indujo la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido-dismutasa (SOD) y catalasa a través de la activación de AMPK e incremento en la expresión de PTEN. En otros estudios, la combinación genisteína-selenio indujo una inhibición del crecimiento en la línea celular PC3 andrógeno independiente y la línea LNCaP andrógeno dependiente, que en ambos casos es dosis-dependiente, llevando a unos resultados que son prometedores y pudieran ser la base de una terapia adyuvante para el cáncer de próstata- (Piantino y col., 2009; Mayora y Arvelo, 2011).

#### **1.4. Tipos de muerte celular: Apoptosis y necrosis**

La muerte celular puede ocurrir por medio de dos vías principales con características muy distintas: necrosis y apoptosis (Figura 1) (Kerr y col., 1972; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Stepien y col., 2007).

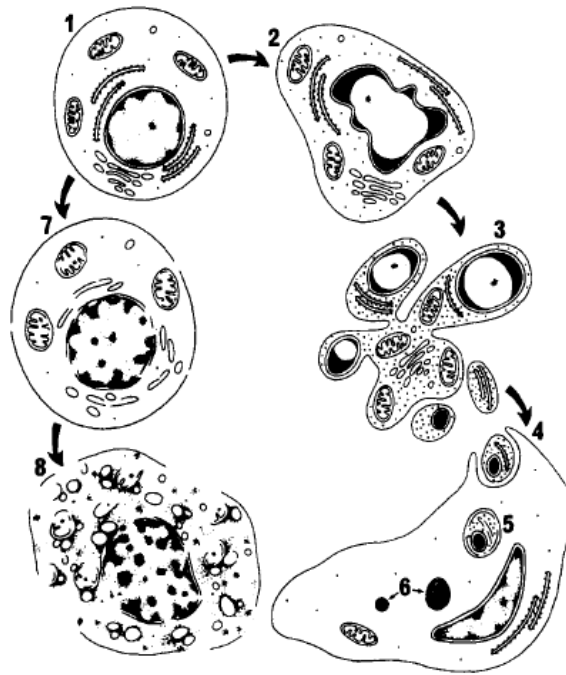


Figura 1. Diagrama que ilustra la secuencia de cambios estructurales durante de la activación de la apoptosis (2-6) y necrosis (7 y 8). (1) Célula normal, principios de la apoptosis. (2) Se caracteriza por la compactación y la marginación de la cromatina nuclear, condensación del citoplasma, y la convolución de contornos nucleares y celular. (3) En una etapa posterior, los fragmentos del núcleo, y protuberancias que se forman en la superficie de la célula se separan para producir cuerpos apoptóticos, que (4) serán fagocitados por las células cercanas o macrófagos y (5 y 6) degradadas dentro de los lisosomas. (7) El desarrollo de la necrosis se asocia con el agrupamiento irregular de la cromatina, además del desencadenamiento de un marcado proceso de inflamación. (8) Las membranas posteriormente se desintegran, pero la células normalmente conserva su forma general hasta que sean retirados por los fagocitos mononucleares (Tomado y modificado de Kerr y col., 1994).

La necrosis es un tipo de muerte celular que reúne una serie de eventos violentos y catastróficos, que implican la degeneración celular pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP (Figura 2). Este proceso presenta cambios irreversibles en el núcleo celular (cariólisis), pérdida de la estructura citoplasmática,

pérdida de función de la mitocondria y aumento en el volumen celular; desencadenando citólisis (Zhivotovsky y Orrenius, 2001). La pérdida aguda de la regulación y de la función celular, conlleva a un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular; liberando todo el material citoplasmático hacia el exterior de la célula. Este fenómeno aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas; conduciendo también a las células vecinas hacia la muerte; desencadenando reacciones de inflamación (Deigner y Kinscherf, 1999).

Por el contrario, la apoptosis (Figura 1) es un tipo de muerte celular programada donde las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones inflamatorias. Por lo que se considera un proceso fisiológico dependiente de energía, que elimina células no deseadas, dañadas o desconocidas, con el fin de mantener la homeostasis tisular (Deigner y Kinscherf, 1999; Elmore, 2007), así como también ejercer un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2004). Además involucra la activación de un grupo de cisteín proteasas (caspasas), amplificadoras de señales y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula (Elmore, 2007).

Este proceso se puede dividir en tres fases distintas: fase inicial, fase de ejecución y fase de degradación. En la fase inicial, se induce la activación del proceso apoptótico, las células reciben estímulos apoptóticos entre ellos: privación de factores de crecimiento o de oxígeno, agentes citotóxicos, ligando de receptor de membrana, entre otros. La fase de ejecución, implica eventos bioquímicos que resultan de

estímulos letales que conducen a un efector central, donde su activación conduce a la segunda fase común y reguladora de la muerte celular; la progresión de esta etapa constituye un punto de no retorno de la señalización apoptótica. En la fase de degradación, la célula adquiere la morfología final del proceso apoptótico, entre estas: degradación del ADN alteración del citoesqueleto, fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos. (Arvelo, 2002)

En la célula, cuando el proceso de apoptosis se activa, ésta exhibe características morfológicas y bioquímicas diferentes a las células que mueren por necrosis.

Se da el estrechamiento rápido del citosol y una pérdida de contacto con las células vecinas por alteraciones en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática (Luque y Herráez, 2002).

En el núcleo hay compactación del material genético, segregación hacia la membrana nuclear y activación de las endonucleasas que generan la fragmentación internucleosomal del ADN. La fragmentación del ADN ocurre entre los nucleosomas, ya que son las únicas partes del ADN que se encuentran expuestas y por lo tanto accesibles a la endonucleasas, dando así origen a un patrón de fragmentos que van desde 180 pares de bases, fenómeno que se puede detectar mediante la extracción del ADN y su posterior separación mediante electroforesis en gel de agarosa, así como también mediante el ensayo enzimático de TUNEL (Terminal dUTP Nick End-

Labeling), el cual permite evaluar el grado de fragmentación del ADN en poblaciones celulares, a través del marcaje de los extremos 3'-OH del ADN (Alfaro y col., 2000).

Asimismo, el citoplasma se condensa y se forman vesículas, denominadas cuerpos apoptóticos que contienen restos del núcleo, organelos y retículo endoplásmico (Kolber, 1990). Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células vecinas o por macrófagos, impidiendo que moléculas citoplásmicas, organelos y material genético queden libres en el medio extracelular (Sevill y col., 1992).

Un cambio importante en la morfología y composición de la superficie celular es la translocación de un fosfolípido (fosfatidilserina (PS)) que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa. La exposición de la PS ocurre desde la fase de ejecución temprana de la apoptosis hasta la fase final, formación de agregados celulares denominados cuerpos apoptóticos, lo que favorece la fagocitosis rápida de los mismos por parte de los macrófagos o células detriticas (O'Brien y col., 1997). Este evento exclusivo de la apoptosis se puede evaluar mediante el ensayo de Anexina V, una proteína conjugada a un fluorocromo y de alta afinidad por la PS (Fadok y col., 1992).

#### **1.4.1. Las Caspasas**

Las caspasas (C-isteín asp-artato prote-asas) son miembros de la familia de las cisteín-proteasas, las cuales están caracterizadas por presentar un residuo de cisteína en su centro catalítico o sitio activo, además de tener la capacidad de



reconocer una secuencia de aminoácidos que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas el corte es a nivel de un residuo de aspartato. (Cohen, 1997)

Las caspasas fueron implicadas en la apoptosis a partir del descubrimiento del producto del gen *ced-3*, descrito inicialmente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* como gen proapoptótico implicado en los procesos de muerte celular que tienen lugar durante su desarrollo embrionario (Cohen, 1997). Hasta la fecha se han identificado 14 caspasas de mamíferos, de las cuales solo 7 participan en la activación de la apoptosis. Se encuentran divididas en dos grandes grupos: iniciadoras y ejecutoras. El grupo iniciador de la apoptosis incluye a las caspasas 2, 8, 9, 10, y el grupo efector o ejecutor de la apoptosis incluye a las caspasas 3, 6, 7. Las caspasas 1, 4 y 5 conforma el grupo de las caspasas inflamatorias (Cohen, 1997; Elmore, 2007), las cuales regulan la maduración de citocinas en la inflamación; la caspasa 12 como mediadora de apoptosis endoplásmico-específica; la caspasa 13 fue descrita para bovinos; y la caspasa 14 se expresa en tejidos embrionarios pero no en adultos (Huerta y col., 2007; Elmore, 2007). Su expresión se limita al epitelio y está implicada en la diferenciación de los queratinocitos.

Las caspasas comparten una serie de características distinguibles de otras proteasas. Estas se encuentran en la célula como precursores inactivos procaspasas (zimógenos), entre 30-50 kD, que constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una grande (p20) (contiene el centro activo dentro de un motivo conservado QACXG) y otra pequeña (p10) (Figura 2) (Cerretti y col., 1992; Kidd, 1998).

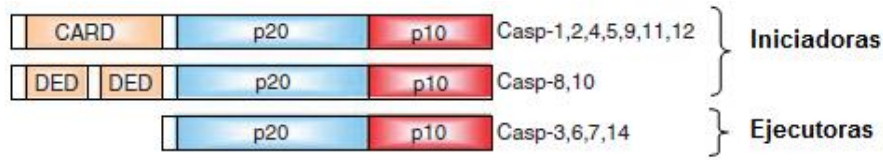


Figura 2: Estructura y organización del dominio de las caspasas de mamíferos. Las caspasas iniciadoras tienen prodominios largos, CARD o DED, mientras que las caspasas ejecutoras tienen prodominios cortos. (Tomado y modificado de Shi, 2002).

Las caspasas iniciadoras poseen prodominios largos que contienen uno de los dos motivos característicos de interacción proteína-proteína: el dominio efector de muerte (por sus siglas en inglés DED) o el dominio de reclutamiento de caspasas (por sus siglas en inglés CARD) (Figura 3). El dominio DED y CARD están involucrados en la interacción con las moléculas adaptadoras o activadoras, que propician la formación de complejos homodiméricos, los cuales favorecen su rompimiento autoproteolítico, es decir median su propia activación. (Strasser y col., 2000; Stennicke y col., 2002)

Las caspasas efectoras presentan prodominios cortos, que son procesadas y activadas por caspasas iniciadoras (Shi, 2002).

La activación de las caspasas en general es por autoproteólisis específica en dos fases, en la primera fase se separa la subunidad grande de la subunidad pequeña y posteriormente en la segunda fase se elimina el prodominio N-terminal. Una vez que se separan las subunidades, la subunidad grande se une a la subunidad pequeña formando un heterodímero por unión de sus sitios activos (Figura 3). Por lo tanto, la estructura de la caspasa activa viene dada por la unión de dos heterodímeros,

formando así un tetrámero donde las subunidades pequeñas se encuentran rodeadas por las subunidades grandes, las cuales contienen dos sitios catalíticos (Hengartner, 2000; Stennicke y col., 2002).

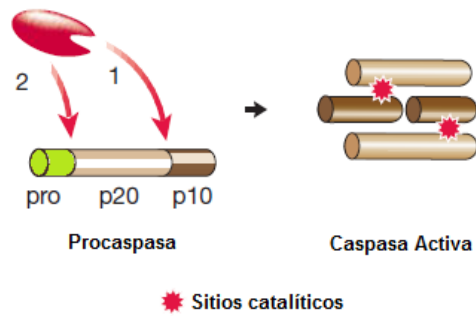


Figura 3. Activación de las Caspasas. (Tomado y modificado de Hengartner, 2000).

Sin embargo se han descrito otros mecanismos de activación de caspasas, como la activación inducida por proximidad en el caso de la caspasa 8, la cual juega un papel importante en la activación de la apoptosis mediante la vía de receptores de muerte. Una vez que el ligando de muerte se une a receptores de muerte, estos se agregan y forman un complejo de señalización de membrana, los cuales mediante proteínas adaptadoras reclutan varias moléculas de procaspasa 8. El aumento de la concentración de moléculas de procaspasa 8 favorece a que entre ellas mismas se corten y se activen (Figura 4) (Hengartner, 2000; Shi, 2004).

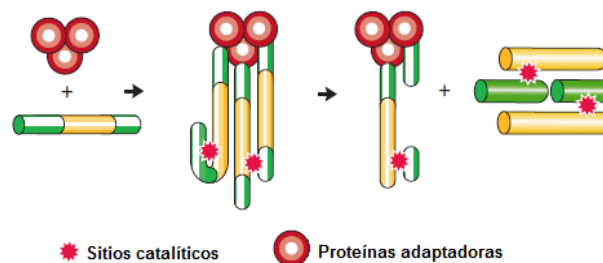


Figura 4. Activación de caspasas inducida por proximidad. (Tomado y modificado de Hengartner, 2000)

La asociación con una subunidad reguladora, es el mecanismo de activación de caspasas más complejo. A diferencia de otras caspasas, el procesamiento proteolítico de la caspasa 9 tiene un efecto mínimo en su activación. Para la activación de la caspasa 9 es necesaria su unión a una subunidad reguladora, el apoptosoma, el cual resulta de una oligomerización del cofactor Apaf-1 y el citocromo c (en presencia de ATP). Al apoptosoma recluta las moléculas de procaspasa 9 y las activa mediante un cambio conformacional (Figura 5). (Hengartner, 2000)

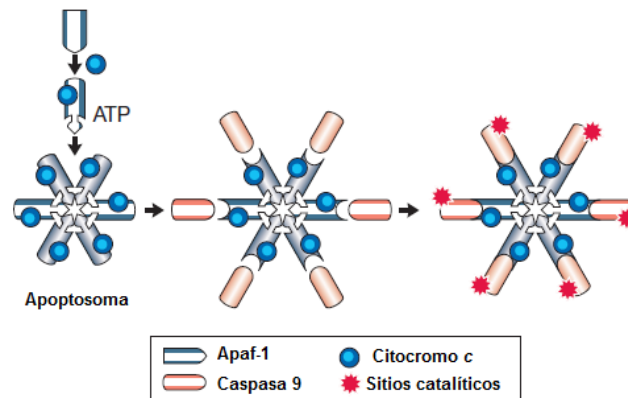


Figura 5. Activación de caspasas por asociación a una subunidad reguladora. (Tomado y modificado de Hengartner, 2000)

Las caspasas efectoras son las que realizan los pasos intermedios de ejecución de la apoptosis mediante la escisión de varios sustratos celulares (Li y Yuan, 2008), lo que promueve la morfología típica de la apoptosis (Stennicke y col., 2002; Strasser y col., 2000). Por lo tanto, la activación de la apoptosis en una célula

puede detectarse mediante ensayos que permitan la cuantificación de la actividad enzimática de caspasas efectoras como la caspasa 3 y la caspasa 7, mediante la escisión de diversos sustratos como, secuencias de tetrapéptido Z-DEVD, la enzima Poli ADP-Ribosa polimerasa (PARP), entre otros (Strasser y col., 2000; Stennicke y col., 2002; Elmore, 2007).

#### **1.4.1.1. Rutas de activación de caspasas**

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el DNA. Estas dos vías, también denominadas extrínseca e intrínseca, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente (Figura 6) (Elmore, 2007). La vía extrínseca involucra las caspasas iniciadoras 2, 8, y 10, mientras que la vía intrínseca involucra a la caspasa 9, ambas rutas convergen en la activación de las caspasas efectoras 3, 6, y 7.

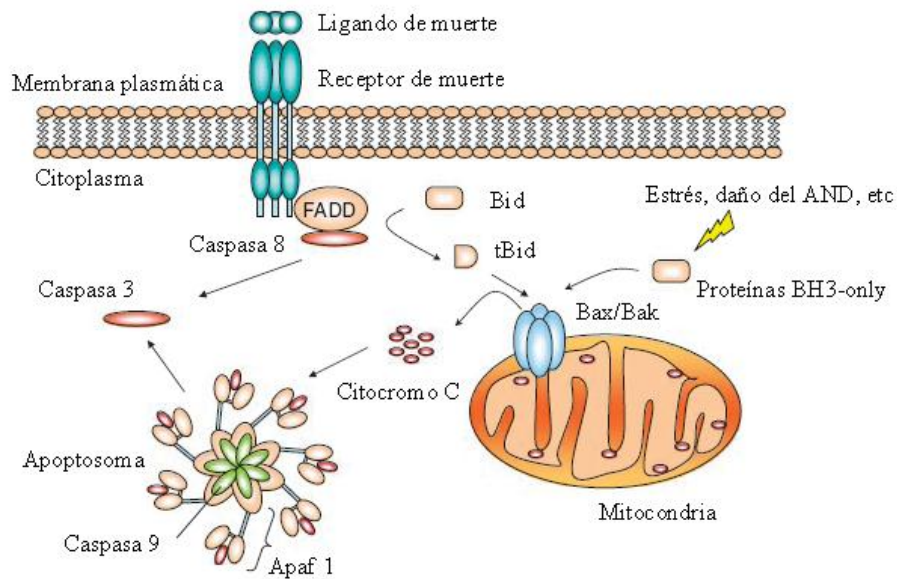


Figura 6. Vías de activación de las caspasas. Representación esquemática de las vías de señalización que conducen a la apoptosis como consecuencia de la activación de las caspasas, los estímulos que conducen a la apoptosis de la célula pueden ser intracelulares (vía intrínseca) o extracelulares (vía extrínseca). La vía extrínseca mediada por receptores de muerte celular y la vía intrínseca mediada internamente por daño del ADN o algún tipo de estrés (Tomado y modificado de Li y Yuan, 2008).

La vía extrínseca se inicia por la unión de un ligando específico con su receptor transmembrana. Los receptores de muerte funcionan como sensores en la superficie celular que detectan señales extracelulares de peligro mediante su unión a un ligando. Los receptores de muerte son una familia de proteínas transmembrana tipo I, caracterizadas por la presencia de un dominio extracelular con múltiples repeticiones ricas en cisteína y el dominio intracelular conocido como el dominio de muerte (por sus siglas en inglés, DD), el cual modula interacciones proteína-proteína, es decir que es el responsable de la activación del proceso apoptótico. (Li y Yuan, 2008)

Los miembros de la familia de receptores de muerte incluyen el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (por sus siglas en inglés, TNFR1, también conocido como DR1, CD120a, p55 y p60), Fas (también conocido como DR2, APO-1 y CD95), DR3 (también conocido como APO-3, LARD, TRAMP y WSL1), otros receptores relacionados con el receptor TNFR1: TRAILR1 (también conocida como DR4 y APO-2), TRAILR2 (también conocido como DR-5, KILLER y TRICK2), DR6, receptor ectodisplasina (por sus siglas en inglés, EDAR) y el receptor de factor de crecimiento neuronal (Lavrik y col., 2005). Al interactuar con sus respectivos ligandos, los receptores de muerte se someten a una trimerización para formar los complejos intracelulares que inducen la señalización de muerte (por sus siglas en inglés, DISCs) que pueden incluir múltiples moléculas adaptadoras (Figura 7) (Li y Yuan, 2008).

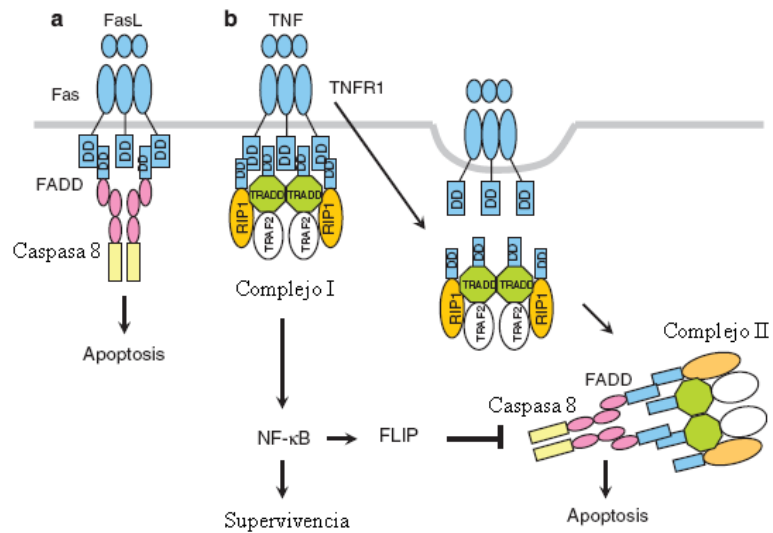


Figura 7. Complejos que inducen la señalización de muerte (DISC). (a) El DISC de receptores Fas y TRAIL. Los DD de Fas reclutan a las proteínas adaptadora FADD. FADD a su vez, a

través de su DED, recluta y activa a la caspasa 8. (b) El DISC del receptor TNF. Después de la unión del TNF al TNFR1, ocurre el reclutamiento rápido de TRADD, RIP1 y TRAF2 (complejo I). Posteriormente, TNFR1, TRADD y RIP1 se modifican y disocian del TNFR1. El DD liberado de TRADD (y/o RIP1) se une a FADD, dando como resultado el reclutamiento de la caspasa 8 (complejo II) y activación de la apoptosis. El complejo I activa el factor nuclear-kB (NF-kB) y promueve la expresión de FLIP, que inhibe la caspasa 8 y antagoniza la apoptosis (Tomado y modificado de Li y Yuan, 2008).

Para los receptores de Fas y TRAIL, las proteínas FADD son reclutadas para formar el DISC a través del C-terminal de su DD, que a su vez interactúa a través de su N-terminal DED con el DED de la caspasa 8. El reclutamiento y la oligomerización de la caspasa 8 en el DISC resulta en su activación autocatalítica y es crítico para la iniciación de la muerte celular (Juo y col., 1998; Varfolomeev y col., 1998).

La activación de los receptores de muerte no conduce necesariamente a la muerte celular. La interacción de TNF con TNFR1 conduce a la formación de dos complejos de señalización (Micheau y Tschopp, 2003). Cuando se forma rápidamente en la membrana el complejo I que está compuesto por TNFR1, TRADD, RIP, TRAF2 y c-IAP1 se activa el factor nuclear kB (por sus siglas en inglés, NF-kB) que regula la respuesta de la inflamación y promueve la supervivencia celular. Posteriormente, TRADD, RIP y TRAF2 se disocian del TNFR1 y forman un segundo complejo (complejo II) con FADD que activa a las caspasas 8 y 10 en el citoplasma. La formación del complejo II inicia una señalización proapoptótica (Figura 7b).



Finalmente la supervivencia o muerte celular dependerá del desplazamiento del equilibrio entre los complejos I y II (Li y Yuan, 2008).

La caspas 8, una vez activa tiene la capacidad de activar la procaspasa 3, principal caspasa ejecutora, responsable de la continuidad del proceso apoptótico mediante la escisión de varios sustratos celulares, los cuales son responsables de la morfología típica de la apoptosis (Li y Yuan, 2008).

En algunos tipos celulares la activación de la caspasa 8 puede ser deficiente por lo que tiene lugar una ruta indirecta, a través de la proteólisis de la proteína Bid (pertenece al grupo de proteínas “solo BH3”) por parte de la caspas 8. La forma truncada de Bid (tBid) conecta la ruta extrínseca con la ruta intrínseca o mitocondrial, ya que promueve la liberación del citocromo c de la mitocondria, lo que conlleva a la activación de la cascada de caspasas y con ello el proceso apoptótico (Danial y Korsmeyer, 2004).

La vía intrínseca de la apoptosis se desencadena en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de las células, señales intracelulares tales como, daños en el ADN, drogas citotóxicas, la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas, citocinas, radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, radicales libres, entre otros. Todos estos estímulos inducen la activación de la apoptosis actuando sobre la mitocondria, provocando la pérdida del potencial mitocondrial que a su vez favorece la salida de diversas proteínas

proapoptóticas del espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citosol y la activación de la cascada de caspasas (Saelens y col., 2004; Elmore, 2007).

La familia de proteínas Bcl-2 son reguladores críticos de la apoptosis. Dentro de sus funciones se incluye los pasos de muerte celular-dependientes de la mitocondria (Danial y Korsmeyer, 2004). Las proteínas de la familia Bcl-2 derivan su nombre del linfoma de células B2. Se piensa que regulan directamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial, permitiendo o inhibiendo el eflujo de proteínas apoptogénicas de la mitocondria (Hengartner, 2000).

Los miembros de esta familia usualmente son divididos en tres grupos diferentes (Figura 8), basados en la presencia o ausencia de las secuencias o dominios de homología Bcl-2 (Taylor y col., 2008).

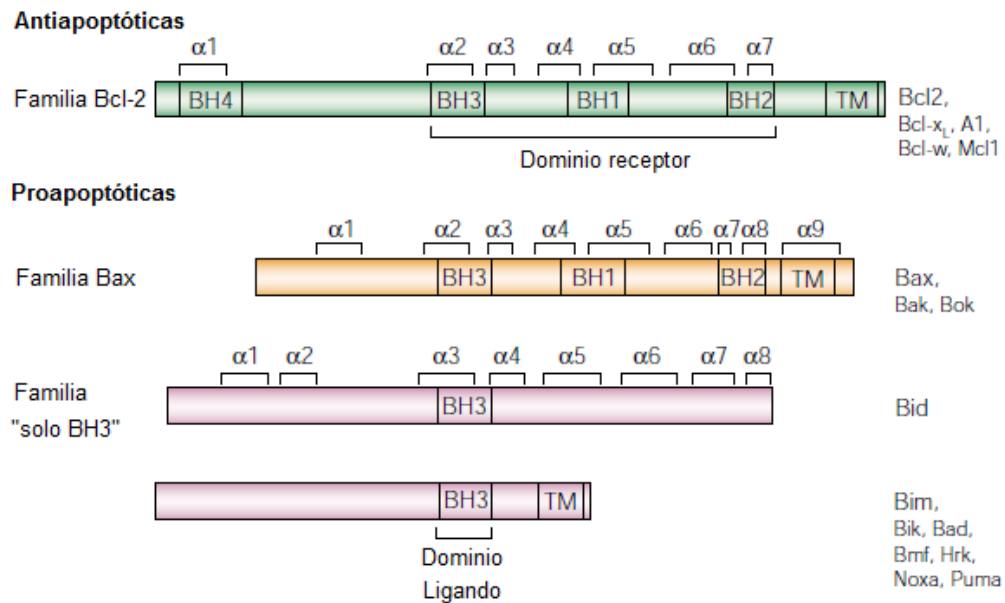


Figura 8. La familia de proteínas Bcl-2 se divide en tres grupos basados en la homología de acuerdo a la organización de dominios BH. (Tomado y modificado de Cory y Adams, 2002).

Las proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1 y Bcl-W comparten tres o cuatro dominios conservados (BH1-4), y por lo tanto se denominan miembros antiapoptóticos con multidominio. Las proteínas proapoptóticas como Bax, Bak, y Bok comparten tres dominios conservados (BH1-3) y se conocen como proteínas proapoptóticas con multidominio. Un subgrupo de proteínas proapoptóticas, sólo muestra la conservación en el tercer dominio BH, como lo son Bid, Bad, Bim, NOXA, PUMA, entre otros. Estos miembros "solo BH3" juegan un papel importante en la transducción de señales desde el citosol a las mitocondrias. Dependiendo de la naturaleza del estímulo apoptótico y el contexto celular, la señal de muerte de una proteína "solo BH3" será neutralizada por las proteínas antiapoptóticas o bien la señal será transmitida directa o indirectamente a las proteínas proapoptóticas como Bax y Bak. (Walensky, 2006)

La activación de proteínas que presentan solo un dominio BH3 por encima de cierto umbral crucial supera el efecto inhibitorio de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y promueve el ensamblaje de oligómeros de proteínas proapoptóticas (Bak-Bax) en la membrana mitocondrial externa, favoreciendo así la permeabilización de la misma, lo que conduce a la liberación de citocromo c y otras proteínas de este organelo, que contribuyen a la activación de caspasas y otros mecanismos de muerte celular. Por el contrario, las proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-XL, bloquean la oligomerización de Bax y Bak, preservando la viabilidad celular. Las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 no se insertan solamente en la membrana mitocondrial, también lo hacen en la membrana del retículo endoplasmático (RE). (Gulbins y col., 2003; Reed y col., 2004).

Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bak y otros miembros diversos de la familia de proteínas Bcl-2 tienen un tramo de aminoácidos hidrófobico cerca de su C-terminal que las ancla en membranas internas celulares, predominantemente en la membrana externa de la mitocondria y en el retículo endoplasmático. Por el contrario, otros miembros de la familia de proteínas Bcl-2 tales como Bid, Bim y Bad carecen de estos dominios de anclaje a la membrana, pero son trasladadas a la mitocondria en respuesta a estímulos específicos (Hengartner, 2000; Reed y col., 2004; Danial y Korsmeyer, 2004).

El dominio BH3 media la dimerización entre las proteínas de la familia Bcl-2 y se inserta sobre una grieta hidrófobica de la superficie de proteínas antiapoptóticas tales como Bcl-2 y Bcl-XL. La actividad inductora de muerte celular de la mayoría de las proteínas con dominio BH3 depende de su habilidad para dimerizar con miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2 y así funcionan como inhibidores transdominantes de proteínas inhibidoras tales como Bcl-2 y Bcl-XL. Alternativamente, ciertas proteínas “solo BH3”, en particular Bid y Bim, pueden unirse a proteínas proapoptóticas, tales como Bax y Bak, y funcionar como agonistas de muerte o dimerizar con proteínas antiapoptóticas, tales como Bcl-2 o Bcl-XL, y funcionar como antagonistas de la apoptosis. La unión de Bid a Bax o Bak promueve su inserción en la membrana y su oligomerización, resultando en un cambio en la permeabilidad de la membrana mitocondrial y liberación de proteínas apoptogénicas en el citosol. (Hengartner, 2000)

Las proteínas Bad con un dominio BH3, se traslada entre el citosol y la mitocondria, dependiendo de si esta fosforilada. Diferentes proteínas quinasas, incluyendo Akt (también llamada proteínas quinasa B, PKB), PKA (proteína quinasa dependiente de AMP cíclico), Raf1, Rsk1 y Pak1 (quinasa I activada por p21), se han reportado como proteínas que fosforilan a la proteína Bad, inactivando así a la proteína, de modo que no puedan dimerizarse y antagonizar con Bcl-2 y Bcl-X. (Hengartner, 2000)

La mitocondria juega un papel importante en la inducción de la apoptosis; además de proporcionar la energía de las células, contiene un arsenal de proteínas con funciones muy relevantes, desde la fosforilación de la ADP hasta la regulación del metabolismo celular. La mitocondria secuestra en el espacio intermembrana un coctel potencial de proteínas proapoptóticas, entre las que destaca el citocromo c (conductor de electrones), el Segundo Activador de Caspasas (por sus siglas en inglés, Smac) también conocido como DIABLO, la proteína A2 requerida para las altas temperaturas (por sus siglas en inglés, HtrA2/Omi), Factor Inductor de Apoptosis (por sus siglas en inglés, AIF), endonucleasa G y la ADNasa Activada por Caspasas (por sus siglas en inglés, CAD) (Du y col., 2000; Gulbins y col., 2003; Garrido y col., 2005; Elmore, 2007).

Tras un estímulo apoptótico de origen intracelular se generan alteraciones en la permeabilidad de la membrana mitocondrial que favorecen la liberación de proteínas apoptogénicas desde el espacio intermembrana al citosol; esto a su vez provoca la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (cambio que puede ser

evaluado mediante ensayos mitocondriales por citometría de flujo a través del uso de fluorocromos lipofílicos catiónicos permeables como Rodamina 123, MitoTracker, entre otros) (Saelens y col., 2004; Elmore, 2007).

Aun no se conoce exactamente cómo las proteínas proapoptóticas cruzan la membrana mitocondrial, pero es claro que miembros de la familia de proteínas Bcl-2 están involucrados en la regulación del proceso, como se mencionó anteriormente. Algunas de las hipótesis que han surgido para tratar de explicar este fenómeno son las siguientes:

- Formación de canales por parte de proteínas proapoptóticas como Bid o Bax. Se ha sugerido que dichas proteínas se translocan y oligomerizan en la membrana mitocondrial externa, por inserción, seguido de un cambio conformacional dentro de la membrana mitocondrial externa, formándose así el canal por el cual se da la liberación de factores apoptogénicos (Hengartner, 2000; Suen y col., 2008).
- Interacción de proteínas proapoptóticas con otras proteínas para formar canales. El poro mitocondrial de permeabilidad transitoria, también llamado canal aniónico dependiente de voltaje (por sus siglas en inglés, VDAC), el cual participa en la regulación de la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$ , pH, el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y el volumen mitocondrial. VDAC está constituido por una porina (proteína formadora de poros), la proteína translocasa de adenilato (por sus siglas en inglés, ANT) (translocadora de ATP/ADP), la hexoquinasa (transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato,

enzima iniciadora de la glucólisis), creatinina quinasa, proteínas miembros de la familia Bcl-2 (Bcl-2 y Bcl-xL) y la ciclofilina D. Cuando la proteína Bax se activa esta se transloca hacia la mitocondria y se asocia al VDAC y puede inducir la apertura del poro, lo cual trae como consecuencia un descenso en  $\Delta\Psi_m$  y la salida de factores apoptogénicos (Crompton, 1999; Pastorino y col., 1998; Reed y col., 2004; Suen y col., 2008).

En ausencia de estímulos apoptóticos, el factor de activación de proteasas apoptóticas 1 (por sus siglas en inglés, Apaf-1), se mantiene inactivo y unido a la proteína Bcl-2 en la superficie de la membrana externa de la mitocondria. Tras un estímulo apoptótico, el citocromo c es liberado de la mitocondria y la proteína Bcl-2 libera a Apaf-1 (Li y Yuan, 2008). Apaf-1 contiene en su extremo N-terminal (CARD), un dominio amplio de nucleótidos de unión, el cual es responsable de la interacción con el prodominio (CARD) de la procaspasa 9, que es esencial para el reclutamiento y la activación de la caspasa 9 (Elmore, 2007).

El citocromo c una vez en el citosol, se une a Apaf-1 y empleando dATP/ATP como co-factor forma una plataforma de señalización en forma de rueda (compuesta por siete moléculas de Apaf-1, cada una ligada a una molécula de citocromo c), el apoptosoma. El apoptosoma recluta a través de sus dominios CARD la procaspasa 9, la cual se activa a través del cambio conformacional inducido por el apoptosoma, es decir, mediante proteólisis autocatalítica. La caspasa 9 activa tiene la capacidad de activar las caspasas efectoras, la caspasa 3 y la caspasa 7, para llevar a

cabo la ejecución de la apoptosis (Slee y col., 1999; Chinnaiyan, 1999; Li y Yuan, 2008).

Mientras todas las proteínas antes descritas forman o promueven el ensamblaje del apoptosoma, la mitocondria, una vez que el proceso de apoptosis activado es irreversible, también libera algunas proteínas que actúan directamente en el núcleo para inducir la degradación del ADN y el corte del ADN nucleosomal. Estas proteínas incluyen el factor inductor de apoptosis (por sus siglas en inglés, AIF) y la endonucleasa G. La liberación de AIF del espacio intermembrana de la mitocondria es iniciado por la degradación de la región N-terminal de AIF, que contiene la secuencia de localización en la mitocondria. El traslado de AIF al núcleo parece ser mediada por la región C-terminal de la proteína, que contiene dos elementos de localización nuclear putativos. AIF induce la fragmentación del ADN de alto peso molecular y la condensación de la cromatina nuclear periférica. Es importante mencionar que los efectos de AIF son independientes de caspasas, Bcl-2 o APAF-1. (Susin y col., 1999; Gulbins y col., 2003; Cregan y col., 2004).

#### **1.4.1.2. Proteínas reguladoras de la apoptosis**

Las vías que conducen a la activación de la apoptosis, la vía intrínseca y extrínseca, están reguladas por proteínas de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (por sus siglas en inglés IAPs), dado que son capaces de regular la apoptosis inducida por receptores de muerte (TNFR y Fas) y drogas antineoplásicas (Fulda y Debatin, 2006).



Las proteínas IAPs fueron descubiertas inicialmente en baculovirus, en donde son indispensables para impedir la apoptosis inducida por el virus y por ende, permite la infección. Actualmente, se han identificado algunos homólogos celulares de proteínas IAPs en eucariotas. Las proteínas IAPs se caracterizan por presentar un dominio BIR (se encuentra presente en al menos una copia) y un dominio RING (Figura 9). El dominio BIR, es un dominio de unión a residuos de zinc, le confiere la propiedad antiapoptótica a las proteínas IAPs, ya que es el responsable de la unión e inhibición de las caspasas. Algunas proteínas IAPs presentan un segundo dominio, el dominio RING, que se encuentra invariablemente en el extremo carboxilo de la proteína. Este tiene actividad ligasa ubiquitina, de tal forma que une ubiquitina a diversas proteínas y las dirige a su degradación vía proteosoma. En el genoma humano se han identificado ocho genes que codifican para proteínas IAP entre ellas, XIAP (IAP ligada al cromosoma X), c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP (IAP de melanoma/livin), ILP2 (proteína 2 tipo IAP), NAIP (proteína inhibidora de apoptosis neuronal), APOLLON y Survivina. Algunas de las proteínas más estudiadas de la familia de proteínas IAPs se encuentra: c-IAP1, c-IAP2, XIAP y la Survivina. (LaCasse y col., 1998; Bandala y col., 2001)

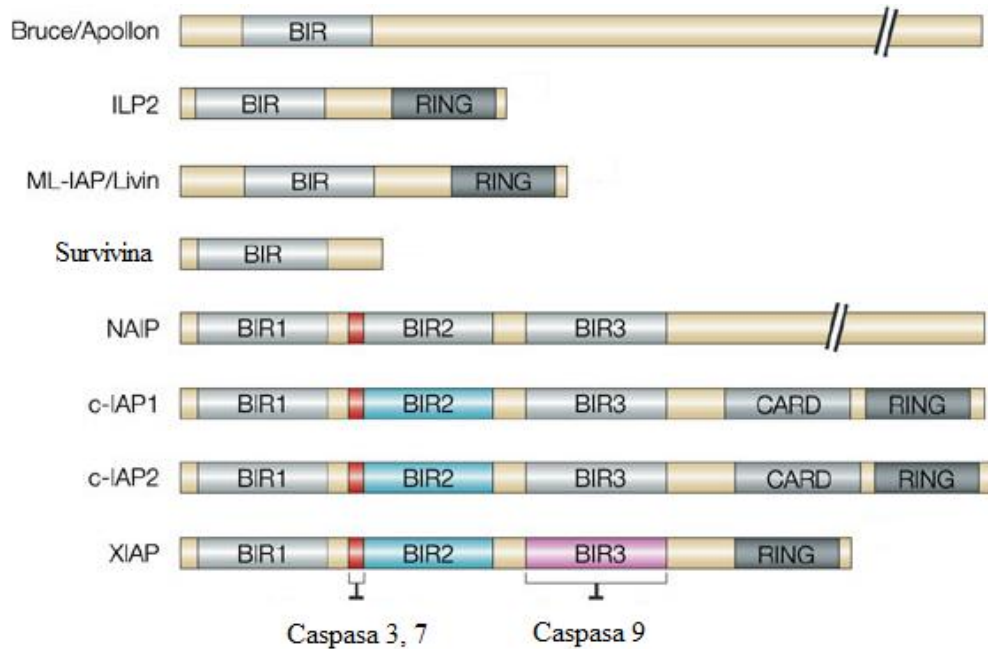


Figura 9. Estructura de las proteínas IAPs. (Tomado y modificado de Riedl y Shi, 2004)

La función de las caspasas 3, 7 y 9 es inhibida por proteínas IAPs. Aunque la caspasa 9 se une a diferentes proteínas IAPs, en principio su función es inhibida por la proteína XIAP. Las caspasas 3 y 7 son inhibidas por la proteína XIAP y en menor proporción por las proteínas, c-IAP1, c-IAP2 (Gulbins y col., 2003, Riedl y Shi, 2004). La Survivina inhibe la actividad de la caspasa 9 (Tamm y col., 1998).

El mecanismo molecular de inhibición de caspasas mediada por algunas proteínas IAPs es a través del uso de dominios BIRs específicos, por ejemplo la proteína XIAP (Figura 10) emplea un péptido enlazador corto que precede al dominio BIR2, y que forma interacciones idénticas con la caspasa 3 o 7. El péptido enlazador ocupa el sitio activo de la caspasa 3 y 7 bloqueando la entrada al sustrato. Mientras que en el caso de la caspasa 9 la proteína XIAP emplea el dominio BIR3. (Deveraux, 1997; Boatright, y Salvesen, 2003; Riedl y Shi, 2004).

Las proteínas c-IAP1, c-IAP2 son las únicas IAPs que se han identificado bioquímicamente como parte de un complejo de señalización que es reclutado por el dominio citoplasmático del receptor TNF. Estas proteínas presentan un dominio CARD a través del cual son reclutadas por receptores TNF. (Rothe y col., 1995)

La función de las proteínas IAPs puede además ser antagonizada por una familia de proteínas que contienen un motivo tetrapéptido de unión a IAP, entre ellas se encuentra el SMAC/DIABLO y HTRA2/OMI. Estas proteínas contienen un tetrapéptido N-terminal, el cual se une a la hendidura de superficie sobre el dominio BIR3 de XIAP. Durante la apoptosis, SMAC/DIABLO es liberado del espacio intermembrana de la mitocondria al citosol, donde interactúa con diferentes IAPs y remueve la inhibición, mediada por IAP, de caspasas iniciadoras y efectoras. La proteína HTRA2/OMI, también contiene motivos tetrapéptido repetidos en su N-terminal y puede antagonizar la inhibición de la caspasa 9 mediada por XIAP (Riedl y Shi, 2004).

Las actividades de las proteínas IAPs no solamente están restringidas a la inhibición de las caspasas. Se han encontrado reportes de que estas proteínas intervienen en la regulación del ciclo celular, degradación de proteínas y en las cascadas de transducción de la señal independientes de caspasas.

En contraposición de otras proteínas IAPs, la Survivina se expresa durante el desarrollo embrionario y fetal siendo indetectable en tejidos adultos normales. Existen reportes que indican que esta proteína se expresa en los tipos de cáncer más

comunes entre ellos: cáncer de pulmón, estómago, colon, páncreas, cérvicouterino, mama y próstata. (Adida y col., 1998)

La Survivina, el miembro más pequeño de la familia de proteínas IAPs, consta de 142 aminoácidos (16,5 kDa). Estructuralmente, la Survivina contiene una única repetición del dominio BIR, esencial para desempeña su función de inhibición de caspasas y carece del dominio RING (Ambrosini y col., 1997; Li y col., 1998; Altieri, D.C. 2003).

La síntesis y la degradación de la Survivina en tejidos normales son moduladas en el ciclo celular de manera dependiente. La transcripción de la Survivina es controlada por secuencias específicas en la región promotora, aumenta durante la fase G1 y alcanza un pico en la fase G2-M (Kobayashi y col., 1999; Li, y Altieri, 1999).

La regulación de la expresión de la Survivina y su función es compleja y puede ocurrir en varios niveles, incluyendo la transcripción, empalme diferencial, degradación de proteínas, y secuestro intracelular a través de diferentes ligandos. La expresión de la Survivina es regulada aguas arriba a nivel transcripcional por el factor NF- $\kappa$ B, que a su vez, se puede activar indirectamente por factores de crecimiento a través de la vía PI3K/Akt (Van Antwerp y col., 1998). Además, se ha reportado que la vía de señalización mTOR regula la Survivina a través de cambios rápidos en la traducción del ARNm (Vaira y col., 2007). Otros factores que intervienen en la regulación aguas arriba de la Survivina son miembros de la familia del oncogén Ras, el transductor de señales y activador de la transcripción 3 (por sus siglas inglés,

STAT3), y el factor antiapoptótico Wnt-2 (Sommer y col., 2003; Aoki y col., 2003; You y col., 2004).

Después de la transcripción, corte y empalme alternativo de ARNm de Survivina en al menos cuatro regiones distintas produce isoformas con diferentes patrones y capacidades de expresión para inhibir la apoptosis, lo que produce un nivel adicional de complejidad en la regulación de la función de esta proteína (Noton y col., 2006). Por último, la degradación de la Survivina se produce a través de la vía de la ubiquitina-proteosoma en la fase G1 del ciclo celular y se estabiliza cuando se une a la proteína de choque térmico de 90 kDa (por sus siglas en inglés, HSP90) (Zhao y col., 2000; Fortugno y col., 2003; Altieri, 2004).

Las funciones que se han establecido para la Survivina implican la regulación de la división celular y la inhibición de la apoptosis.

El papel de la Survivina en la división celular se da en la regulación mitótica. Durante la mitosis, las funciones que desempeña la Survivina se localizan en dos grupos subcelulares principales en la metafase y anafase. Un grupo de Survivina se asocia directamente con la tubulina polimerizada. Este grupo incluye los centrosomas, microtúbulos de la metafase y el huso mitótico de la anafase, y restos del aparato mitótico, es decir se da una regulación en la dinámica de los microtúbulos (O'Connor y col., 2002; Giodini y col., 2002; Altieri, 2006). El segundo grupo de Survivina se localiza en los cinetocoros de los cromosomas en la metafase. En este grupo, la Survivina se asocia con los reguladores de la citocinesis, tales como la kinasa Aurora B, INCENP, y Borealina/Dasra, formando parte del complejo pasajero

de los cromosomas que es esencial para una adecuada segregación y citocinesis del cromosoma (Wheatley y col., 2001; Bolton y col., 2002; Sampath y col., 2004; Gassmann y col., 2004; Lens y col., 2006). La Survivina media la correcta orientación de las proteínas que forman parte del complejo pasajero de los cromosomas a los cinetocoros; además estabiliza los microtúbulos, lo que contribuye a la formación del huso bipolar (Altieri, 2006).

El papel de la Survivina en la inhibición de la apoptosis ha sido objeto de controversia, ya que esta carece de motivos estructurales que median la unión a caspasas (LaCasse y col., 1998). Existen reportes que indican que la Survivina inhibe la caspasa 9 activa pero no inhibe las caspasas 3 y 7 activas y que la inhibición de la caspasa 9 requiere un cofactor, la proteína de interacción con la proteína X del virus de la hepatitis B (HBXIP) (Marusawa y col., 2003). Además, el papel antiapoptótico de la Survivina puede estar mediado por su asociación con la IAP ligado al cromosoma X a través de su dominio BIR conservado, aumentando así la estabilidad de la proteína IAP ligada al cromosoma X y conduce a la inhibición sinérgica de la activación de la caspasa 9 (Dohi y col., 2004). Por lo tanto, la capacidad de Survivina para inhibir la apoptosis al parecer implica la cooperación con otras moléculas, tales como la HBXIP y el IAP ligada al cromosoma X.

La vía de señalización de PI3K/Akt desempeña un papel importante en la regulación de la expresión de Survivina tanto en las células endoteliales vasculares como en células tumorales. AKT promueve la supervivencia de la célula y con ello la proliferación celular (Figura 10) (Papapetropoulos y col., 2000).

La proteína serina/treonina quinasa AKT, también conocida como proteína quinasa B (PKB), fue inicialmente descrita por tres grupos diferentes, basándose en su homología a la Proteína quinasa A (PKA), a la Proteína quinasa C (PKC) y un homólogo celular del oncogen retroviral akt (v-akt). En mamíferos se han identificado tres genes AKT/PKB, los cuales codifican para las proteínas AKT1, AKT2 y AKT3. Se considera como la pieza central de las vías de transducción en respuesta a factores tróficos e insulina. Su actividad contribuye a diferentes funciones celulares y además se considera como un regulador esencial de la proliferación y la supervivencia celular (Downward, 2004).

AKT1 hasta los momentos ha sido la más estudiada. La regulación de su actividad viene dada por dos sitios de fosforilación dentro de su estructura, la treonina 308 (Thr308), que se localizan en el dominio quinasa N-terminal y la serina 473 (Ser473) en el C-terminal, que se encuentra en el dominio regulador. La fosforilación en la Thr308 activa parcialmente a AKT, mientras que la fosforilación de ambos sitios es requerida para una completa activación. La fosforilación exclusiva de la ser 473 tiene un efecto escaso en la actividad de AKT (Alessi y col., 1996).

La vía de señalización de AKT se activa por receptores de tirosina quinasas, integrinas, receptores de células B y T, receptores de citoquinas, factores de crecimiento, receptores acoplados a la proteína G. Cuando el ligando específico se une a su receptor, la proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositol-3-quinasa (por sus siglas en inglés, PI3K) es reclutada hacia la membrana plasmática, una vez activa fosforila el glicerofosfolípido de membrana el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

(por sus siglas en inglés, PIP<sub>2</sub>) convirtiéndolo en el segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (por sus siglas en inglés, PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> actúa como segundo mensajero y sus niveles están regulados de forma precisa por la acción de fosfatasa como PTEN. AKT no es activada directamente por PIP<sub>3</sub> pero es reclutada hacia la membrana plasmática, a través de su dominio PH que se encuentra en la región N-terminal, donde se activa por parte de PI3K. La activación final de la vía AKT dota a las células de una señal de supervivencia que les permite hacer frente a diferentes estímulos apoptóticos (Yao y Cooper, 1995; Franke y col., 1997).

AKT regula de manera directa diferentes miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bad y Bim, los cuales al ser fosforilados se unen a las proteínas chaperonas 14-3-3 que se encuentran en el citoplasma inhibiendo así su función proapoptótica. Otros efectos directos sobre la vía de activación de la apoptosis es la inactivación por fosforilación de la caspasa 9. Además puede regular factores de transcripción como: FOXO, de manera directa, ya que AKT fosforila a FOXO inhibiendo su función de inducción de apoptosis; también inactiva a p53 mediante la fosforilación de MDM2 (Mayo y Donner, 2002; Zhou y Hung, 2002; Pommier y col., 2004). En caso contrario la fosforilación del factor de transcripción Nf-κB promueve la supervivencia celular, ya que inicialmente AKT fosforila y activa las proteínas quinasa inhibitoras de Nf-κB (IKKαβ), las cuales de cierto marcan a las proteínas IκB para que estas sean degradadas mediante el sistema ubiquitina-proteosoma, dejando libre a Nf-κB. Posteriormente Nf-κB es fosforilada por AKT lo que favorece



tanto su translocación al núcleo, como su actividad de transcripción de genes antiapoptóticos, entre ellos la Survivina (Gilmore, 1999).

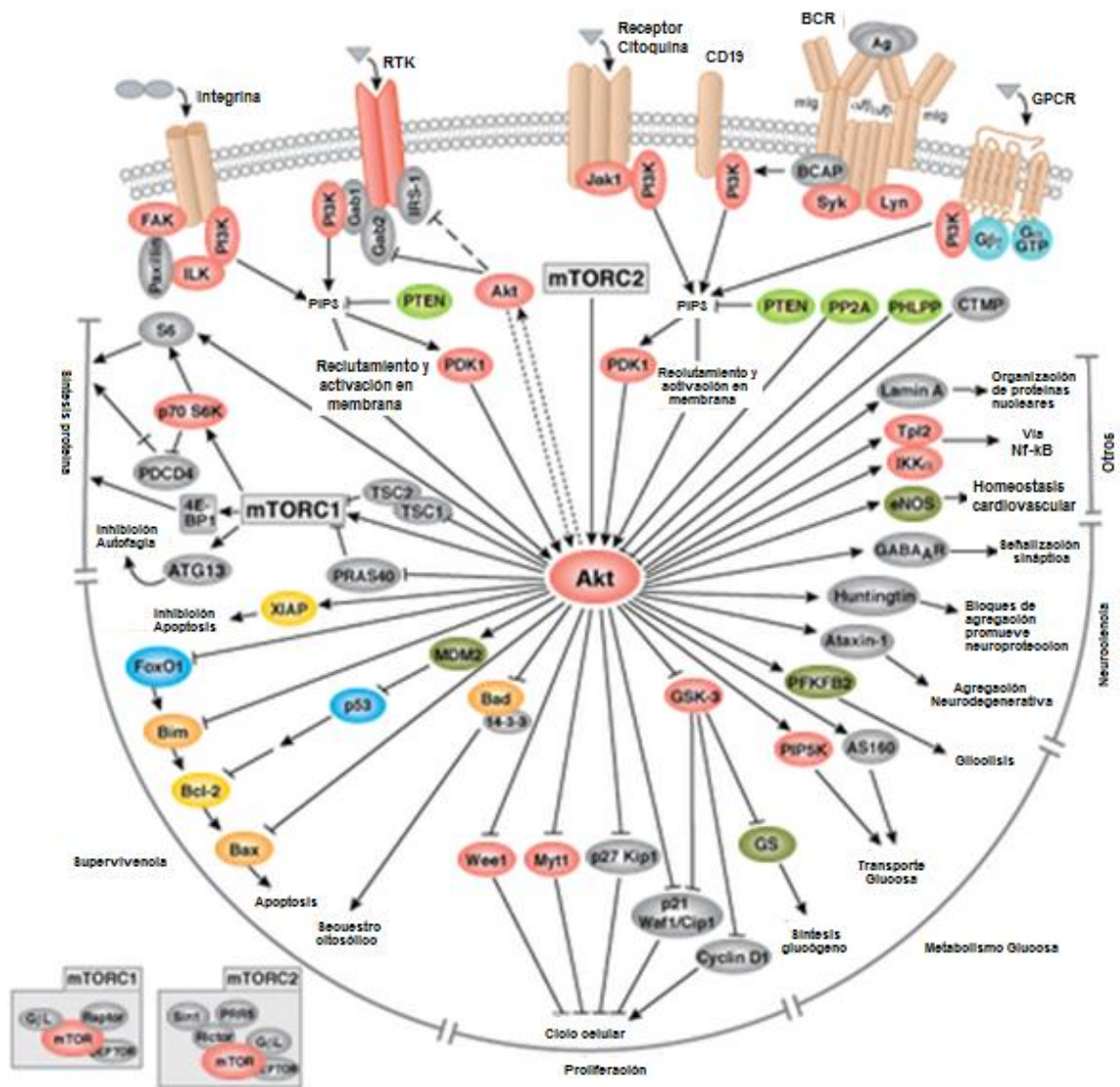


Figura 10: Vía de señalización PI3K/AKT1. (Tomado y modificado de [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Akt\\_PKB.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Akt_PKB.html) [Consulta: 8 octubre de 2013])

Los compuestos de origen natural y sus derivados (sintéticos) han mostrados ser potenciales candidatos para el tratamiento del cáncer, mediante la inducción de apoptosis en células tumorales como mecanismo para suprimir la carcinogénesis. Dado a la necesidad urgente de hallar nuevos agentes anticancerígenos para el tratamiento del cáncer de próstata, se evaluó la capacidad apoptogénica de una serie estructural de compuestos semi-sintéticos en la línea celular de cáncer de próstata PC3 mediante una serie de ensayos que permitieron una eficaz detección y eventual cuantificación de los procesos de apoptosis.

De acuerdo a los reportes de la Survivina, miembro de la familia (IAP), en cuanto a su asociación con la progresión del cáncer y la resistencia a fármacos, se evaluó la relación molecular entre los compuestos apoptogénicos, la Survivina y la vía de señalización PI3K/AKT y su papel en la inducción de la apoptosis en la línea celular PC3, lo cual es de suma importancia ya que los compuestos parecen no actuar sobre vía clásica de inducción de apoptosis, sino sobre una molécula específica que está involucrada junto a otros componentes en la activación de una vía de señalización fundamental en la tumorigénesis como lo es la vía de señalización PI3K/AKT, por lo tanto dicha molécula se podrían tomar en cuenta como posible blanco molecular.

## 2. ANTECEDENTES

---

En los últimos años, una de las enfermedades más estudiadas ha sido el cáncer desde diferentes puntos de vista que van desde el mecanismo que lo genera hasta su posible cura efectiva.

Hasta ahora la modalidad aceptada para el tratamiento del cáncer implica cirugía, radiación y fármacos, solos o en combinación, pero es importante destacar que un fármaco anticancerígeno exitoso debe provocar la muerte o incapacitar a las células cancerígenas sin causar un daño excesivo a las células normales. Esta situación ideal se puede lograr mediante la inducción de la apoptosis en las células tumorales. La viabilidad de células tanto normales como tumorales se ve afectada significativamente por la regulación de apoptosis. Así, el control de la apoptosis puede ser útil en el tratamiento y la terapia o prevención del cáncer. La síntesis o modificación de fármacos conocidos continúa siendo un aspecto importante de investigación. (Taraphdar y col. 2001)

Existe una necesidad continua de hallar nuevos prototipos o modelos de fármacos, con el fin de utilizarlos en el diseño de agentes quimioterapéuticos. Cabe destacar que los productos naturales están proporcionando dichos modelos. Así un buen número de fármacos contra el cáncer han sido desarrollados a partir de plantas o sus derivados. (Taraphdar y col. 2001)

Se ha reportado que ciertos productos de las plantas inducen la apoptosis en células tumorales pero no en células normales. Se ha vuelto cada vez más evidente que la apoptosis es un modo de acción importante para muchos agentes antitumorales, incluyendo radiación ionizante, agentes alquilantes tales como el cisplatino y 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), citoquinas de factor de necrosis tumoral (TNF), taxol, benzamidas N-sustituidos, etc. La inducción de la apoptosis es un mecanismo que se ha usado como objetivo para el descubrimiento de fármacos. (Jiang y col., en 1996)

Numerosos estudios acerca de plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana indican que algunas de estas pueden considerarse útiles en las enfermedades que le han sido atribuidas por la cultura popular (Arvelo y col., 2008).

Las plantas del genero *Croton* han llamado mucho la atención en cuanto a la búsqueda de nuevos fármacos contra el cáncer. Un miembro de la familia Euphorbiaceae, *Croton palanostigma* es una de las plantas medicinales más utilizadas de los trópicos de América del Sur. Diversas especies del género *Croton* presentan una amplia gama de acciones farmacológicas y fisiológicas. (Sandoval y col., 2002)

El género *Croton* es el más grande de la familia de las plantas Euphorbiaceae con más de 1200 especies distribuidas en las regiones tropicales y neotropical del mundo. Dentro del género *Croton* se encuentra la subfamilia Crotonoidae, cuyas especies se caracterizan por la presencia de diterpenos. Un gran número de especies de este género han sido objeto de estudio para el aislamiento de compuestos con

actividad biológica, siendo los clerodanos son el tipo de diterpeno más comúnmente aislado, aunque también se han obtenido otros diterpenos relacionados biogenéticamente a los clerodanos, como los labdanos. El género *Croton* ha sido motivo de estudios fitoquímicos debido a que se ha podido identificar en las plantas de dicho grupo moléculas que con fines terapéuticos. (Fuentes y col., 2004)

Muchas especies del género *Croton* han demostrado que poseen actividades antitumorales. Este género es bien conocido químicamente por la presencia común de clerodanos, kauranos, flavonoides y alcaloides. (Sylvestre y col. en el 2006)

Es importante mencionar que los diterpenos constituyen una amplia clase de isoprenoides naturales. Este grupo de compuestos se divide de acuerdo con el número y patrones de ciclación que muestra su esqueleto: 1. Acíclicos (Fitanos), Bicíclicos (labdanos, clerodanos), 2. Tricíclicos (primaranos, abietanos, cassanos, rosanos, podocarpanos, vouacapanos), 3. Tetracíclicos (trachylobanos, kauranos, afidicolanos, stemodanos, stemaranos, beyeranos, atisanos, gibereanos), y compuestos mixtos. (García y col., 2007)

Una gran variedad de actividades biológicas se le han atribuido a muchos diterpenos de tipo kaurano, entre ellas: antimicrobiana, antiparasitaria, citotóxica, antiinflamatoria, antitumoral, entre otras (Ghisalberti, 1997). La propiedad más importante que presentan algunos kauranos, desde el punto de vista como tratamiento del cáncer, es la capacidad de inducir la apoptosis (Liu y col., 2006; Ruiz y col., 2008).

De acuerdo a la actividad biológica que presentan los diterpenos de tipo kaurano, han surgido diversos estudios en cuanto a las modificaciones estructurales del esqueleto kaurano con el fin de obtener nuevas sustancias potencialmente bioactivas, por lo que recientemente se ha reportado el uso de este grupo de compuestos para la síntesis de nuevos antimicrobianos, citotóxicos y tripanocidas. Este enfoque aún está lejos de ser aprovechado plenamente por el interés actual en la química de productos naturales, por lo que se encuentra en marcha los diferentes estudios para determinar la correlación entre la composición química y actividad farmacológica. (Suárez y col., 2003)

El aislamiento y la identificación de compuestos químicos naturales, junto a la realización de bioensayos *in vitro*, es aún una manera de descubrir nuevos compuestos para la investigación farmacéutica.

En el curso de la búsqueda de complejos bioactivos en especies de *Croton* en Venezuela se reportaron dos nuevos seco-*ent*-kauranos, caracasina y ácido caracasínico, ambos aislados de extractos no polares de las flores de la especie *Croton micans*. (Figura 11) (Suárez y col. en 2008; Mateu y col., 2012)

Tras la evaluación *in vitro* del efecto de los dos seco-*ent*-kauranos, caracasina y ácido caracasínico sobre la viabilidad celular, se encontró que dichos compuestos presentan citotoxicidad en nueve líneas celulares de cáncer humano de diferentes orígenes, entre ellas la línea celular PC3 y en cultivos primario de fibroblastos humano. (Suárez y col., 2009)

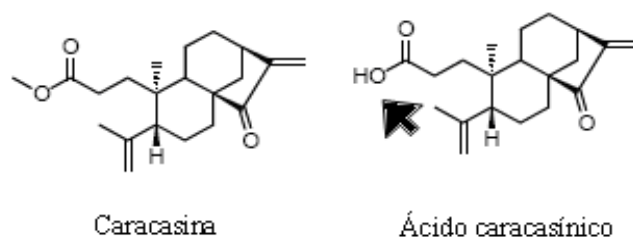


Figura 11. Estructura de dos seco-ent-kauranos, compuestos aislados de flores de *Croton micans* (Tomado y modificado de Suárez y col. 2009; Mateu y col., 2012).

En vista de la actividad biológica que presentan estos compuestos y que además no existe ningún reporte hasta la fecha de la serie estructural de compuestos semi-sintéticos derivados del ácido caracasínico en cuanto a su actividad citotóxica y su posible actividad proapoptótica, se propone estudiar la capacidad apoptogénica de los mismos en la línea celular PC3, así como también identificar los grupos funcionales, que presentaron mayor actividad citotóxica, de acuerdo a las modificaciones químicas que se emplearon para obtener la serie de compuestos semi-sintéticos a partir del ácido caracasínico.

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo general:

Realizar una evaluación de la capacidad apoptogénica de una serie estructural de compuestos semi-sintéticos en la línea celular tumoral PC3.

#### 3.2. Objetivos Específicos:

- I. Determinar el efecto citotóxico de los compuestos en la línea celular tumoral PC3 mediante ensayo con MTT.
- II. Evaluar la capacidad proapoptótica de los compuestos citotóxicos en la línea celular tumoral PC3 mediante:
  - Ensayo de Anexina V a través de citometría de flujo, el cual permite evidenciar la presencia de la fosfatidilserina en el exterior de la membrana celular evento temprano de la activación de la apoptosis, en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos citotóxicos.
  - Ensayo de TÚNEL a través de microscopía confocal, el cual permite evaluar la fragmentación nucleosomal del ADN un evento tardío de la activación de la apoptosis, en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos citotóxicos.



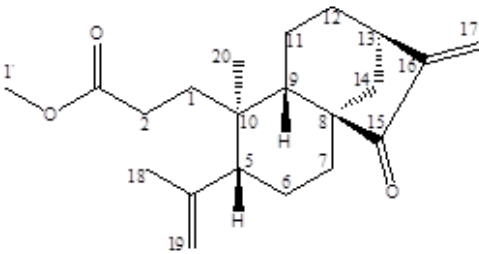
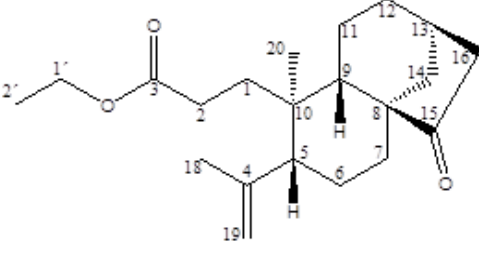
- Evaluación de cambios en el potencial mitocondrial a través de citometría de flujo en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos citotóxicos.
  - Evaluación de la actividad de caspasa 3 y caspasa 7 mediante el ensayo Caspasa-Glo 3/7 en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos citotóxicos.
  - Evaluación de cambios en los niveles de expresión de proteínas Bax y Bcl-2, efectores claves de la apoptosis en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos citotóxicos, mediante Western blot.
- III. Proponer una hipótesis del probable mecanismo de acción de los compuestos citotóxicos en la línea celular de origen tumoral PC3.

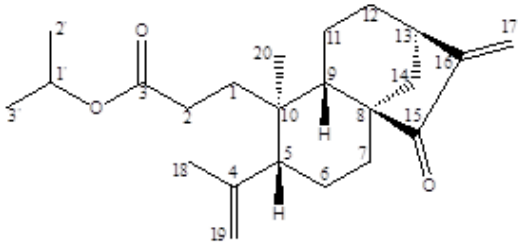
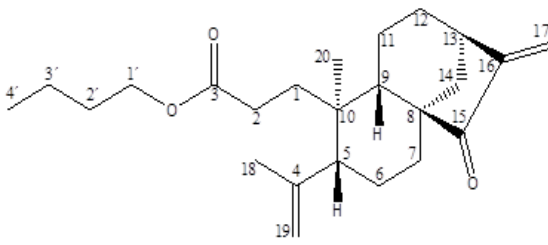
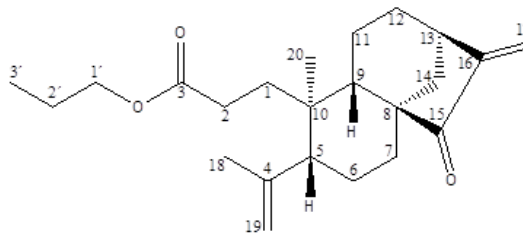
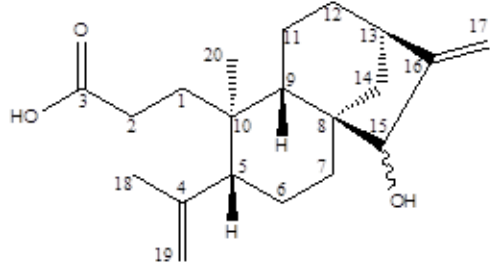
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 4.1 Serie estructural de compuestos semi-sintéticos derivados de la Caracasina.

Los compuestos semi-sintéticos fueron obtenidos a partir de modificaciones químicas del tipo adición, sustitución y eliminación de cadenas de hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) y grupos funcionales a la estructura de la Caracasina (KSC-21). Estos compuestos que se emplearon para el estudio fueron proporcionados por la Dra. Alfrica Suárez de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Se disolvieron en dimetilsulfóxido (por sus siglas en inglés DMSO) a una concentración final de 5 mg/mL (Sigma-Aldrich).

| <b>KSC-21</b>   | <b>KSC-25</b>  |
|---|--|
|  |  |
| 3-metil éster del ácido-[3,4-seco-(ent-15-oxo,4,16-dieno)]kaurenoico                | 3-etil éster del ácido-[3,4-seco-(ent-15-oxo,4,16-dieno)]kaurenoico                  |
| <b>KSC-27</b>   | <b>KSC-29</b>  |

|   |  |
|---|--|
|    |    |
| <p>3-isopropil- éster del ácido-[3,4-seco-(ent-15-oxo,4,16-dieno)]kaurenoico</p>    | <p>3-butil éster del ácido-[3,4-seco-(ent-15-oxo,4,16-dieno)]kaurenoico</p>          |
| <p><b>KSC-33</b></p>  | <p><b>KSC-37</b></p>   |
|  |  |
| <p>3-propil ester del ácido-[3,4-seco-(ent-15-oxo,4,16-dieno)]kaurenoico</p>        | <p>ácido-[3,4-seco-(ent-15-hidroxy-4,16-dieno)]kaurenoico</p>                        |
| <p><b>KSC-41</b></p>  | <p><b>KSC-43</b></p>   |

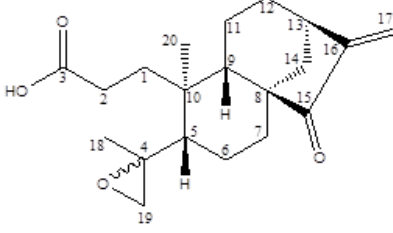
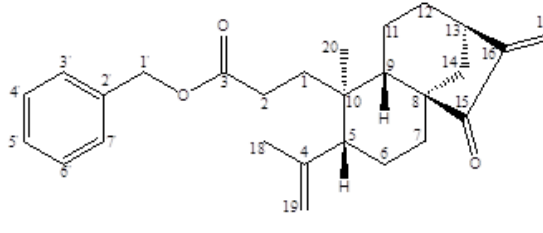
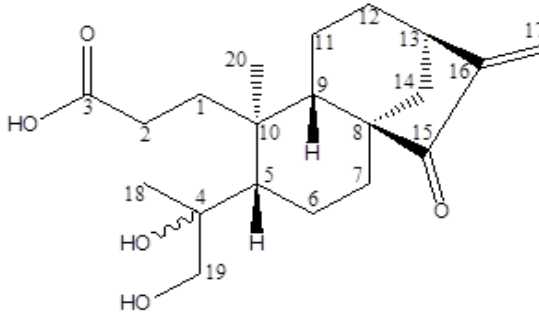
|   |  |
|---|--|
|    |  |
| <p>ácido-[3,4-seco-(ent-4-19-epoxy, 15-oxo, 16-dieno)]kaurenoico</p>                | <p>3-bencil ester del ácido-[3,4-seco-(ent-15-oxo,4,16-dieno)]kaurenoico</p>       |
| <p><b>KSC-45</b></p>  |  |
|  |  |
| <p>ácido-[3,4-seco-(ent-4-19-dihidroxy, 15-oxo, ,16-ene)]kaurenoico</p>             |  |

Tabla 1. Estructuras de la serie de compuestos tipo seco-*ent* kauranos derivados de la Caracasina (KSC-21).

## 4.2 Material Biológico

### 4.2.1 Línea celular PC3

Para el estudio se utilizó la línea celular tumoral de cáncer de próstata PC3 debido a que existen estudios que reportan la actividad citotóxica y apoptótica de la Caracasina esta línea celular. La línea celular PC3 fue proporcionada por el

Laboratorio de Genómica y Proteómica de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA. La línea celular PC3 se creó en 1979 a partir de las metástasis óseas de grado IV de cáncer de próstata en un paciente caucásico de 62 años de edad. Estas células tienen alto potencial metastásico, no responden a los andrógenos, glucocorticoides, factores de crecimiento epidérmicos (EGF) y fibroblásticos (FGF), no expresan antígeno prostático (PSA) y presentan baja actividad de la testosterona 5- $\alpha$ -reductasa (Kaighn y col. 1979; Belinchón y col., 2005). El fenotipo de esta línea celular andrógeno independiente viene dado por la sobre-expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis, la Survivina (McEleny y col., 2002), la sobre-expresión de la proteína Bcl-2, combinada con la pérdida del supresor p53, retinoblastoma (Rb), PTEN y NKX (Zhou y col., 2006), además de alteraciones en la señal de transducción de PI3K/AKT y NF- $\kappa$ B, las cuales presentan una alta activación constitutiva (Suh y col., 2002; Toser y Yoeli-Lerner, 2006).

#### **4.2.2 Cultivos primarios de Fibroblastos**

Además se utilizó células de cultivos primarios de fibroblastos de tejidos no tumorales, estos fueron proporcionados por el Laboratorio de Genómica y Proteómica de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Los cultivos primarios de fibroblastos, utilizados entre los pasajes 1 y 10, fueron obtenidos a partir de tejido conectivo proveniente de pacientes sometidas a cirugía reductiva de mama, luego de firmar su consentimiento previamente informado sobre la naturaleza del estudio a realizar. Estas muestras de tejido mamario fueron tomadas por el Dr. Alcides Robles,

Clínica Las Acacias. Los cultivos primarios de fibroblastos se emplearon como referencia de células normales en todos los ensayos.

#### **4.2.3 Mantenimiento del cultivo celular**

El cultivo primario de fibroblastos se sembró en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-one) en medio Eagle modificado por Dulbecco (por sus siglas en inglés, DMEM) (Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Internegocios). La línea celular PC3 se cultivó en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Adicionalmente, a los medios se les agregó una solución antibiótica de Penicilina G/Estreptomicina (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina). El medio de cultivo se reemplazó cada 3 días. Una vez que los cultivos celulares alcanzaron una confluencia entre 70 y 80 % aproximadamente, se descartó el medio de cultivo, se lavó con tampón fosfato salino (por sus siglas en inglés, PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM), luego se agregó una solución de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich), se centrifugaron durante 10 minutos a 741 g, por último las células fueron pasadas a nuevos frascos. Los cultivos celulares se mantuvieron en una incubadora a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Todas las manipulaciones de las células se realizaron en cabinas de flujo laminar vertical de clase II A 2 y en condiciones estériles.

Para conservar durante largo tiempo las líneas celulares, entre 1 y 3 millones de células fueron resuspendidas en 1 mL de medio de congelación frío (70 % de

medio DMEM o RPMI según el cultivo celular 20 % SFB y 10 % de DMSO), luego se pasaron a un criotubo, este se colocó durante 2 horas a una temperatura de -20 °C y finalmente se almacenó a -70 °C.

La descongelación de las células desde una temperatura de -70 °C se llevó a cabo exponiendo los criotubos a una temperatura de 4 °C hasta la descongelación de su contenido, posteriormente dicho contenido se agregó a 5mL de medio de cultivo DMEM o RMPI suplementado con 10% de suero fetal bobino para ser centrifugado a 741 g durante 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo y por último se trasvasó a un envase de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

### **4.3 Ensayos de citotoxicidad**

#### **4.3.1 Ensayo de citotoxicidad mediante el uso de MTT.**

El ensayo de MTT es una técnica colorimétrica rápida que emplea el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Es un método que se utiliza para la determinación de la citotoxicidad, la proliferación y la supervivencia celular. Este ensayo consiste en la reducción de sales de tetrazolium (MTT) en cristales de formazan insolubles. Esta sal es reducida por las células metabólicamente activas, en las mitocondrias, en parte por acción de las enzimas succinato-deshidrogenasas, para generar equivalentes reductores como NADH y NADPH. Los cristales de formazán intracelular resultantes de esta reducción pueden ser solubilizados con DMSO, dando una coloración purpura característica, que

posteriormente se puede cuantificar por método espectrofotométrico en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm (Carmichael y col., 1987). Este método tiene la ventaja de ser de bajo costo, rápido y no hay manejo de material radioactivo, además permite el análisis de un gran número de muestras.

La citotoxicidad fue medida en placas de 96 pozos mediante el ensayo colorimétrico con (MTT) (Sigma-Aldrich). Una vez contadas las células se agregaron a cada pozo 5000 células en un volumen de 100  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI suplementado y se dejaron incubar durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en la incubadora. Después de transcurrir el tiempo se realizaron siete (7) diluciones seriadas 1/2 a partir de 25  $\mu$ g/ml de cada compuesto, posteriormente se agregó a cada pozo cada una de las concentraciones a evaluar por triplicado. Luego, las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en incubadora. Se empleó como control de viabilidad pozos con medio de cultivo y células, en ausencia del compuesto natural por triplicado. Además se empleó un control con medio de cultivo, células y DMSO, con el cual se demostró que el efecto obtenido es propio del compuesto aplicado sobre las células y no del solvente utilizado, DMSO. Como control positivo se empleó la estaurosporina, un compuesto con actividad citotóxica conocida (Chae y col., 2000).

Finalizado el tiempo de incubación, se descartó el medio de cultivo con el compuesto presente en cada pozo y seguidamente se agregó a cada pozo 100  $\mu$ L del reactivo MTT (4 mg MTT+ 10 mL PBS). Luego durante 2 horas se incubaron en las condiciones antes descritas. Transcurrido el tiempo se descartó el reactivo MTT y



posteriormente se solubilizaron los cristales de formazán añadiendo 100  $\mu$ L de DMSO y finalmente se leyó la absorbancia en un lector de placas (Bio-rad), a una longitud de onda de 570 nm. El resultado de esta determinación nos indicó la citotoxicidad celular de los compuestos por inhibición de la proliferación celular.

El análisis de la citotoxicidad de un compuesto se basa en la valoración de la supervivencia después de la exposición a dicho compuesto. Las curvas dosis-respuesta se presentaron como viabilidad relativa tomando como 100 % de viabilidad el número de células del cultivo control en ausencia de compuesto. Los valores obtenidos al medir la absorbancia se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoideal, lo que permitió obtener un valor de  $CI_{50}$ , que corresponde a la dosis del compuesto que inhibe la proliferación celular en un 50%. Esto se pudo realizar con la ayuda del programa Origin versión 6.0, el cual permitió obtener los valores de las  $CI_{50}$ , mediante una regresión no lineal, así como también realizar las curvas dosis-respuesta.

#### **4.4 Ensayos para evaluar la capacidad proapoptótica de los compuestos.**

##### **4.4.1 Ensayo de Anexina V para la detección de células apoptóticas.**

La muerte celular por apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, tras el marcaje de las células con anexina V, conjugada con Alexa Fluor 488 (Invitrogen), con una excitación/emisión máxima de 488/499 nm. El método se basa en la detección de la fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés), que se ha translocado del espacio intracelular al extracelular de la membrana plasmática en las

células apoptóticas. La PS es un componente de los fosfolípidos que generalmente en células normales viables se encuentra en la cara interna de la membrana celular, gracias a una enzima llamada flipasa. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular, con un peso moléculas entre 35 y 36 KD,  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente que posee una gran afinidad por la PS (Van Engeland, y col., 1997). Por ello, al estar unida a un fluorocromo adecuado, permitió la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en la superficie externa de la célula. Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática como las células necróticas. Por ello, junto con la anexina V se utilizó un colorante que se une específicamente al DNA, en este caso al ADN de células necróticas, el yoduro de propidio (IP), con una excitación/emisión máxima de 535/617 nm, para así poder identificar exclusivamente las células apoptóticas. Así, sólo aquellas células con marcaje de anexina V positivo que mostraron ser negativas para el marcaje con IP, se consideraron apoptóticas.

Para este ensayo se empleó placas de 6 pozos y se trabajó con  $1,3 \times 10^5$  células por pozo en un volumen final de 1,5 mL de medio de cultivo RPMI suplementado. Después de transcurrir 24 horas las células se incubaron en presencia (concentración  $\text{CI}_{50}$ ) y ausencia del compuesto citotóxicos, durante 24 horas a 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  en incubadora.

Después de transcurrir el tiempo de incubación se descartó el medio de cultivo de cada pozo, luego se lavó con PBS, después se trató con una solución de tripsina-EDTA, seguidamente las células fueron centrifugadas durante 1 min a 741 g, se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con 100  $\mu$ L de solución de Anexina V [2  $\mu$ L de Anexina V conjugada + 2  $\mu$ L de ioduro de propidio (Sigma) a 50  $\mu$ g/ml + 96  $\mu$ L de tampón de unión (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM a pH 7,4)]. Después del periodo de incubación se completó a un volumen de 500  $\mu$ L con tampón de unión. Posteriormente se realizó la medición y análisis de la muestra en un citómetro de flujo (Gallios-Beckman coulter), usando el láser de excitación de 488 nm, la señal de Anexina V-conjugada y del IP se analizó en canal FL1 (Emisión  $530 \pm 30$  nm) y FL3 (Emisión  $581 \pm 21$  nm), respectivamente.

Finalmente mediante el uso de un software específico, diseñado por J. Trotter en 1993, el software de interfaz de múltiples documentos de Windows (WinMDI) versión 2.9, se obtuvieron los dotplot para cada una de las muestras los cuales representan la distribución de la población celular. Los cuadrante F1 de cada uno de los dotplot representaron los porcentajes de células con marcaje Anexina V-conjugada<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>, consideradas como células necróticas; los cuadrantes F2 representaron los porcentajes de células con marcaje Anexina V-conjugada<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, las cuales se consideraron como células apoptóticas tardías o necróticas; los cuadrantes F3 representaron los porcentajes de células con marcaje Anexina V-conjugada<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>, las cuales se consideraron como células viables y los cuadrantes F4 representaron los

porcentajes de células con marcaje Anexina V-conjugada<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>, estas últimas consideradas como células apoptóticas.

#### **4.4.2 Ensayo de TUNEL para la detección de fragmentación del ADN**

El grado de fragmentación internucleosomal del ADN en la población celular se determinó mediante el ensayo enzimático TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP nick end labeling) (Promega). Este mide la fragmentación internucleosomal del ADN, un evento bioquímico característico de la apoptosis, mediante la incorporación catalítica de nucleótidos dUTP marcados con fluoresceína a los extremos 3'-OH libres del ADN, generados por la ruptura del mismo. La incorporación de los nucleótidos a los extremos ocurre mediante la acción de la enzima transferasa terminal (TdT). Esta técnica permitió determinar la presencia de DNA fragmentado en células individuales, por lo que fue posible conocer la proporción de células que están muriendo por apoptosis en un determinado momento (Alfaro y col., 2000; Willingham, 1999).

Para este ensayo se emplearon placas de 6 pozos, dentro de las cuales se colocó láminas cubreobjetos esterilizados, con el fin de que las células se adhirieran a éstas y posteriormente con ellas realizar las manipulaciones siguientes. Se empleó  $1,3 \times 10^5$  células por pozo en un volumen final de 1,5 mL, se incubó durante 24 horas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en la incubadora. Luego de transcurrir el tiempo se incubaron en presencia (CI<sub>50</sub>) y ausencia del compuesto citotóxico, durante 48 y 72 horas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de cada tratamiento, se descartó el medio de cultivo de cada pozo, las células se lavaron dos veces con PBS y se extrajeron de cada pozo las láminas cubreobjetos.

Posteriormente se fijaron las células por adición de 500  $\mu$ L de una solución de para-formaldehído al 4% durante 20 minutos a 4 °C, después de transcurrir tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente las células se permeabilizarán con una solución de Triton X-100 al 0,2% durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Seguidamente se eliminó el exceso de líquido de las láminas cubreobjetos y se dejó incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente con el tampón de equilibrio (cacodilato de potasio 200 mM (pH 6.6 a 25°C), Tris-HCl 25 mM (pH 6.6 at 25°C), DTT 0.2mM, BSA 0.25mg/ml, cloruro de cobalto 2.5mM).

Mientras que las células se equilibraron, se descongeló la mezcla de nucleótidos [fluoresceína-12-dUTP 50 $\mu$ M, dATP 100 $\mu$ M, Tris-HCl 10mM (pH 7.6), EDTA 1mM] en hielo, protegido de la luz y se preparó suficiente tampón de incubación rTdT para todas las reacciones. Para determinar el volumen total de Tampón de incubación rTdT necesario, se multiplicó el número de reacciones por el volumen de una reacción estándar 51  $\mu$ L. Una vez transcurrido el tiempo con el Tampón de equilibrio se incubó las células con el tampón de incubación rTdT durante

60 minutos en una cámara húmeda a 37 °C, protegiendo de exposición a la luz directa.

Finalizado el tiempo de incubación se detuvo la reacción con una solución 2X SSC (3 M NaCl, 0.3 M Citrato) y se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente, de manera de eliminar aquellos nucleótidos que no se habían incorporado al ADN. Seguidamente se incubó con una solución de IP 1µg/mL durante 15 minutos, a temperatura ambiente protegido de la luz. Transcurrido el tiempo anterior, se realizaron tres lavados con agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se eliminó el exceso de agua, se dejó secar la lámina cubreobjetos y se procedió a realizar el montaje con 5 µL de Fluoromount (Sigma-Aldrich).

Inmediatamente se analizaron las muestras bajo un microscopio confocal (Nikon modelo C-1, tipo: microscopio confocal laser de barrido, no espectral de detección simultánea de cuatro láseres, montado sobre un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U) se utilizó un filtro de fluorescencia que detectara una DO  $520 \pm 20$  nm, para detectar la fluorescencia verde de la fluoresceína y un filtro de fluorescencia que detectara una DO  $> 620$  nm, para detectar la fluorescencia roja del ioduro de propidio. El ioduro de propidio (IP) es una molécula fluorescente que se une al ADN por intercalación entre las bases nitrogenadas, de manera que permitió el marcaje de los núcleos en rojo de células apoptóticas, así como también de células no

apoptóticas. Mientras que la fluorescencia verde localizada en el núcleo, resultado de la incorporación de nucleótidos marcados con Fluoresceína fue solamente de las células apoptóticas. Se empleó como control positivo el compuesto estaurosporina a  $0,1 \mu\text{M}$ , producto con actividad apoptótica conocida.

Se empleó el software EZ-C1 versión 3.9 FreeViewer de la casa comercial Nikon, para realizar la gestión de captura y análisis de las imágenes.

#### **4.4.3 Determinación de la actividad de Caspasa 3/7**

La determinación de la actividad de caspasa 3 y caspasa 7 se realizó mediante el ensayo triple ApoTox-Glo (Promega). Este ensayo combina tres ensayos bioquímicos de Promega que permitieron evaluar la viabilidad, citotoxicidad y la activación de caspasas dentro de un mismo ensayo. Se divide en dos partes, la primera parte del ensayo mide simultáneamente dos actividades proteasas; una de ellas es un indicador de la viabilidad celular, mientras que la otra es un indicador de citotoxicidad. La actividad proteasa de células vivas se restringe a las células viables intactas y se mide utilizando un fluorocromo, un sustrato péptidico (glycylphenylalanyl-aminofluorocoumarin; GF-AFC) que entra en las células intactas, donde es escindido por la actividad proteasa de células vivas generando una señal fluorescente, la cual es proporcional al número de células vivas; mientras que la actividad proteasa de células muertas se mide utilizando un fluorocromo, un sustrato péptidico (bis-alanylalanyl-Fenilalanil-rodamina 110; bis-AAF-R110) que es impermeable a las células intactas y es escindido por la actividad proteasa liberada de

las células que tienen pérdida de la integridad de la membrana, generando una señal fluorescente. Las actividades proteasas de células vivas y muertas originan diferentes productos, los cuales son: AFC y R110; estos presentan diferentes espectros de emisión y excitación, lo que permitió detectarlos simultáneamente (Niles y col., 2007).

La segunda parte del ensayo utiliza la tecnología del ensayo Caspasa-Glo, proporcionando un sustrato luminogeno que contiene la secuencia del tetrapéptido DEVD. El sustrato presente es escindido por las caspasas efectoras 3 y 7, generando como producto la luciferina la cual al unirse a la luciferasa y ATP generan una señal luminiscente. La luminiscencia es proporcional a la actividad caspasa presente (Ren, y col., 2004).

En este ensayo se empleó, en placas de 96 pozos opacas (Labsystems Cliniplate). Se utilizó  $1 \times 10^4$  células por pozo en un volumen final de 50  $\mu$ L de medio de cultivo RPMI suplementado y se dejaron incubar durante 24 horas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en la incubadora. Luego de transcurrir el tiempo las células se incubaron en presencia (CI<sub>50</sub>) y ausencia del compuesto citotóxico, durante 24, 48 y 72 horas en las condiciones antes descritas.

Una vez que se cumplió el tiempo de cada tratamiento se agregó a cada pozo 10  $\mu$ L del reactivo de citotoxicidad y viabilidad (2,5  $\mu$ L del sustrato GF-AFC + 2,5  $\mu$ L del sustrato bis-AAF-R110 + 550  $\mu$ L tampón de ensayo), luego se colocó la placa en un agitador orbital (Eppendorft Thermomixer confort) a 500 rpm durante 30



segundos, seguidamente se dejó incubando durante 30 minutos en la incubadora a 37 °C. Transcurrido el tiempo se midió la fluorescencia en el fluorímetro a dos longitudes de ondas distintas: 400 Ex/505 Em, para medir la viabilidad y a 485 Ex/520 Em, para medir la citotoxicidad. Posteriormente se agregó 50 µL de reactivo Caspasa-Glo 3/7, el cual contiene el sustrato para caspasa 3/7, luego se colocó la placa en un agitador orbital (Eppendorf Thermomixer confort) a 500 rpm durante 30 segundos, seguidamente se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo de incubación se midió la luminiscencia en el luminómetro.

El equipo que se utilizó fue un espectrofotómetro/fluorímetro/luminómetro modelo Synergy HT marca Biotech.

La reacción blanco estará compuesta por el reactivo Caspase-Glo 3/7, el vehículo disolvente de los compuestos citotóxicos (DMSO) y medio de cultivo RPMI suplementado con 10 % suero fetal bovino sin células. El control negativo estará compuesto por el reactivo Caspase-Glo 3/7 y células tratadas con el vehículo (DMSO) en medio de cultivo RPMI suplementado con 10 % suero fetal bovino. Los tratamientos experimentales estarán compuestos por el reactivo Caspase-Glo 3/7 y células tratadas con los compuestos citotóxicos en su medio de cultivo celular.

El valor de la reacción blanco se utilizará para medir la luminiscencia de fondo asociada con el sistema de cultivo celular y el reactivo Caspase-Glo 3/7. Se restará el valor de la reacción blanco a los valores experimentales. Las reacciones del

control negativo son importantes para determinar la actividad de la caspasa basal del sistema de cultivo celular.

Se empleó como control positivo el compuesto estaurosporina a 0,1  $\mu\text{M}$ , compuesto con actividad apoptótica conocida. Como control negativo se utilizó la ionomicina a 100 nM (Sigma-Aldrich), producto con actividad necrótica conocida.

#### **4.4.4 Evaluación del cambio en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ).**

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) es generado por el gradiente de protones ( $\text{H}^+$ ) entre la matriz mitocondrial (cargada negativamente) y el espacio intermembrana (cargado positivamente). El potencial mitocondrial de las células en condiciones normales es alto y constante ( $\sim 130$  mV), pero disminuye en las primeras etapas del proceso apoptótico, como consecuencia de la despolarización de las mitocondrias.

El cambio en el potencial de membrana mitocondrial se determinó mediante citometría de flujo, tras el marcaje de las células con MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen, Molecular Probes). El método se basa en el marcaje de las mitocondrias de las células viables. El MitoTracker Red CMXRos, de fórmula molecular  $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$  y peso molecular 531.52 g/mol, difunde pasivamente a través de la membrana plasmática y de la membrana mitocondrial, acumulándose en la mitocondria. Una vez en la mitocondria se oxida y reacciona con residuos tioles de

proteínas y péptidos, de manera que queda secuestrado en la mitocondria. La señal de fluorescencia de MitoTracker Red CMXRos (Excitación y Emisión máxima de 579/599 nm) es más brillante en la mitocondria activa que en la mitocondria con membrana despolarizada, ya que disminuye la interacción con la proteínas mitocondriales, permitiendo identificar las células sanas en una población y a su vez las células que han sufrido alteraciones en la membrana mitocondrial como las células apoptóticas (Pendergrass y col., 2004).

Para este ensayo se empleó placas de 6 pozos y se trabajó con  $1,3 \times 10^5$  células por pozo en un volumen final de 1,5 mL, se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa. Posteriormente las células se incubaron en presencia (CI<sub>50</sub>) y ausencia del compuesto citotóxico, durante 6 hrs., 16 hrs., 24 hrs. y 48 hrs. a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en incubadora.

Después de transcurrir el tiempo de incubación de cada tratamiento se descartó el medio de cultivo, luego las células se lavaron con PBS, se agregó medio de cultivo RPMI suplementado y adicionalmente la solución de MitoTracker Red CMXRos a 100 nM y se incubó durante 40 min a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa, evitando exposición a la luz. Luego se descartó el medio de cultivo de cada pozo, se lavaron las células con PBS, se trataron con una solución de tripsina-EDTA. Seguidamente las células se centrifugaron y resuspendieron en PBS. Posteriormente se realizó la medición y análisis de la muestra en un citómetro de flujo (Gallios-Beckman coulter), usando el láser de excitación 488 nm, la señal del MitoTracker Red CMXRos se analizó en canal FL3 (Emisión  $581 \pm 21$  nm).

Finalmente mediante el programa WinMDI versión 2.9, se obtuvieron los histogramas para cada una de las muestras.

Como control positivo se empleó la Valinomicina (20 nM), fármaco que desestabiliza el potencial de membrana mitocondrial, mediante el transporte de iones  $K^+$  del citosol a la matriz mitocondrial (Safiulina y col., 2006).

#### **4.4.5 Análisis de proteínas claves en la activación de la apoptosis mediante Western Blot.**

El Western blot es una técnica que permite detectar una proteína específica en una muestra heterogénea. En primer lugar, la muestra, una mezcla compleja de proteínas se separa analíticamente mediante electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE, de modo que las diversas proteínas ocupan una posición final en el gel según su peso molecular. Posteriormente mediante electrotransferencia (acción de un campo eléctrico) las proteínas son transferidas desde el gel a una membrana, de manera que la membrana adquiera una réplica de la batería de proteínas presentes en el gel. Por último, se puede detectar sobre la membrana la posición de una proteína específica mediante su unión con un anticuerpo específico marcado, lo que permitirá su observación durante el revelado (Abbas y col., 2008).

Este ensayo permitió la evaluación de los cambios en los niveles de expresión de las proteínas Bax, Bcl-2, Bcl-xL, AIF, AKT y Survivina bajo efectos de los compuestos evaluados.

#### **4.4.5.1 Extracción de proteínas**

En este caso se emplearon frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, se trabajó con 4x10<sup>5</sup> células por frasco en un volumen final de 10 mL, se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en incubadora. Luego de transcurrir el tiempo, se incubaron en presencia (concentración IC<sub>50</sub>) y ausencia del compuesto citotóxico, durante 16, 24, 48 y 72 horas en las condiciones antes descritas.

Transcurrido el tiempo de los diversos tratamientos se descartó el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS, luego las células se fueron tratadas con una solución de tripsina-EDTA de manera de despegarlas y seguidamente extraerlas del frasco de cultivo, se centrifugaron 10 minutos a 741 g y se resuspendieron en PBS (10 µL de PBS por cada 50 µL de sedimento celular), manteniendo la muestra en frío. Seguidamente se le agregó tampón de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, EGTA 1 mM y 0,5% Nonidet P-40), 20 µL de tampón por cada 50 µL de sedimento celular, se incubó durante 30 minutos en hielo y además se agregó un coctel de inhibidores de fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico, 10 mM NaF) y de proteasas (10 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL leupeptina, 100 µM PMSF). Luego se centrifugó 10 minutos a 741 g. Se tomó el sobrenadante y se trasvasó a un tubo de 1.5 mL. Después se tomó una alícuota de 4 µl de sobrenadante para determinar la

concentración de proteínas. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976; Noble y Bailey, 2009). Una vez obtenida la concentración de las proteínas de la muestra, esta se almaceno a -70 °C.

#### **4.4.5.2 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford**

Se estimó la cantidad de proteínas utilizando método de Bradford (Bradford, 1976; Noble y Bailey, 2009). Este método se basa en el uso del colorante azul de Coomassie G-250, un colorante hidrófobico que se une a las proteínas en solución, formando un complejo que provoca un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante, el cual se encuentra desde 465 nm a 595 nm. La cantidad de absorción por parte de colorante es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra (Walker, 2002).

Se colocó por triplicado 4  $\mu$ L de la muestra en 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford (Bio-Rad) a temperatura ambiente, se incubó las muestras durante 5 min y se realizó la estimación de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. La determinación de la concentración de proteínas en una muestra requiere la comparación del valor de absorbancia de la muestra con valores obtenidos a partir de concentraciones de proteínas ya conocidas, con los que se construye una curva de calibración, en este caso se empleó una proteína estándar, la albúmina de suero bovino (por sus siglas en inglés BSA). Para ello se realizó una dilución seriada de la

proteína BSA por duplicado (2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL) posteriormente se determinó su absorbancia y con los valores obtenidos se realizó la construcción de la curva de calibración (curva de regresión lineal). Las muestras donde fue necesario realizar una dilución para obtener el valor estimado, se multiplicó la concentración obtenida por el factor de dilución para estimar el valor real de la muestra.

#### **4.4.5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia de proteínas**

Los geles de poliacrilamida-SDS para proteínas y la transferencia a membranas se harán según protocolos estándar (Sambrook y col, 1989). La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 10%, ya que las proteínas a detectar se son de bajo peso molecular en su mayoría, en condiciones desnaturalizantes, es decir las proteínas son solubilizadas en presencia de un detergente aniónico SDS, el cual rompe las interacciones hidrofóbicas, enmascarando su carga nativa original por la carga negativa del SDS, con un sistema de tampón discontinuo de Tris-Glicina-SDS. El sistema discontinuo consta de dos tipos de gel, un gel de apilamiento el cual contiene agua, una mezcla de acrilamida al 30%, Tris 1 mol/L a pH 6.8, SDS al 10%, APS al 10% y TEMED sobre el cual se colocó un peine para la formación de los bolsillos, y a su vez este gel de apilamiento se forma sobre un segundo gel separador que contiene los mismos reactivos pero con un tampón Tris a pH 8.8 (Maldonado y Jorrín, 2003).

Se preparó la muestra para la corrida electroforética en tubos de 1,5 mL, mezclando 50 µg de proteína de cada muestra con tampón de carga 6X [Tris-HCl 300 mM pH 6,8, SDS 12%, glicerol 50 %, β-mercaptoetanol 6%, azul de bromofenol 0,006 %], de tal forma la concentración final de este último fuese 1X. Se hirvieron las muestras durante 5 min, se enfriaron en hielo y luego se colocó en cada bolsillo del gel una muestra diferente con la ayuda de una micropipeta. La corrida electroforética se realizó a 100 V hasta que el frente de corrida llegó al final del gel.

Previo a la transferencia de proteínas, se activó la membrana de polivinilideno fluoruro (por sus siglas en inglés, PVDF) (Amersham Hybond-P, GE Healthcare Life Sciences) en etanol 100% por 10 segundos, después se realizó un lavado con agua destilada (H<sub>2</sub>O) durante 5 minutos, luego se equilibró la membrana sumergiendo la misma en el tampón de transferencia (10 % de Tampón de transferencia 10X (Tris 480 mM, glicina 390 mM, SDS 0,37 %) + 20 % de metanol + 70 % de H<sub>2</sub>O, volumen final de 1 L) con agitación durante 10 minutos.

Después de terminada la corrida electroforética se removió el gel de apilamiento y se incubó el gel en el tampón de transferencia durante 10 minutos, de igual forma todos los materiales a emplear se sumergieron en el tampón de transferencia. Transcurrido el tiempo se preparó el “sándwich”, de la siguiente manera: esponja + dos papeles de filtro + gel de poliacrilamida + membrana + dos papeles de filtro + esponja, cabe destacar que se construyó en base a que las proteínas se transferirán desde el polo negativo (negro) al positivo (rojo). Por último se colocó el “sándwich” ensamblado en la cámara de transferencia a 100 V durante 1 hora y 30



minutos a 4 °C. Una vez transcurrido el tiempo para asegurar que la transferencia de las proteínas a la membrana fue exitosa, la misma se incubó con una solución de rojo de Ponceau S (rojo Ponceau 0,2 %, ácido acético 0,1 %) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en movimiento, debido a que este colorante se une a las proteínas de forma reversible, una vez confirmada la presencia de proteínas en la membrana se lavó la misma con agua destilada.

Posteriormente se realizó un proceso de bloqueo, con el fin de evitar uniones inespecíficas entre el anticuerpo primario y las proteínas retenidas en la membrana. Este procedimiento implicó el uso de una solución a base de leche descremada en polvo al 5% durante 1 hora con agitación y a temperatura ambiente, de esta forma las proteínas de la leche se adhieren a las zonas de la membrana donde no se transfirieron proteínas. El agente bloqueante, es decir, la leche descremada se diluyó en TBST [100 mL TBS 10X (Tris-HCL 0,5 M (pH 7,5), NaCL 1,5 M) + 900 mL H<sub>2</sub>O + 1 mL Tween20]. Después de transcurrir el tiempo de bloqueo se realizó dos lavados con TBST durante 5 minutos cada uno.

#### **4.4.5.4 Inmunodetección de proteínas**

En la inmunodetección se comprueba la presencia en la membrana de una proteína determinada; para ello se pueden utilizar tanto anticuerpos primarios monoclonales como policlónales, los cuales reconocen una pequeña estructura de una secuencia de aminoácidos llamado epítipo. Los anticuerpos policlónales se obtienen directamente a partir del suero del animal y son finalmente purificados y ensayados.

En el caso de un anticuerpo monoclonal, las células que sintetizan anticuerpos se aíslan del bazo del animal y se fusionan con células del mieloma; los hibridomas resultantes secretan anticuerpos al medio de cultivo, el cual se analiza y determina la afinidad al antígeno. Los anticuerpos policlonales, por ser una población heterogénea, reconocen generalmente múltiples epítomos de la proteína, en cambio los monoclonales reconocen un único epítomo de la proteína (Abbas y col., 2008).

Una vez realizado el proceso de bloqueo, se procedió a realizar la inmunodetección de las proteínas de interés; para ello se incubó la membrana con el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario se diluyó en el tampón de bloqueo (leche descremada al 5% en TBST) a un volumen final de 5 mL. Seguidamente las membranas se colocaron dentro de bolsas plásticas, dentro de las cuales se agregó el anticuerpo primario y se dejó incubando toda la noche a 4 °C en un agitador orbital. Transcurrido el tiempo se realizaron tres lavados de la membrana con TBST de 10 minutos cada uno.

Al tratarse de una detección de proteínas mediante el método indirecto, se utilizó un anticuerpo secundario con marcaje detectable, como aquel anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (por sus siglas en inglés HRP), cuya enzima cataliza la oxidación del luminol presente en el tampón de revelado (Western Blotting Luminol Reagent- Santa Cruz Biotech) produciendo una emisión de luz (quimioluminiscencia), la cual se detecta mediante la exposición a una película

(autoradiografía), donde la magnitud de la emisión de luz es proporcional a la cantidad de proteína presente en la membrana.

Después de los lavados con TBST se repitió el mismo paso anterior pero con el anticuerpo secundario conjugado HRP Tabla 2. Una vez culminada las incubaciones con el anticuerpo secundario, y los respectivos lavados con TBST, se realizó el revelado. Como el reactivo luminol consta de dos soluciones se tomó partes iguales de cada una (500  $\mu$ L solución A + 500 $\mu$ L solución B) para obtener el tampón de revelado el cual se agregó sobre la membrana de PVDF y se precedió a la captura de las imágenes.

El equipo que se utilizó para tomar las imágenes fue el Chemidoc XRS de BioRad. Posteriormente el tratamiento de la imagen fue realizado con programas especializados, como el Quantity One (BioRad).

El análisis cuantitativo de la señal de las bandas se realizó mediante el programa Image Studio Lite versión 3.1 de la casa comercial LI-COR Biosciences.

#### **4.4.5.5 Reutilización de membranas (*Stripping*)**

Para reutilizar la membrana e incubarla con otros anticuerpos, esta se incubó con 5 mL de la solución de “Stripping” (Tris-HCl 50 nM pH 6.8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM) durante 30 minutos a 60 °C. Posteriormente se realizaron 4 lavados a la membrana con 10 mL de TBST. Seguidamente la membrana se bloqueó nuevamente y quedó lista para ser incubada con otro anticuerpo primario.

#### 4.4.5.6 Anticuerpos utilizados

| <b>Anticuerpo primario</b> | <b>Origen</b>              | <b>Procedencia</b> | <b>Dilución</b> |
|----------------------------|----------------------------|--------------------|-----------------|
| Bax                        | Rabbit (conejo) policlonal | BioLegend          | 1/500           |
| Bcl-2                      | Mouse (Ratón) monoclonal   | Calbiochem         | 1/100           |
| AIF                        | Mouse (Ratón) monoclonal   | Santa Cruz         | 1/200           |
| Survivin                   | Goat (Cabra) policlonal    | Santa Cruz         | 1/100           |
| GAPDH                      | Rabbit (Conejo) policlonal | Santa Cruz         | 1/400           |
| Bcl-xL                     | Rabbit (Conejo) policlonal | Santa Cruz         | 1/200           |
| AKT1                       | Mouse (Ratón) monoclonal   | Santa Cruz         | 1/200           |

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección de proteínas se especifica el origen, dilución en la que se utilizan y su procedencia.

| <b>Anticuerpo secundario</b> | <b>Conjugado</b> | <b>Procedencia</b> | <b>Dilución</b> |
|------------------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| Chicken anti-mouse HRP       | Peroxidasa       | Pierce             | 1/2000          |
| bovine anti-goat IgG-HRP     | Peroxidasa       | Santa Cruz         | 1/2000          |
| bovine anti-rabbit IgG-HRP   | Peroxidasa       | Santa Cruz         | 1/2000          |

Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas se muestra el tipo de conjugación, dilución en la que se emplean y la procedencia.

#### **4.5 Diseño experimental y análisis estadístico**

Para realizar el ajuste de los efectos de los compuestos KSC21 y KSC41 sobre la línea celular PC3 en cuanto a los estudios planteados, se utilizó un diseño Experimental Completamente Aleatorizado con tres repeticiones. Los resultados se ajustaron utilizando un modelo lineal mixto y la prueba de comparación múltiple de DGC (Di Rienzo y col., 2002; Di Rienzo y col., 2012).

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InfoStat 2013 (Di Rienzo y col., 2013).

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1 Determinación del efecto citotóxico de una serie estructural de compuestos tipo seco-*ent*-kauranos en la línea celular tumoral, PC3 y cultivos no tumorales (cultivos primarios de fibroblastos) mediante ensayo con MTT.

La serie estructural de compuestos semi-sintéticos tipo seco-*ent*-kauranos está compuesta por un total de 9 moléculas, a los cuales se les evaluó su efecto citotóxico a diferentes concentraciones, después de 72 horas de tratamiento, mediante el ensayo MTT. Para la línea celular tumoral PC3 se emplearon diluciones medias a partir de 25  $\mu\text{g/mL}$  hasta 0.39  $\mu\text{g/mL}$  y diluciones medias a partir de 25  $\mu\text{g/mL}$  hasta 1.56  $\mu\text{g/mL}$  sobre el cultivo primario de fibroblastos (no tumoral).

En los resultados obtenidos se muestra claramente que los compuestos en estudio presentan una actividad característica sobre la línea celular tumoral PC3, lo que se refleja en los diferentes valores de  $\text{CI}_{50}$  (Tabla 4), obtenidos luego de la exposición de las células a concentraciones crecientes con cada uno de los compuestos. La concentración a la cual la línea celular muestra una inhibición del 50 % de la proliferación celular se determinó con la ayuda de un software específico, Origin versión 6.0. Cabe destacar que posteriormente las concentraciones obtenidas en  $\mu\text{g/mL}$  se llevaron a  $\mu\text{M}$ . Además, mediante las curvas dosis-respuesta (Figuras 13 y 14) se puede evidenciar un incremento progresivo de la inhibición de la

proliferación celular frente a las concentraciones evaluadas de cada compuesto, tanto en la línea celular tumoral como en la no tumoral.

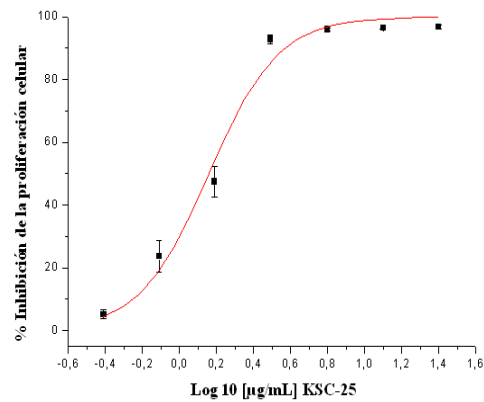
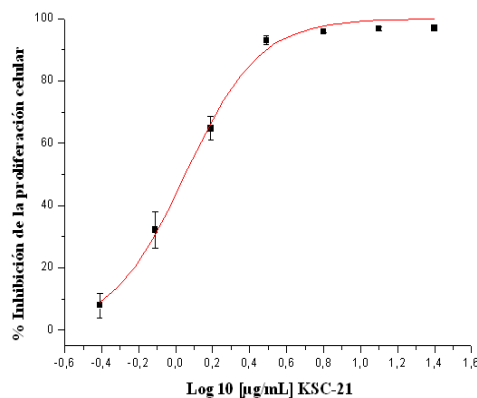
Se observó que el efecto citotóxico de los compuestos sobre la línea celular PC3 fue menor en comparación al compuesto base, Caracasina (KSC-21), esto indica que las modificaciones químicas entre adición, sustitución y eliminación de cadenas de hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) y grupos funcionales que se realizaron al compuesto base para obtener la serie de compuesto semi-sintéticos disminuyeron el efecto citotóxico de estos sobre la línea celular tumoral PC3. Esto se puede ver reflejado en las  $CI_{50}$  de los mismos, donde se observó que cuyos valores de  $CI_{50}$  son mayores en comparación a la  $CI_{50}$  que se obtuvo para la Caracasina. Por otro parte en los cultivos no tumorales se observó que el efecto citotóxico de los compuestos aumento en comparación al efecto citotóxico de la Caracasina, a excepción de los compuestos KSC-37, KSC-41 y KSC-45 que presentaron un menor efecto citotóxico, es decir que estos últimos presentaron una  $CI_{50}$  mayor en comparación a la  $CI_{50}$  que se obtuvo con la Caracasina.

Los resultados obtenidos demuestran que los compuestos semi-sintéticos en su mayoría presentan una actividad biológica característica sobre la línea celular tumoral PC3, que se refleja en los diferentes valores de  $CI_{50}$  obtenidos luego de la exposición de las células a concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos. Esto se dice debido a que el efecto citotóxico fue mayor en la línea celular tumoral que en la no tumoral. El compuesto KSC-37, presentó un menor efecto citotóxico

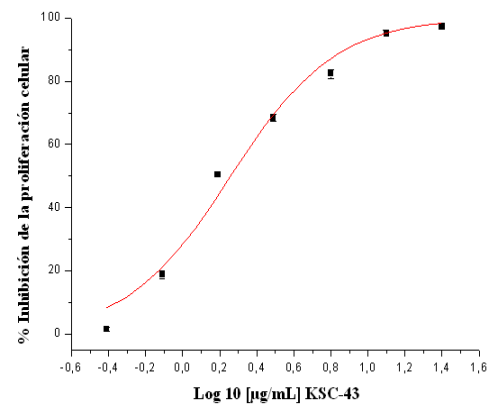
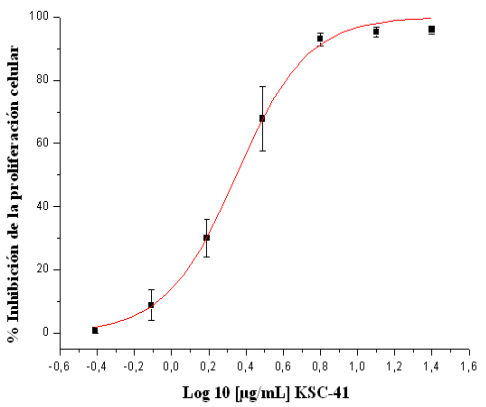
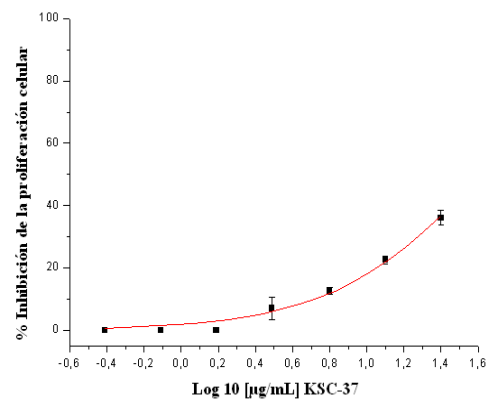
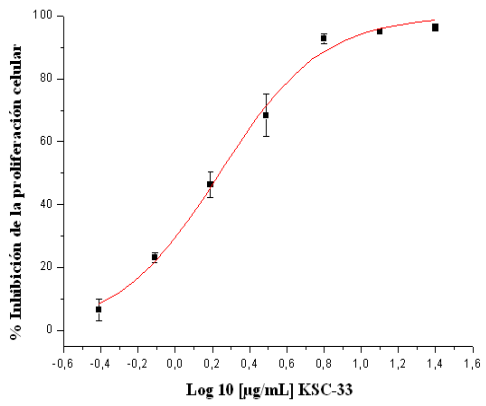
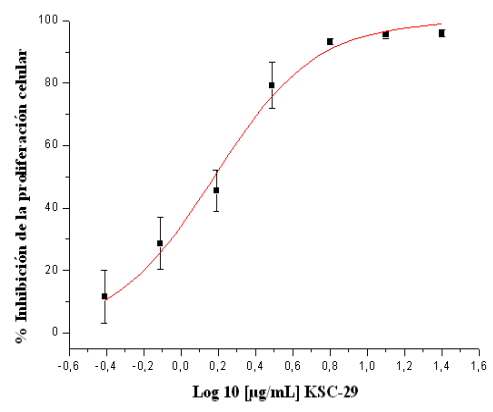
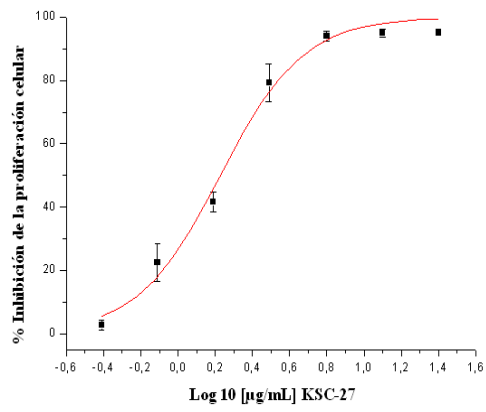
tanto en la línea celular PC3 como en la línea celular no tumoral, con  $CI_{50}$  mayor a 25  $\mu\text{g/mL}$ .

Comparando las  $CI_{50}$  de los compuestos en la línea celular tumoral y los cultivos no tumorales, se pudo seleccionar dos compuestos, el KSC-21 y el KSC-41, debido a que ambos presentaron una mayor relación entre las mismas, es decir presentaron un efecto citotóxico y una notoria inhibición de la proliferación celular mucho mayor en la línea celular tumoral que en los cultivos no tumorales.

Los compuestos KSC-21 y el KSC-41 se seleccionaron entonces como los compuestos con mayor citotoxicidad sobre la línea celular PC3 que sobre los cultivos primarios de fibroblastos, ya que el valor de  $CI_{50}$  estos últimos es 3.33 (en el caso del compuesto KSC-21) y 3.86 (en el caso del compuesto KSC-41) veces mayor que el de la línea celular tumoral.







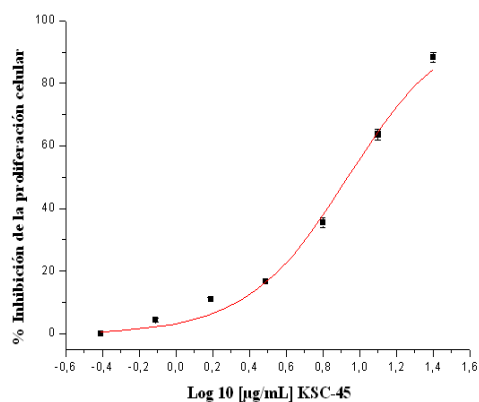
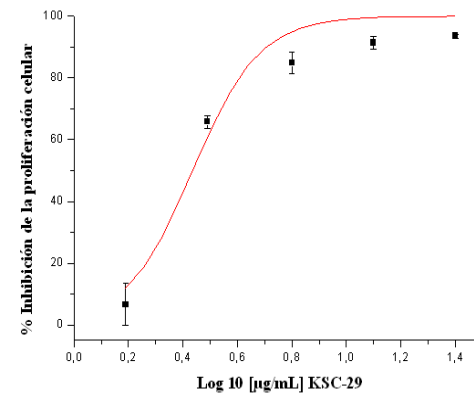
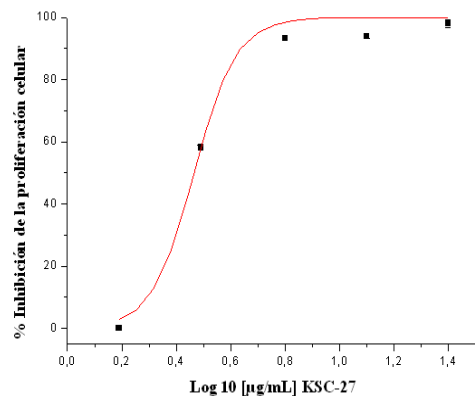
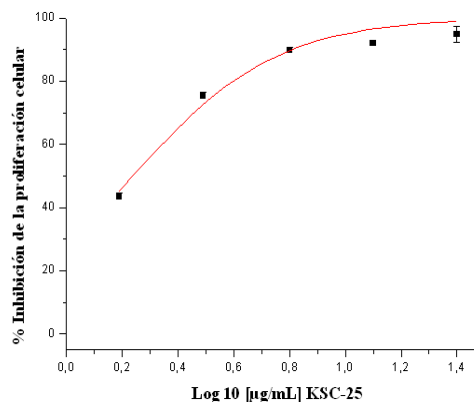
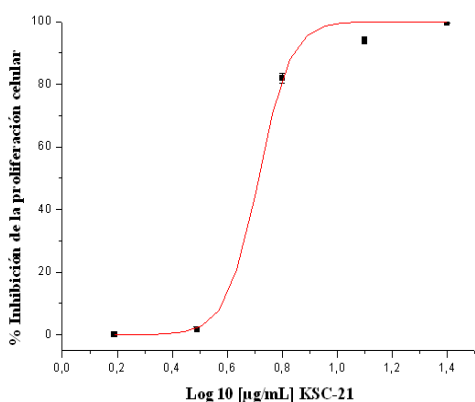


Figura 12. Curvas Dosis-Respuesta de cada uno de los compuestos semi-sintéticos, tipo *sec-ent-kauranos*, sobre la línea celular tumoral PC3. En el eje Y se representa el porcentaje de inhibición de la proliferación celular y en el eje X, el log 10 de la concentración de cada compuesto (µg/mL).



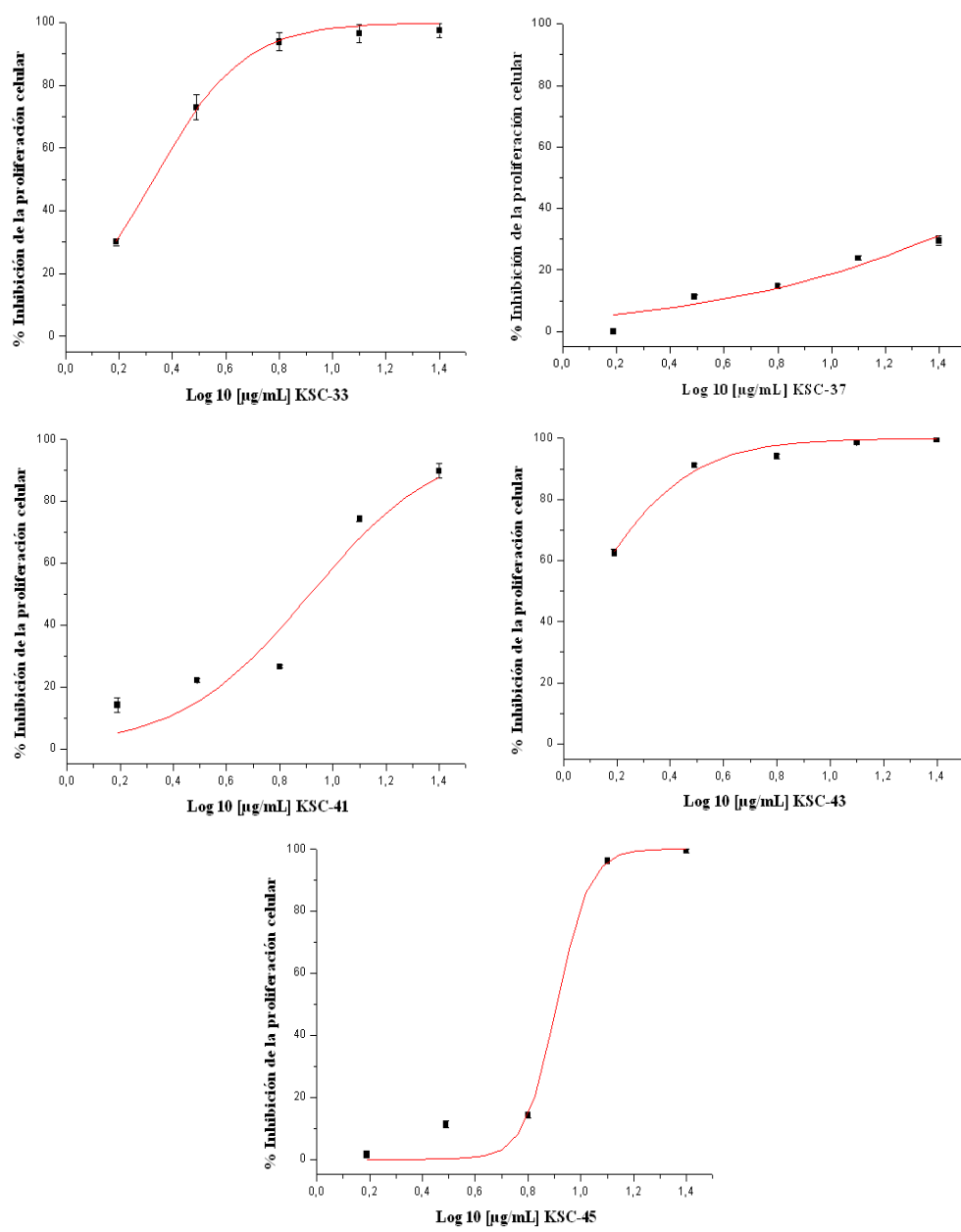


Figura 13: Curvas Dosis-Respuesta de cada uno de los compuestos seco-ent-kauranos sobre cultivos no tumorales: cultivos primarios de fibroblastos. En el eje Y se representa el porcentaje de inhibición de la proliferación celular y en el eje X, el log 10 de la concentración de cada compuesto (µg/mL).

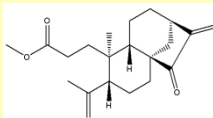
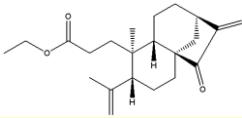
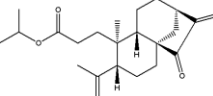
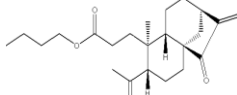
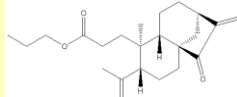
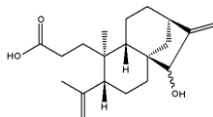
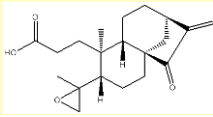
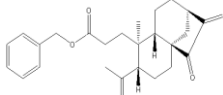
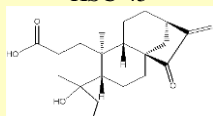
| Compuestos  | PM (g/mol) | CI <sub>50</sub> PC3 (µg/ml) | CI <sub>50</sub> PC3 (µM) | DE     | CI <sub>50</sub> Fibroblastos (µg/ml) | CI <sub>50</sub> Fibroblastos (µM) | DE     | Relación    |
|---|------------|------------------------------|---------------------------|--------|---------------------------------------|------------------------------------|--------|-------------|
| <p>KSC-21</p>    | 330.46     | 1.21                         | 3.60                      | ± 0.13 | 4.07                                  | 12.31                              | ± 1.13 | <b>3.36</b> |
| <p>KSC-25</p>    | 344.49     | 1.50                         | 4.35                      | ± 0.19 | 1.75                                  | 5.07                               | ± 0.71 | 1.17        |
| <p>KSC-27</p>    | 358.51     | 1.94                         | 5.41                      | ± 0.14 | 2.69                                  | 7.50                               | ± 0.35 | 1.39        |
| <p>KSC-29</p>    | 372.54     | 1.76                         | 4.72                      | ± 0.32 | 2.60                                  | 6.97                               | ± 0.22 | 1.48        |
| <p>KSC-33</p>  | 358.51     | 1.52                         | 4.23                      | ± 0.07 | 2.17                                  | 6.05                               | ± 0.17 | 1.50        |
| <p>KSC-37</p>  | 318.45     | 43.51                        | 136.63                    | ±9.63  | 65.9                                  | 206.93                             | ± 8.7  | 1.51        |
| <p>KSC-41</p>  | 348.43     | 2.24                         | 6.42                      | ± 0.43 | 8.6                                   | 24.68                              | ± 1.0  | <b>3.84</b> |
| <p>KSC-43</p>  | 406.56     | 1.43                         | 3.51                      | ± 0.08 | 1.16                                  | 2.85                               | ± 0.18 | 0.81        |
| <p>KSC-45</p>  | 322        | 9.81                         | 29.50                     | ± 1.74 | 8.13                                  | 25.24                              | ± 1.05 | 0.83        |

Tabla 4: Estructura y CI<sub>50</sub> de la serie de compuestos tipo seco-*ent*-kauranos en línea celular tumoral pC3 y en cultivos primarios de fibroblastos no tumorales.

## **5.2 Ensayo de Anexina V a través de citometría de flujo en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.**

Los compuestos KSC-21 y el KSC-41 poseen cierto potencial antitumoral, debido a la actividad citotóxica que se obtuvo en la línea celular tumoral PC3, lo que abre la posibilidad de evaluar si el efecto citotóxico observado en la línea celular tumoral es consecuencia de la activación de la apoptosis. Una de las características claves de este tipo de muerte celular es la translocación de la fosfatidilserina del interior al exterior de la membrana plasmática en células apoptóticas. Por lo que se planteó la realización del ensayo de Anexina V, que permitió la detección de la fosfatidilserina a través del uso del citómetro de flujo.

Para ello se realizó el tratamiento de la línea celular tumoral PC3 con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 y el KSC-41,  $3.60 \mu\text{M}$  y  $6.42 \mu\text{M}$ , respectivamente durante 24 horas. Trascurrido el tiempo de tratamiento se realizó el ensayo y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (Gallios-Beckman coulter) y posteriormente mediante el uso del software WinMDI versión 2.9 se obtuvieron los dotplot para cada una de las muestras, los cuales representan la distribución de la población que conforma cada una de las muestras. La anexina V es una proteína que posee gran afinidad por la PS; al estar unida a un fluorocromo adecuado, como Alexa fluor 488 permitió la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en la superficie externa de la célula. Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática como las células necróticas, por

lo que se emplea junto con la anexina V el ioduro de propidio (IP), el cual se une específicamente al ADN, en este caso al ADN de células necróticas, para así poder identificar exclusivamente las células apoptóticas. Así, sólo aquellas células con marcaje de anexina V<sup>+</sup> y IP<sup>-</sup>, se consideraron apoptóticas.

Por lo tanto los cuadrante F1 de cada uno de los dotplots representan los porcentajes de células con marcaje Anexina V-Alexa flúor 488<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>, células necróticas; los cuadrantes F2 representan los porcentajes de células con marcaje Anexina V-Alexa flúor 488<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, células apoptóticas tardías o necróticas; los cuadrantes F3 representan los porcentajes de células con marcaje Anexina V-Alexa flúor 488<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>, células viables y los cuadrantes F4 representan los porcentajes de células con marcaje Anexina V-Alexa flúor 488<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>, células apoptóticas.

Los resultados obtenidos (Figura 14) permitieron evidenciar que las células PC3 bajo dichos tratamientos muestran un marcaje de Anexina V-Alexa flúor 488<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>, mayor al del control. En el caso del control (células sin tratamiento), se obtuvo un 1.6 % de células con marcaje Anexina V-Alexa flúor 488<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>, es decir células apoptóticas, mientras que para el tratamiento con el compuesto KSC-21 se obtuvo un 33,6 % y para el tratamiento con el compuesto KSC-41 se obtuvo un 17.8 %, esto se pudo observar en el cuadrante F4 de los diagramas representados en la Figura 15. El tratamiento con el compuesto KSC-21 presentó un mayor porcentaje de células apoptóticas que el tratamiento con el compuesto KSC-41. Además se pudo observar que en el caso del tratamiento con el compuesto KSC-21 se obtuvo un 17.3 % de células con marcaje Anexina V- Alexa flúor 488<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, es decir células

apoptóticas tardías, mientras que en el tratamiento con el KSC-41 un 13.8 %, cuyos valores superaron al obtenido en el control 1.5 %, es decir que al comparar los tratamientos con el compuesto KSC-21 y KSC-41 con el control se pudo observar que estos al presentar un porcentaje de células apoptóticas mayor al porcentaje de células apoptóticas que se obtuvo en el control, están induciendo la translocación de la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana plasmática a la cara externa de la misma, como se mencionó anteriormente, un cambio morfológico característico durante la activación del proceso de la apoptosis.

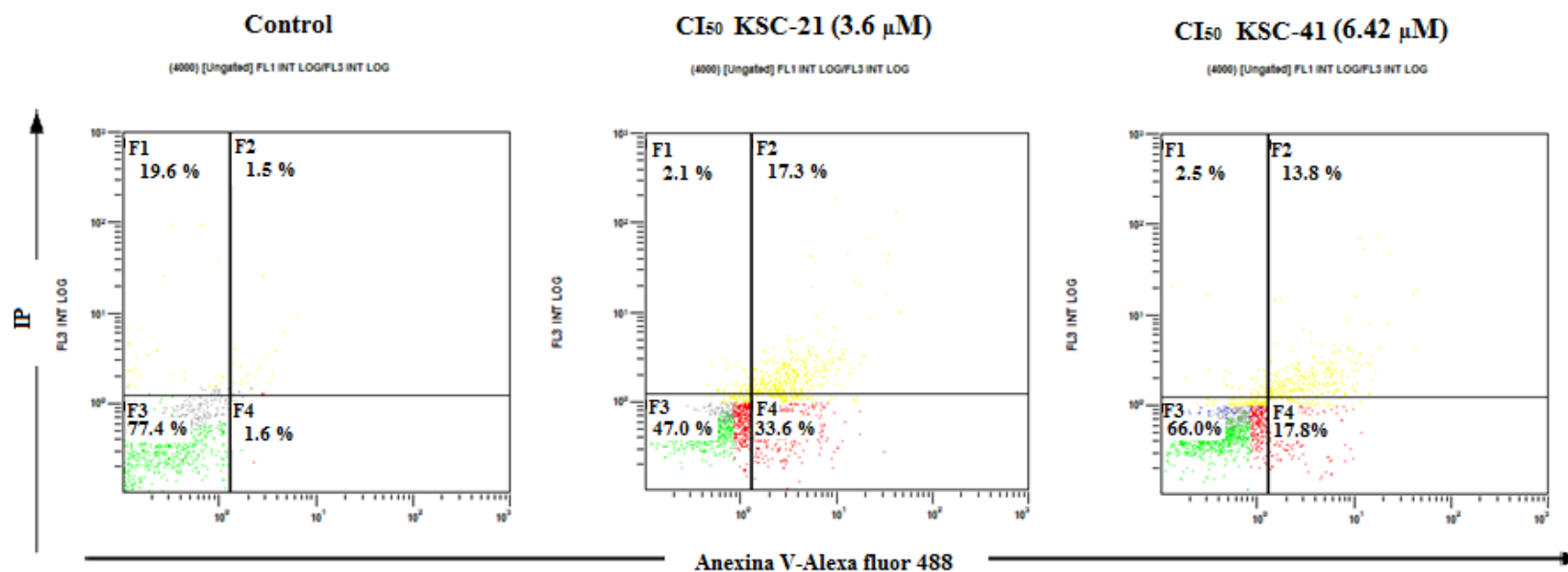


Figura 14. Ensayo de Anexina V en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41, mediante citometría de flujo. Células PC3 fueron tratadas la CI<sub>50</sub> de los compuestos KSC-21 y KSC-41, 3.60 μM y 6.42 μM, respectivamente, durante 24 horas. Los cuadrantes F1 de cada uno de los dotplots representan los porcentajes de células con marcaje Anexina V-Alexa flúor 488<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, células necróticas; los cuadrantes F2 representan los porcentajes de células con marcaje Anexina V- Alexa flúor 488<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, células apoptóticas tardías o necróticas; los cuadrantes F3 representan los porcentajes de células con marcaje Anexina V- Alexa flúor 488<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>, células viables y los cuadrantes F4 representan los porcentajes de células con marcaje Anexina V- Alexa flúor 488<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>, células apoptóticas.



### **5.3 Evaluación de la fragmentación del ADN en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41, mediante el ensayo de TUNEL.**

Para ello se realizaron tratamientos de la línea celular tumorales PC3 con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 y el KSC-41, 3.60  $\mu$ M y 6.42  $\mu$ M, respectivamente durante 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo se realizó el ensayo y se analizaron las muestras en el microscopio de fluorescencia confocal.

Se observó que la línea celular PC3 bajo el tratamiento con la  $CI_{50}$  del compuesto KSC-21 a las 48 y 72 horas, presento un marcaje TUNEL<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, es decir, que las células presentaron una fluorescencia verde localizada en el núcleo, resultado de la incorporación de nucleótidos marcados con fluoresceína a los extremos 3'-OH libres del ADN, así como también presentaron una fluorescencia roja producto de la intercalación del IP a las bases nitrogenadas del ADN, lo que permitió identificarlas como células apoptóticas (Figura 15), mientras que las células del control presentaron un marcaje TUNEL<sup>-</sup>/IP<sup>+</sup>, identificando a las células como células no apoptóticas. Además se pudo observar como a medida que aumento el tiempo de incubación con el compuesto KSC-21 la cantidad de células apoptóticas disminuyó.

En el caso de la línea celular PC3 bajo el tratamiento con la  $CI_{50}$  del compuesto KSC-41 a las 48 y 72 horas, presentó un marcaje TUNEL<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>, es decir, las células presentaron una fluorescencia verde localizada en el núcleo resultado de la incorporación de nucleótidos marcados con fluoresceína a los extremos 3'-OH

libres del ADN, así como también presentaron una fluorescencia roja producto la intercalación del IP a las bases nitrogenadas del ADN, lo que permitió identificarlas como células apoptóticas (Figura 16), mientras que las células del control presentaron un marcaje TUNEL/IP<sup>+</sup>, identificando a las células como células no apoptóticas. También se pudo observar como a medida que aumento las horas de incubación con el compuesto KSC-41 la cantidad de células apoptóticas disminuyo.

Cabe destacar que a las 48 horas de tratamiento con ambos compuestos el 100% de las células presentaron marcaje TUNEL positivo.

Los resultados obtenidos indican que los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen en la línea celular PC3 la fragmentación del ADN, por lo tanto ambos compuestos podrían estar induciendo la activación del proceso apoptótico.

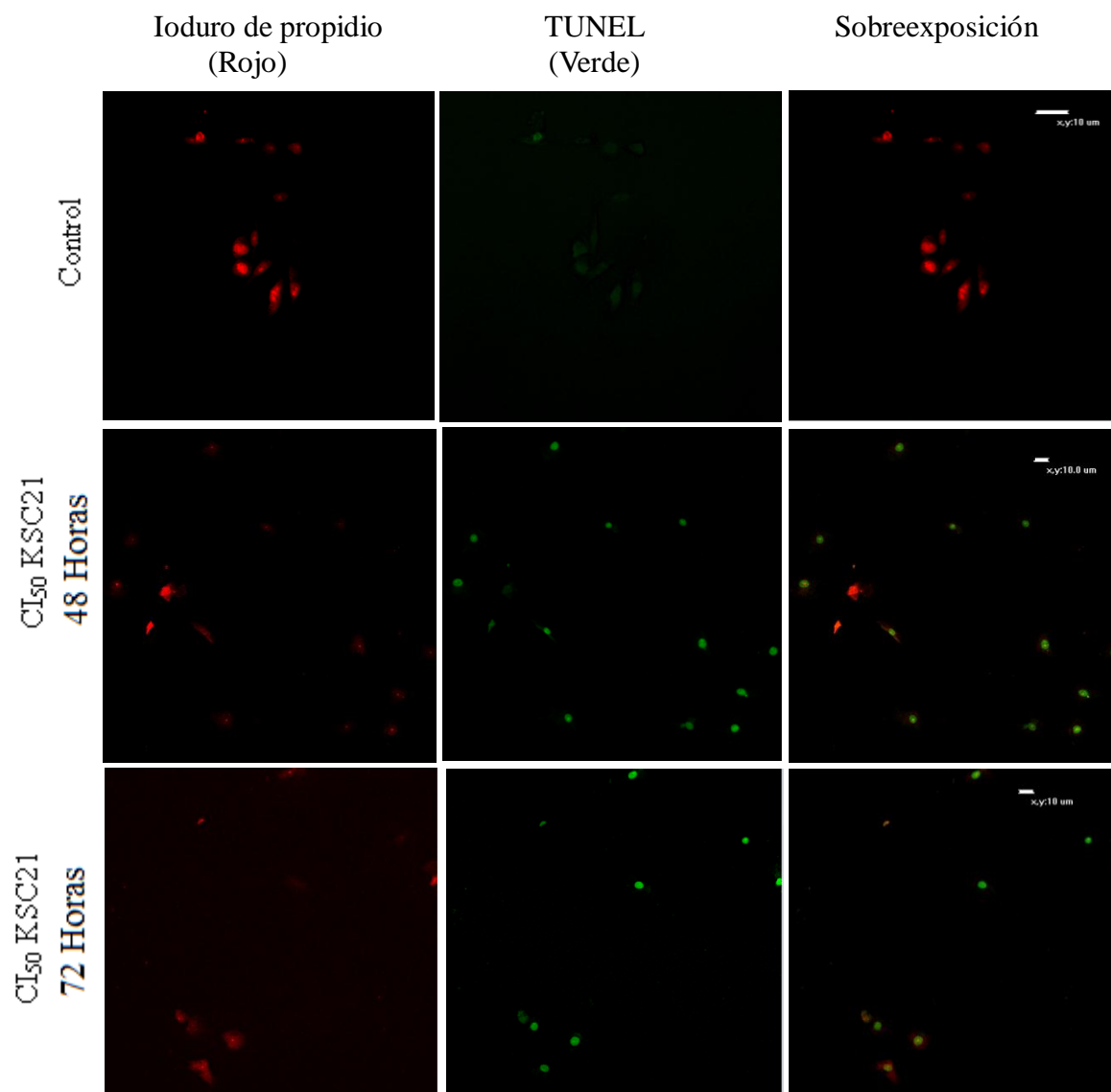


Figura 15. Evaluación de la fragmentación del ADN en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de la CI<sub>50</sub> del compuesto KSC-21 (3,60 μM), mediante el ensayo de TUNEL. Se empleó como control positivo la estaurosporina 0,1 μM.

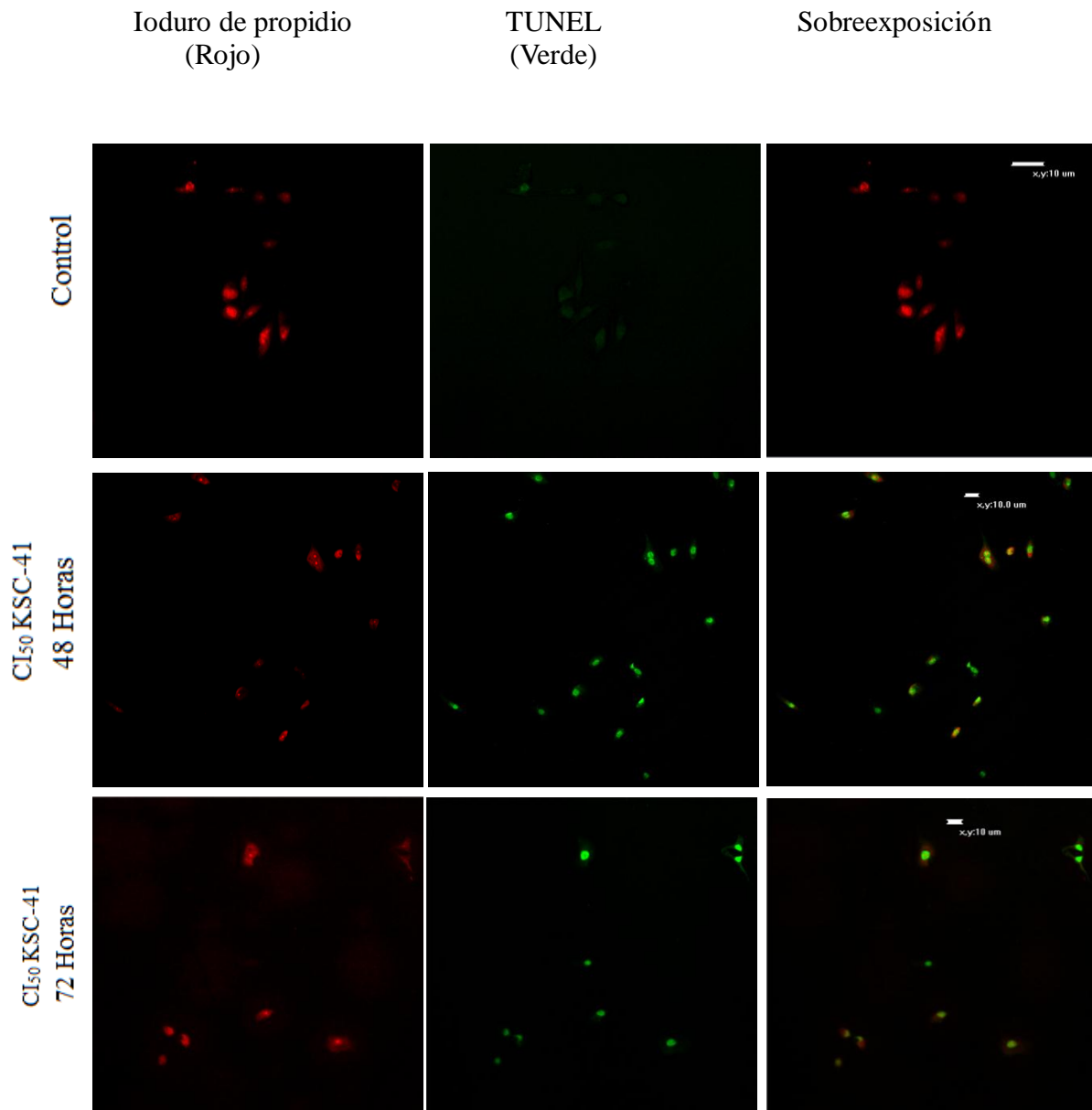


Figura 16. Evaluación de la fragmentación del ADN en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de la CI<sub>50</sub> del compuesto KSC-41 (6,42 μM), mediante el ensayo de TUNEL. Se empleó como control positivo la estaurosporina 0,1 μM.

#### **5.4 Determinación de la actividad de Caspasa 3 y 7 en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.**

Las caspasas son proteínas que están estrechamente relacionadas con el proceso apoptótico, ya que en el caso de las caspasas efectoras las caspasas 3 y 7 son las que median los pasos finales de ejecución de la apoptosis, por lo que se determinó su actividad en la línea celular bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.

El ensayo triple ApoTox-Glo permitió determinar simultáneamente la viabilidad, citotoxicidad y la actividad de caspasas 3/7 de los compuestos KSC-21 y KSC-41 sobre la línea celular PC3.

Para ello se realizaron tratamientos de la línea celular PC3 con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 y el KSC-41, 3.60  $\mu$ M y 6.42  $\mu$ M, respectivamente durante 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación en primer lugar se midió la fluorescencia en el fluorímetro para determinar la citotoxicidad y la viabilidad. Los valores de fluorescencia obtenidos se transformaron en porcentajes de citotoxicidad y viabilidad celular con respecto al control para cada uno de las horas de tratamiento.

En la Figura 17 se observó a las 24 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21 un 18 % de citotoxicidad sobre la línea celular PC3 con respecto al control, en el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41, este presentó un 9 % de citotoxicidad sobre las células PC3 con respecto al control, es decir, hay un incremento de la citotoxicidad del compuesto sobre las células PC3, el análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los

tratamiento y el control, es decir, que ambos compuestos a las 24 horas de tratamiento no presentaron un efecto sobre la célula tumoral. El compuesto KSC-21 a las 48 horas de tratamiento presentó sobre la línea celular PC3 un 37 % de toxicidad celular, mientras que bajo el tratamiento con el compuesto KSC-41 presentó un 40 % citotoxicidad, ambos con respecto al control, es decir, hay un aumento de la citotoxicidad en las células PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41. Por último a las 72 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21 la línea celular PC3 presentó un 82 % de citotoxicidad, en el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41 presentó un 70 % de toxicidad celular, ambos con respecto al control, hay un aumento de la citotoxicidad en la línea celular tumoral bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41. Al realizar el análisis estadístico se encontró que existen diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre los tratamientos y el control, por lo tanto, a partir de las 24 horas de tratamientos ambos compuestos presentan un efecto citotóxico significativo sobre la línea celular PC3. A medida que aumenta el tiempo de incubación de células PC3 con los compuestos KSC-21 y KSC-41, aumenta el porcentaje de citotoxicidad en células PC3, de manera significativa.

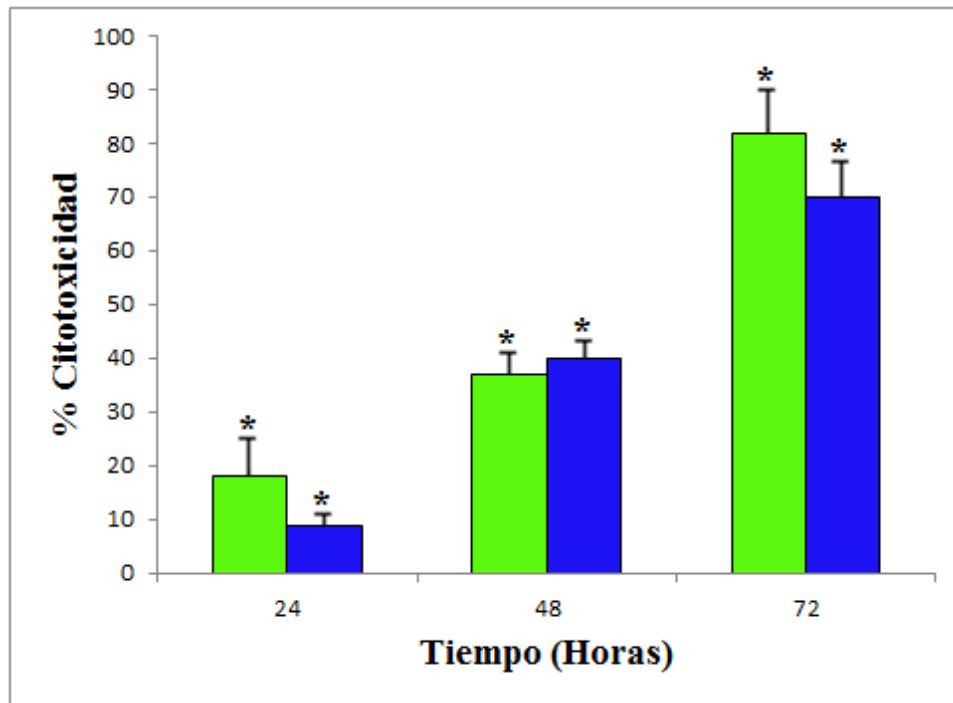


Figura 17. Porcentaje de citotoxicidad en células PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41. Células PC3 fueron tratadas con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 (verde) y KSC-41 (azul), 3.60  $\mu$ M y 6.42  $\mu$ M, respectivamente, durante 24, 48 y 72 horas. \*  $p < 0,001$ . Control positivo estaurosporina 0,1  $\mu$ M, control negativo ionomicina 100 nM.

Para el caso de la evaluación de la viabilidad celular (Figura 18) se observó a las 24 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21 un 86 % de viabilidad celular de la línea celular PC3, en el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41 un 96 % de viabilidad celular, con respecto al control, es decir, hay una disminución de la de la viabilidad de las células PC3 bajo el efecto de dicho compuesto. Al realizar el análisis estadístico se encontró que existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre el tratamiento con el compuesto KSC-21 y el control, es decir, la viabilidad de la línea celular PC3 a las 24 horas de tratamiento disminuye por efecto del compuesto; mientras que al comparar el control y tratamiento con el compuesto KSC-41 no se

encontró diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), es decir, la viabilidad celular no disminuyó, el compuesto KSC-41 no tuvo efecto significativo sobre la viabilidad celular de las células tumorales a las 24 horas. La línea celular PC3 a las 48 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21 presentó un 41 % de viabilidad celular; mientras que bajo el tratamiento con el compuesto KSC-41 presentó un 39 % de viabilidad celular, con respecto al control, es decir, hay una disminución de la viabilidad celular de las células PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41. Por último a las 72 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21, las células PC3 presentaron un 27 % de viabilidad celular, en el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41 presentó un 26 % de viabilidad celular, es decir, hay una disminución de la viabilidad celular de la línea celular PC3 bajo el efecto de dichos compuestos. El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los tratamientos y el control, es decir, a las 48 y 72 horas de tratamientos ambos compuestos presentaron un efecto significativo sobre la viabilidad celular. De manera significativa, a medida que aumentó el tiempo de incubación de las células PC3 con los compuestos KSC-21 y KSC-41, disminuyó la viabilidad.



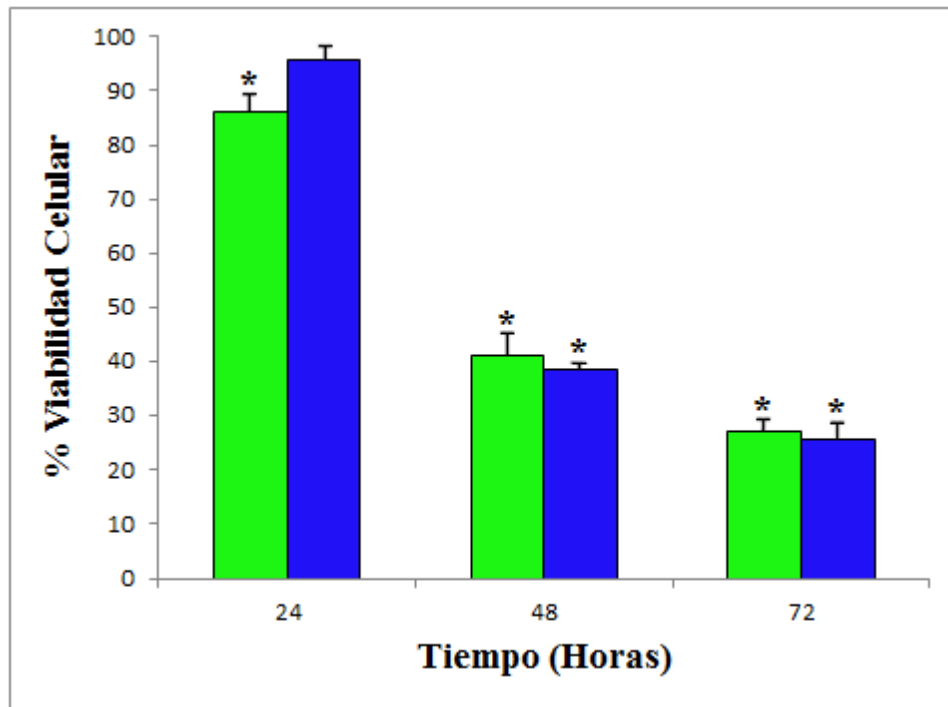


Figura 18. Porcentaje de viabilidad celular en la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41. La línea celular tumoral PC3 se trató con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 (verde) y KSC-41 (azul),  $3.60 \mu\text{M}$  y  $6.42 \mu\text{M}$ , respectivamente, durante 24, 48 y 72 horas. \*  $p < 0,001$ . Control positivo estaurosporina  $0,1 \mu\text{M}$ , control negativo ionomicina  $100 \text{ nM}$ .

Posteriormente se midió la luminiscencia con el fin de determinar la actividad de caspasa 3/7. Los valores de luminiscencia obtenidos se transformaron en porcentajes de actividad de caspasa 3/7 con respecto al control para cada uno de las horas de tratamiento.

Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41 presento actividad de caspasas 3/7. En la Figura 19 se observó a las 24 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21, las

células PC3 presentaron un 123 % de actividad de caspasa 3/7, mientras que bajo el tratamiento con el compuesto KSC-41, la línea celular presentó un 141 % de actividad de caspasa 3/7, es decir, hay un aumento de la actividad de caspasa 3/7 en la línea celular tumoral bajo el efecto de dichos compuestos. La línea celular PC3 a las 48 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21 presentó un 184 % de actividad de caspasa 3/7, mientras que bajo el tratamiento con el compuesto KSC-41 presentó un 44 % de actividad de caspasa 3/7. Al realizar el análisis estadístico se encontró que existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los tratamiento y el control, es decir, que ambos compuestos a las 24 y 48 horas de tratamiento aumentan significativamente la actividad de caspasas 3/7 en las células tumorales. A las 72 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21, la línea celular PC3 presentó un 291 % de actividad de caspasas 3/7, en el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41 presentó un 23 % de actividad de caspasas 3/7, al realizar el análisis estadístico se encontró que existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre el tratamiento con el compuesto KSC-21 y el control, de igual forma a las 72 horas de tratamientos este compuesto presenta un aumento significativo de la actividad de caspasas 3/7 en la línea celular PC3; en cambio al comparar el tratamiento con el compuesto KSC-41 y el control no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

En el caso del tratamiento con el compuesto KSC-21, a medida que aumento el tiempo de incubación de la línea celular PC3 con dicho compuesto, aumento significativamente la actividad de caspasas 3/7 en la línea celular PC3; por el contrario en el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41 a medida que aumento

el tiempo de incubación de la línea celular PC3 con dicho compuesto, disminuyó la actividad de caspasas 3/7 en la línea celular PC3, de manera significativa.

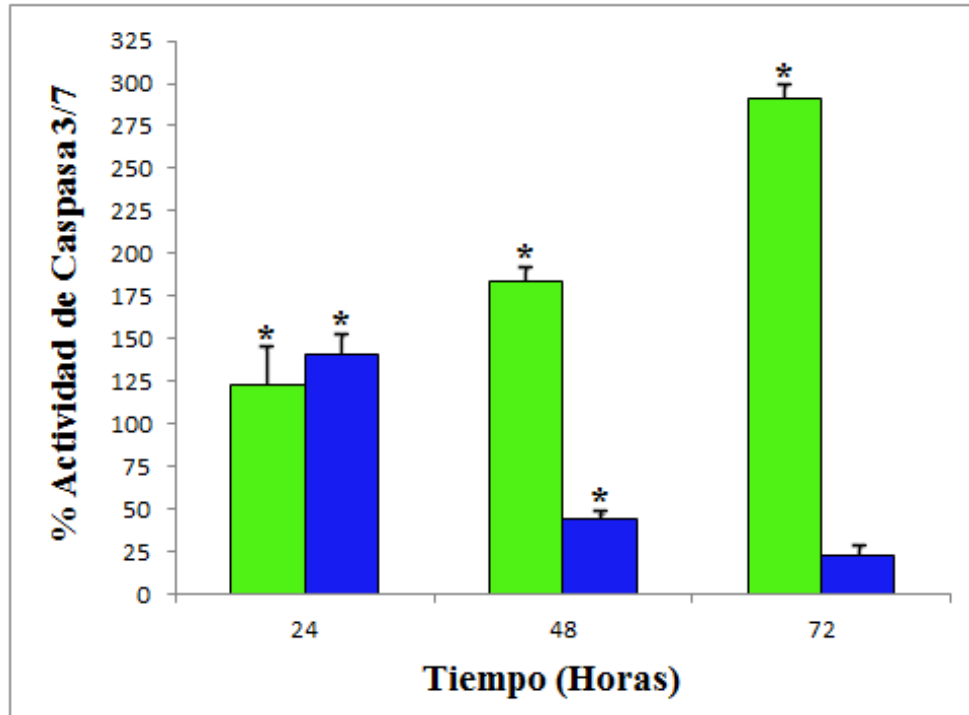


Figura 19. Porcentaje de actividad de caspasas 3/7 en la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41. Células PC3 se trataron con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 (verde) y KSC-41 ( $\square$ ), 3.60  $\mu$ M y 6.42  $\mu$ M, respectivamente, durante 24, 48 y 72 horas. \*  $p < 0,001$ . Control positivo estaurosporina 0,1  $\mu$ M, control negativo ionomicina 100 nM.

### 5.5 Evaluación de cambios en el potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) a través de citometría de flujo en la línea celular tumoral PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.

La vía intrínseca es una de las vías de activación de la apoptosis, una de las características de esta vía es la despolarización de las membranas mitocondriales, lo que trae como consecuencia una disminución en el potencial de membrana

mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). En base a esto se realizó una evaluación en el cambio del potencial mitocondrial mediante citometría de flujo.

Para ello se realizaron tratamientos de la línea celular PC3 con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 y el KSC-41, 3.60  $\mu\text{M}$  y 6.42  $\mu\text{M}$ , respectivamente durante 6, 16, 24 y 48 horas. Transcurrido el tiempo de tratamiento se realizó el ensayo y se analizaron las muestras en el citómetro de flujo y posteriormente mediante el uso del software WinMDI versión 2.9 se obtuvieron los histogramas para cada una de las muestras. Como control positivo se empleó la valinomicina a 20 nM. Se realizaron tres réplicas de cada tiempo.

Al analizar los histogramas con el programa WinMDI 2.9, se pudo observar que al comparar los tratamientos con los compuestos KSC-21 y KSC-41 con el control (células sin tratamiento) a las 6 horas de tratamiento, la fluorescencia se mantuvo igual que el control, es decir, que el potencial mitocondrial de la células bajo los tratamientos con los compuestos KSC-21 y KSC-41 no presento cambios. A las 16 horas de tratamiento con los compuestos KSC-21 y KSC-41 se observó con respecto al control, que la fluorescencia se desplazó hacia la derecha. Este desplazamiento aumento a medida que incremento las horas de tratamiento (24 y 48 horas) con dichos compuesto, es decir, que el potencial mitocondrial aumento como consecuencia de la hiperpolarización de la membrana mitocondrial. (Figura 20).

Los valores obtenidos de las medias de los picos de fluorescencia de cada uno de los tratamientos con los compuestos KSC-21 y KSC-41 a las distintas horas se transformaron en porcentajes de potencial mitocondrial con respecto al control.

En la Figura 21 se puede observar que a las 6 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21, la línea celular PC3 presento un -1 % de potencial mitocondrial. En el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41 la línea celular PC3 presento un -2 % de potencial mitocondrial, ambos con respecto al control. Al realizar el análisis estadístico no se encontró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los tratamiento y el control, es decir, que a las 6 horas de tratamientos los compuestos no tienen ningún efecto significativo sobre el potencial mitocondrial de la línea celular PC3. A las 16 horas de tratamiento con el compuesto KSC-21, la línea celular PC3 presento un 27 % de potencial mitocondrial, mientras que con el compuesto KSC-41 presento un 10 %, ambos con respecto al control. Al realizar el análisis estadístico se encontró que existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los tratamiento y el control, es decir, ambos compuestos tienen un efecto significativo sobre el potencial mitocondrial de la línea celular PC3 a las 16 horas de tratamiento. De igual forma a las 24 y 48 horas de tratamiento con los compuestos KSC-21 y KSC-41 se observó que el porcentaje de potencial mitocondrial aumento con respecto al control, de manera significativa.

Además se obtuvo que existen diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los tratamientos a las 6, 24 y 48 horas, por lo tanto, a medida que aumentó el tiempo de incubación de la línea celular PC3 con los compuestos KSC-21 y KSC-41, aumentó el porcentaje de potencial mitocondrial como consecuencia de la hiperpolarización de la membrana mitocondrial. Al comparar los tratamientos a las 16 y 24 horas no se encontró diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Esto puede deberse a que el intervalo

de tiempo entre los tratamientos fue muy corto como para presentar una diferencia relevante.

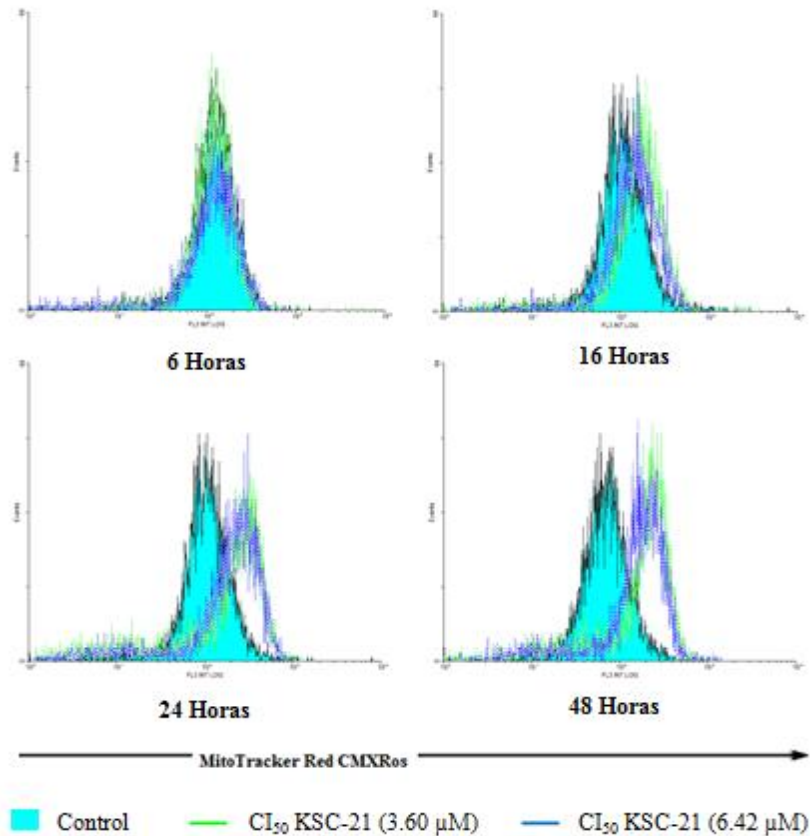


Figura 20. Evaluación de cambios en el potencial mitocondrial de la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41. La línea celular tumoral PC3 se trató con la CI<sub>50</sub> de los compuestos KSC-21 y KSC-41, 3.60 μM y 6.42 μM, respectivamente, durante 6, 16, 24 y 48 horas. Los histogramas representan los picos máximos de fluorescencia del MitoTracker Red CMXRos para cada uno de los tratamientos. El control positivo que se empleó fue la valinomicina a una concentración de 20 nM.

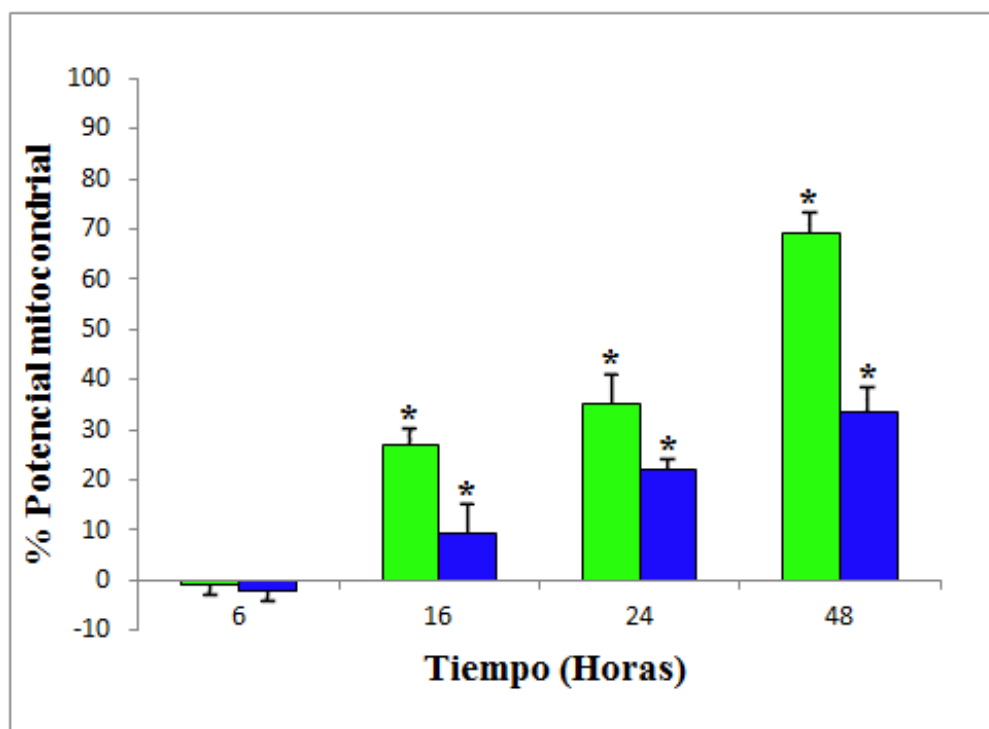


Figura 21. Porcentaje de potencial mitocondrial de la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41. La línea celular tumoral PC3 se trató con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 (verde) y KSC-41 (azul),  $3.60 \mu\text{M}$  y  $6.42 \mu\text{M}$ , respectivamente, durante 6, 16, 24 y 48 horas. \*  $p < 0,001$ . Control positivo valinomicina 20 nM.

### 5.6 Inmunodetección de proteínas claves en la activación de la apoptosis

De manera de dilucidar el mecanismo de regulación de la apoptosis inducida en la línea celular PC3 bajo el efecto de los de los compuestos KSC-21 ( $3.60 \mu\text{M}$ ) y KSC-41 ( $6.42 \mu\text{M}$ ), durante 16, 24, 48 y 72 horas, se realizó la evaluación del patrón de expresión de proteínas claves en la activación de la apoptosis, mediante Western blot. Las proteínas que se inmunodetectaron fueron: Bax (21 kDa), Bcl-2 (26 kDa), Bcl-xL (30 kDa), AIF (54 kDa), AKT (62 kDa) y Survivina (16.5 kDa).

La extracción de proteínas de cada uno de los tratamientos junto con la inmunodetección permitió revelar la presencia de las proteínas involucradas en el proceso apoptótico. Los extractos fueron separados mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando geles entre 10-12 % dependiendo del peso molecular de la proteína que se quería visualizar y transferidas a una membrana para realizar la inmunodetección. En todas las membranas se realizó la inmunodetección de a la proteína GAPDH (37 kDa), de manera de garantizar similitud de carga en todos los tratamientos.

En el caso del tratamiento con el compuesto KSC-21 (Figura 22), se determinó que las proteínas: Survivina y AKT1, fueron las que presentaron cambios evidentes. Los niveles de expresión de dichas proteínas disminuyeron. A partir de las 16 horas se observó un cambio en los niveles de expresión de survivina, el cual disminuye con respecto a su control, a medida que aumento el tiempo de incubación con el compuesto. A partir de las 24 horas se observó que los niveles de expresión de AKT disminuyeron en el tiempo a medida que aumentó el tiempo de incubación con el compuesto. El análisis densitométrico confirmó este resultado. Por otra parte no se observó cambios relevantes en el patrón de expresión de las proteínas Bax, Bcl-2, Bcl-xL y AIF.

Para el tratamiento con el compuesto KSC-41 (Figura 23), se determinó que la proteína Survivina fue la que presentó un cambio evidente en los niveles de expresión. A partir de las 16 horas se observó que los niveles de expresión de esta proteína disminuyeron, con respecto a su control, a medida que aumentó el tiempo de incubación con el compuesto. Mientras que la proteína AKT1 presentó una



disminución en los niveles de expresión a partir de las 24 horas. El análisis densitométrico confirmó este resultado. Por otra parte no se observó cambios relevantes en el patrón de expresión de las proteínas Bax, Bcl-2, Bcl-xL y AIF.

En la Figura 22 y 23, se observa la inmunodetección de la proteína GAPDH, demostrando que no hubo diferencias entre las cargas de los distintos tratamientos.

Estos resultados parecen indicar que los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen apoptosis en la línea celular PC3 mediante una vía distinta a la vía intrínseca, ya que no se encontró cambios en los niveles de expresión de las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas de la familia de proteínas Bcl-2, mientras que los niveles de expresión de las proteínas Survivina y AKT1 sí fueron afectados, lo que indica que ambos compuestos podrían actuar sobre la vía de señalización PI3K/AKT, la cual regula la expresión de la Survivina, sensibilizando así la activación de la apoptosis.

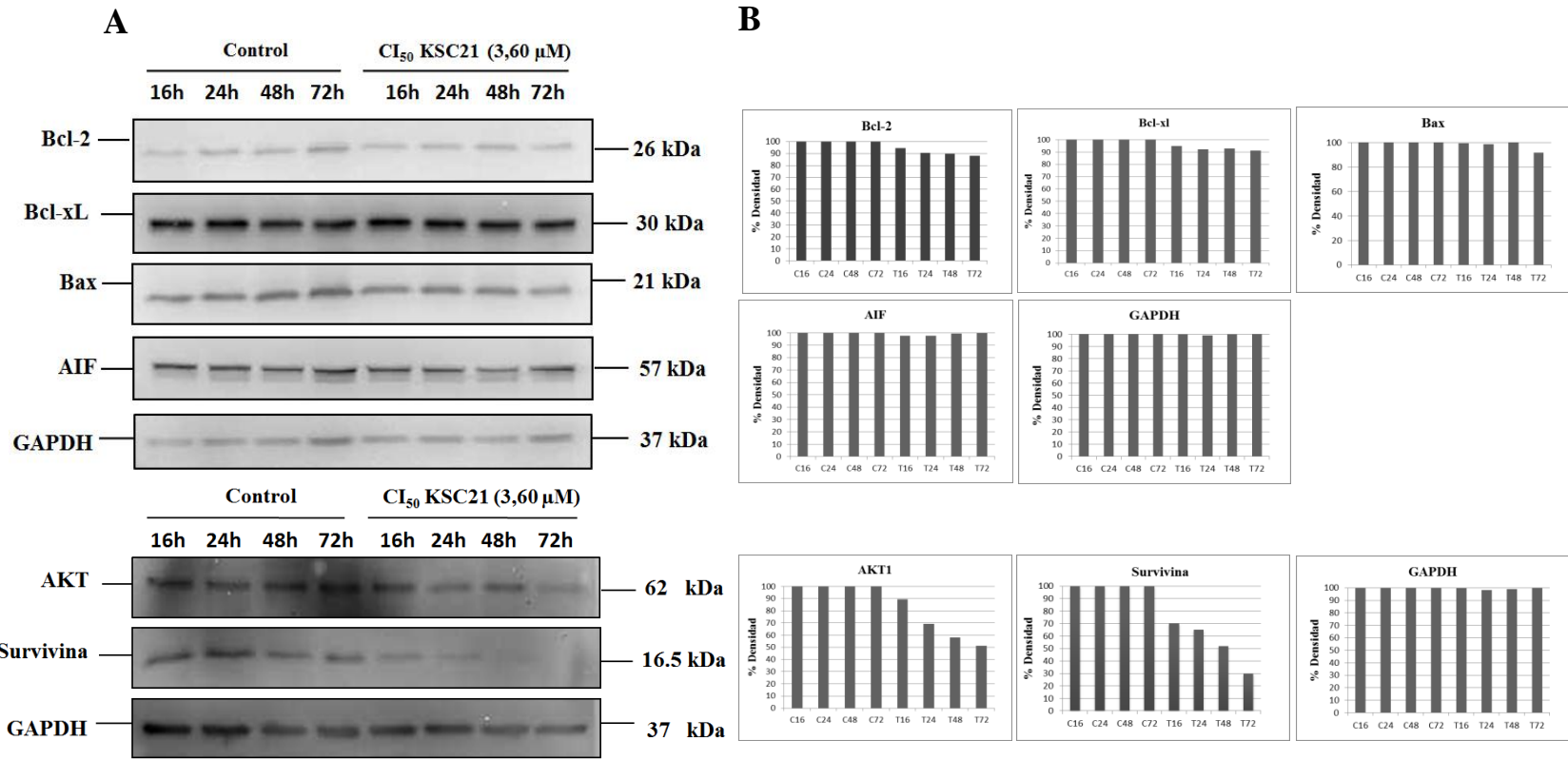


Figura 22. Análisis del patrón de expresión de proteínas de la ruta de apoptosis en la línea celular PC3 bajo el efecto del compuesto KSC-21, mediante Western blot. Células PC3 se trataron con la CI<sub>50</sub> del compuesto KSC-21 (3.60 μM), durante 16, 24, 48 y 72 horas. Panel A. Western Blot de las proteínas: Bcl-2, Bcl-xL, Bax, AIF, Survivina y AKT1. La proteína GAPDH se empleó como control de carga. Panel B. Análisis densitométrico de la intensidad de cada una de las bandas obtenidas en los Western blots, las cuales fueron normalizadas por el valor de la intensidad de la banda correspondiente al control (GAPDH).

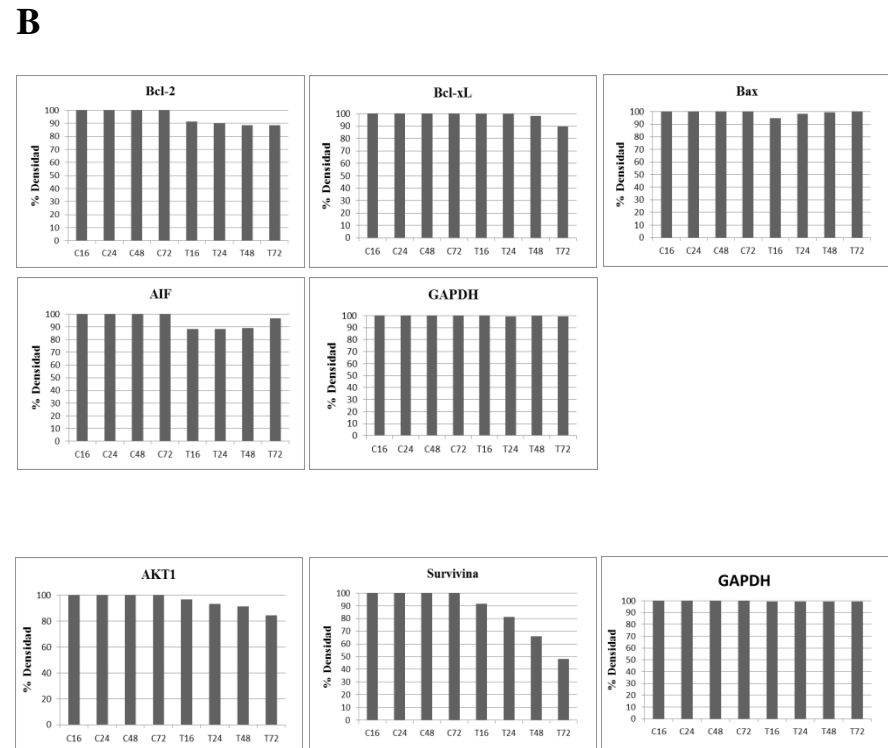
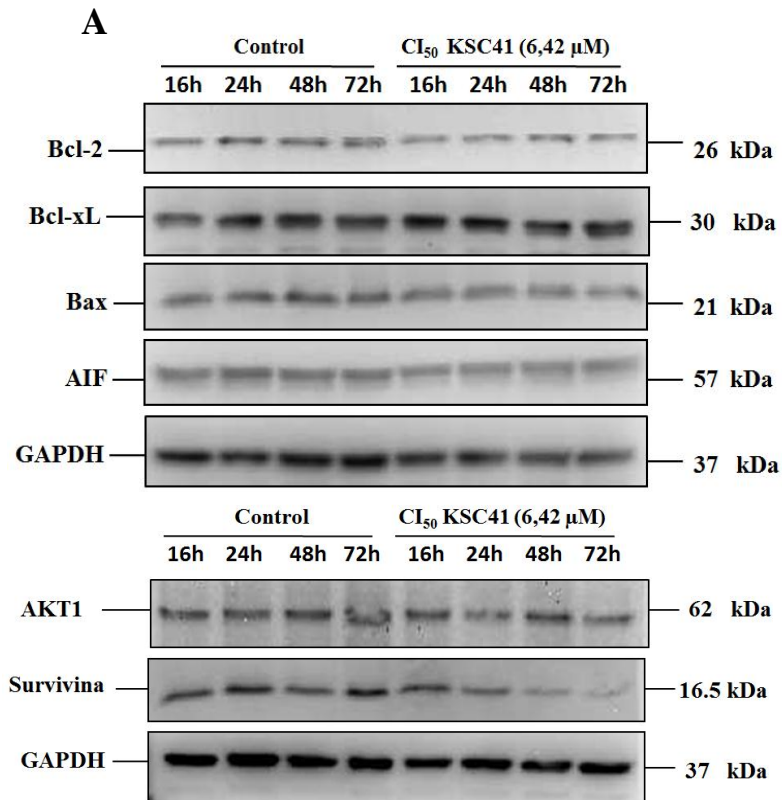


Figura 23. Análisis del patrón de expresión de proteínas de la ruta de apoptosis en la línea celular PC3 bajo el efecto del compuesto KSC-41, mediante Western blot. Células PC3 se trataron PC3 se trató con la CI<sub>50</sub> del compuesto KSC-41 (6,42 μM), durante 16, 24, 48 y 72 horas. Panel A. Western Blot de las proteínas: Bcl-2, Bcl-xL, Bax, AIF, Survivina y AKT1. La proteína GAPDH se empleó como control de carga. Panel B. Análisis densitométrico de la intensidad de cada una de las bandas obtenidas en los Western blots, las cuales fueron normalizadas por el valor de la intensidad de la banda correspondiente al control (GAPDH).

## 6. DISCUSIÓN

---

Debido a la alta toxicidad y a la multi-resistencia de las drogas citotóxicas utilizadas actualmente, además de los programas de desarrollo de fármacos estándares, cada vez se da más énfasis al desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos con propiedades antitumorales obtenidos a partir de plantas o derivados de estos (sintéticos). En la actualidad, existen evidencias clínicas de las propiedades inmunomoduladoras y antitumorales de un gran número de productos obtenidos de plantas o sintéticos que presentan menor toxicidad que los tratamientos empleados hoy en día (Sawyers, 2003; Shukla, 2004; Takaray y col. 2005).

Los estudios científicos en cuanto a la búsqueda de nuevos productos naturales o sintéticos se han convertido progresivamente en un campo interdisciplinario que comprende áreas tan diversas como la botánica, química, bioquímica, medicina, farmacología, entre otras (Arvelo y col., 2008).

El potencial terapéutico de los fármacos antitumorales derivados de plantas puede deberse a una variedad de mecanismos, entre ellos: inducción de muerte celular, inhibidor de proteasas, anti-inflamatorios, entre otros (Hidalgo y Eckhart, 2001).

Aunque un buen número de fármacos contra el cáncer han sido obtenidos a partir de plantas o sus derivados, hallar un fármaco con bajos efectos secundarios y sitio específico sigue siendo un reto. El principal inconveniente con este tipo de agentes es la toxicidad que viene asociada a ellos, debido a su falta de especificidad, ya que estos eliminan no solo a las células malignas sino también a las células sanas

(Kouznetsov y col. 2010). Es por ello que un fármaco anticancerígeno exitoso debe provocar la muerte o incapacitar a las células cancerosas sin causar un daño excesivo a las células normales. Esta situación ideal se puede lograr mediante la inducción de la apoptosis en las células tumorales. La viabilidad de células tanto normales como tumorales se ve afectada significativamente por la regulación de apoptosis. Así, el control de la apoptosis puede ser útil en el tratamiento y la terapia o prevención del cáncer (Taraphdar y col. 2001).

Los tratamientos tumorales convencionales han mejorado notablemente durante las últimas décadas, pero sigue siendo necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas suplementarias y complementarias. Los objetivos terapéuticos en oncología son aumentar la supervivencia de los pacientes y evitar a toda costa los efectos secundarios que deterioran su calidad de vida. El tratamiento médico del cáncer en el futuro debe asentarse sobre bases racionales del conocimiento de la proliferación, diferenciación y apoptosis.

En este contexto de búsqueda de nuevos fármacos terapéuticos para el tratamiento del cáncer se realizó el estudio de la capacidad apoptogénica de una serie estructural de compuestos semi-sintéticos en la línea celular PC3, así como también identificar los grupos funcionales, que presentaron mayor actividad citotóxica, de acuerdo a las modificaciones químicas que se emplearon para obtener la serie de compuestos semi-sintéticos a partir de la Caracasina.

## **6.1 Citotoxicidad de la serie estructural de los compuestos estudiados en la línea celular PC3**

En primer lugar se evaluó el efecto citotóxico de la serie estructural de compuestos semi-sintéticos en la línea celular PC3, luego de la exposición de las células a concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos.

Hoy en día los fármacos son moléculas químicas capaces de inducir un efecto en un sistema biológico (Velazco y col., 1996), esto se debe a la interacción con componentes macromoleculares del organismo, por otro lado, la actividad que posee un fármaco ya sea natural o sintético estará determinada por la afinidad por su receptor y el grado de actividad intrínseca dependerá de su estructura química.

Suárez y col., en el 2009 encontraron que los kauranos, una serie de diterpenos con estructuras muy singulares en la especie de la familia Euphorbiaceae, exhiben un amplio rango de actividades biológicas, entre ellas actividad antitumoral y antiinflamatoria.

En este estudio se evaluó la posible propiedad antitumoral de esta familia tomando para ello uno de los compuestos aislado de flores de la especie *Crotón micans*, identificado como Caracasina (Suárez y col., 2003), así como también una serie de compuestos semi-sintéticos obtenidos a partir del mismo. Estos presentan una unidad básica de seco-ent-kaurano con pequeñas modificaciones de grupos específicos que determinaron la actividad sobre la línea celular tumoral PC3 y sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos.

Para realizar dicho estudio se realizaron ensayos de citotoxicidad, los cuales son ampliamente utilizados especialmente en el campo de desarrollo de nuevos medicamentos. El Instituto Nacional del Cáncer estadounidense (NCI), así como la industria farmacéutica han desarrollado ensayos de microtitulación de rápido rendimiento para detectar nuevos agentes citotóxicos. Estos ensayos miden el efecto de un fármaco sobre el crecimiento de una población de células y el punto final es una estimación del número de células viables. Por primera vez en la década de 1980, se informó acerca del uso de un colorante de tetrazolio (MTT) como medida indirecta del número de células viables (Mosman, 1983). El NCI evaluó la reducción del colorante MTT como un posible punto final en un ensayo de selección rápida (Alley, y col. 1988), y esto estimuló el interés en la comunidad científica en general.

El ensayo se basa en el uso de células en la fase exponencial de crecimiento, las cuales están expuestas a un fármaco citotóxico, donde la duración de la exposición se determina por lo general como el tiempo requerido para el máximo daño que ocurra, pero también está influenciada por la estabilidad del fármaco. El número de células supervivientes se determinan indirectamente por reducción del colorante MTT (Liu y col. 1997).

A partir de este ensayo se pueden realizar curvas dosis-respuesta, las cuales son uno de los medios utilizados para estudiar la actividad farmacológica de algún compuesto, estas permiten cuantificar o estimar el efecto de una dosis aplicada a las células y proporciona la medida de la magnitud de la actividad del compuesto en una dosis determinada (Goodman y Gilman, 2001).

Además de la calidad del producto administrado a las células, es importante mencionar que en la supervivencia celular influye decisivamente la tasa o distribución temporal de la dosis absorbida. Prácticamente todos los agentes quimioterapéuticos entran en la célula por difusión pasiva, por lo que de manera general, cuanto menor sea la dosis, menor será la posibilidad de actuación de los productos (Cordell y col., 1993). Entonces, para que uno de estos productos sintéticos realice una acción interesante desde el punto de vista farmacológico, debe tener un efecto diferencial a las concentraciones más bajas posibles. Por lo tanto, para un determinado tipo de células, en las curvas de viabilidad (dosis-respuestas) a medida que aumenta concentración de la dosis administrada disminuye la viabilidad o en otras palabras aumenta la inhibición de la proliferación celular. Esto se puede ver reflejado en las curvas dosis-respuesta obtenidas para cada uno de los compuestos en la línea celular tumoral PC3 y en los cultivos no tumorales, Figuras 12 y 13, donde a medida que aumentó la concentración del compuesto administrado incremento el porcentaje de inhibición de la proliferación celular. Se observó que a partir de las 24 horas hay una disminución secuencial de las células tratadas con respecto al control, lo que evidencia que los compuestos causan un efecto de inhibición de la proliferación muy notoria, a pesar de que las células tumorales se caracterizan por presentar una velocidad de proliferación mayor que las células no tumorales (Luque y Herraéz, 2002).

Por otro lado, también se puede considerar la potencia de un compuesto, ya que relaciona la cantidad o dosis administrada y la acción que produce. De esta manera se podría decir que un compuesto es tanto más potente que otro, cuanto



menor sea la dosis administrada en comparación con otro para conseguir la misma acción (Furones, 2002). En este caso se puede decir entonces que la serie de compuestos semi-sintéticos evaluados en la línea celular PC3 presentaron una menor potencia que la Caracasina (KSC-21), ya que las  $CI_{50}$  obtenidas para cada uno de ellos fueron mayores a la obtenida con la Caracasina. Mientras que sobre los cultivos primarios de fibroblastos los compuestos KSC-25, KSC-27, KSC-29, KSC-33 y KSC-43 presentaron una mayor potencia que la Caracasina (KSC-21), debido a que las  $CI_{50}$  obtenidas para cada compuesto fue menor a la que se obtuvo con la Caracasina (KSC-21), en cambio con los compuestos KSC-37, KSC-41 y KSC-45 se obtuvo el efecto contrario, presentaron una menor potencia que la Caracasina.

En nuestro estudio se observó un efecto diferente al aplicar los compuestos a los cultivos celulares empleados similar al estudio realizado por Ruíz y col., en el 2008, donde señalan que esta variabilidad en la sensibilidad frente a los distintos compuestos de un mismo grupo, en nuestro caso kauranos, puede estar relacionado con el hecho de que las células poseen dianas moleculares diferentes, a pesar de que los compuestos tengan un importante efecto citotóxico en las los cultivos celulares en estudio, pudiendo ser ésta la diferencia entre la línea celular PC3 y los cultivos primarios de fibroblastos en cuanto a la sensibilidad observada a la exposición de los compuestos.

Al comparar las  $CI_{50}$  de los compuestos en la línea celular PC3 y en los cultivos primarios de fibroblastos, se encontró que los compuestos KSC-21 y KSC-41 presentaron una mayor potencia en la línea celular PC3 que en los cultivos primarios de fibroblastos, es decir, presentaron un mayor efecto citotóxico y una notoria

inhibición de la proliferación celular en la línea celular tumoral que en los cultivos no tumorales, lo que puede estar relacionado probablemente con la activación de algún tipo de muerte celular (Danial y Korsmeyer, 2004; Sánchez y Benítez, 2006).

En estudios anteriores sobre las actividades biológicas de grupos de kauranos, ha sido centrada en su actividad citotóxica, en donde algunos ensayos han implicado la comprensión del mecanismo molecular subyacente contra el cáncer. El estudio de los mecanismos de acción sobre las células inicia conociendo la selectividad o relación del compuesto, la cual se define de acuerdo con la afinidad de un compuesto determinado por su sitio de unión. Este parámetro permite predecir su efecto terapéutico y sus efectos adversos potenciales. Debido a esto se puede decir que la selectividad está en función de los receptores celulares (Giang y col., 2003)

Todos los compuestos incluyendo fármacos y productos naturales terapéuticos deben ser selectivos, actuando únicamente sobre aquellos receptores celulares específicos para ellos, por lo que se puede observar diferentes valores de relación de un grupo de compuestos frente a diferentes cultivos celulares (Flórez y col., 2008). Se puede decir con esto que los compuestos KSC-21 y KSC-41 son más efectivos hacia las células PC3, ya que presentan los valores de relación más altos, lo que significa que el efecto sobre los cultivos no tumorales es menor en comparación con los cultivos tumorales, generando un riesgo menor contra las células normales.

De acuerdo a los valores de relación obtenidos para los compuestos KSC-21 y KSC-41 entre las  $CI_{50}$  en la línea celular PC3 y en los cultivos primarios de fibroblastos, Tabla 4, se encontró, en el caso del compuesto KSC-21 que se necesita 3.36 veces la  $CI_{50}$  obtenida en la línea celular PC3 para conseguir la misma acción en

los cultivos primarios de fibroblastos, mientras que en el caso del compuesto KSC-41 se necesita 3.84 veces la  $CI_{50}$  obtenida en la línea celular PC3 para conseguir la misma acción en los cultivos primarios de fibroblastos.

Los compuestos KSC-21 y el KSC-41 presentaron una mayor citotoxicidad sobre la línea celular tumoral PC3 que sobre los cultivos primarios de fibroblastos; estos últimos se ven menos afectados por la acción de los compuestos. Esto puede deberse a la presencia del gen p53, el cual codifica para la proteína p53, la cual permite a los fibroblastos reparar los daños que sufre el ADN, inducido por diversos factores pudiendo ser uno de ellos la administración del producto natural, para finalmente proteger así a las células del efecto tóxico de los compuestos (Ford y col.,2003).

Para entender los procesos involucrados en la actividad observada por parte de los kauranos se les atribuye el efecto sobre las células específicamente a su estructura química, lo que se demuestra al comparar nuestros resultados, evidenciándose que el aumento o disminución en la actividad citotóxica se debe en gran medida a los cambios de grupos funcionales en la estructura de los compuestos (Sylvestre y col., 2006).

En esta parte del estudio, para poder evaluar los cambios de los diferentes compuestos, nos referimos a sus estructuras químicas para identificar la acción de los grupos funcionales presentes así como su posible relación con el efecto que generan. El compuesto base, Caracasina (KSC-21), presenta un grupo metilo en el carbono 3, es decir, (grupo funcional éster), en el carbono 15 un grupo carbonilo (grupo funcional cetona) y en el carbono 4 un grupo vinilo. Este compuesto presento el

mayor efecto citotóxico en la línea celular PC3 y es tomado en cuenta como la molécula patrón, a partir de la cual se realizaron comparaciones de las estructuras de los compuestos. En el caso de los compuestos KSC-25, KSC-33, KSC-29, KSC-27, en los cuales cambia la naturaleza y el tamaño del éster, se observó que los valores de  $CI_{50}$ , de acuerdo al orden mencionado anteriormente, incrementan a medida que aumenta el tamaño del éster no solo sobre la línea celular tumoral PC3 sino también en los cultivos primarios de fibroblastos, es decir, las modificaciones estructurales a las cuales fue sometido el compuesto previo a la acción sobre las células aumenta el tamaño del éster y disminuye la solubilidad de los compuestos (Carey, 2006), lo que implica una disminución de la citotoxicidad de los mismos con respecto al compuesto base. Cabe destacar que la presencia del grupo funcional éster le confiere al compuesto la facilidad de hidrolizarse, es decir, la molécula al estar en medio acuoso va a formar diferentes estructuras a partir de la molécula inicial, lo que implica que el aumento en el tamaño del éster afecta dicha propiedad; una excepción de este grupo es el compuesto KSC-43, en el cual aumenta el tamaño del éster, debido a la presencia de un grupo “Bencilo”, hidrocarburo aromático y, a pesar de su tamaño, disminuye la solubilidad del compuesto, sin embargo presenta una mayor toxicidad (Carey, 2006). El compuesto KSC-37 presentó la citotoxicidad más baja no solo en la línea celular PC3 sino también en los fibroblastos. En lo referente a su estructura, esto puede estar relacionado con la presencia de dos grupos hidroxilos; en los alcoholes hay un átomo de hidrogeno unido a uno de los elementos más electronegativos, el oxígeno. Los electrones que intervienen en el enlace están más atraídos por el oxígeno que por el hidrogeno. Esto da como resultado la formación de una ligera

carga negativa sobre el oxígeno y una similar carga positiva sobre el hidrogeno. Esta diferencia hace que en los alcoholes se presenten puentes o enlaces de hidrogeno entre las moléculas, lo que genera una alta solubilidad en agua, que a su vez permite no solo formar puentes de hidrogeno consigo mismo sino también con el agua (Carey, 2006), lo que podría explicar los altos valores de  $CI_{50}$  obtenidos en ambas cultivos celulares bajo el efecto de este compuesto. El compuesto KSC-41 presento una mayor citotoxicidad en la línea celular PC3 que en los cultivos de fibroblastos esto puede estar relacionado con la presencia del epóxido (éter cíclico). Este grupo confiere al compuesto una alta capacidad para hidrolizarse y transformarse en diol (Wade, 2006), por lo que al encontrarse la molécula en contacto con el agua se van a formar diferentes estructuras a partir de la molécula del compuesto KSC-41, por lo que el efecto citotóxico observado puede ser el resultado de la acción de todas las moléculas resultantes en conjunto. Por último el en el caso del compuesto KSC-45 su efecto citotóxico se puede deber a la presencia del grupo diol, dos grupos de alcoholes solubles en agua (Wade, 2006).

Los compuestos KSC-21 y el KSC-41 mostraron cierto potencial antitumoral, debido a la actividad citotóxica que se obtuvo en la línea celular tumoral PC3, lo que abrió la posibilidad de evaluar si el efecto citotóxico observado en la línea celular tumoral era consecuencia de la activación de la apoptosis.

## **6.2 Los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen la translocación de la PS de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática en la línea celular PC3**

Las células viables mantienen una distribución asimétrica de diferentes fosfolípidos entre la cara interna y la cara externa de la membrana plasmática. Particularmente los fosfolípidos que contienen colina, fosfatidilcolina y esfingomiélin, se encuentran principalmente en la cara externa de la membrana plasmática mientras que los aminofosfolípidos, fosfatidiletanolamina y la PS, se encuentran en la cara interna de la misma, hacia el citoplasma (Bretscher, 1972).

La asimetría de los lípidos en la membrana plasmática de las células viables se mantiene por proteínas de membrana denominadas flipasas, las cuales facilitan la translocación de moléculas de lípidos entre ambas caras de la membrana plasmática (Higgins, 1994).

Además de mantener la asimetría, las flipasas se encargan de mantener la PS en la cara interna de la membrana plasmática de células viables y de translocarla a la cara externa de la misma una vez que el proceso apoptótico se activa. Durante la apoptosis la translocación de la PS permite que la célula pueda ser reconocida por los macrófagos y posteriormente ser fagocitada por los mismos (Fadok y col., 1992; Fadok y col., 1993).

Se ha reportado que la exposición de la PS en la superficie celular puede ser detectada por una proteína denominada Anexina V, la cual se une específicamente a

la PS en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  (Tait y col., 1989; Andree y col., 1990). Por ello, al estar unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en la superficie externa de la célula. La integridad de la membrana no se ve comprometida en las primeras etapas. La exposición PS parece durar desde la fase de ejecución temprana de la apoptosis hasta la fase final, formación de agregados celulares denominados cuerpos apoptóticos.

La exposición de la PS durante la apoptosis parece ser un fenómeno universal durante la apoptosis; no solo se limita a células de mamífero, sino también que ocurre en los insectos y células de plantas (O'Brien y col., 1997). Por lo tanto, la exposición de la PS aparece ser un evento exclusivo de la apoptosis en sí y es probable que constituya una parte integral de este proceso de muerte celular.

En vista de que la exposición de la PS en la superficie de la membrana externa de una célula es un proceso universal en las primeras etapas de la apoptosis, independiente de la especie, el tipo de célula o el sistema de inducción de apoptosis que se utilice, se realizó el ensayo de Anexina V, con el fin de determinar si los compuestos citotóxicos KSC-21 y KSC-41 inducen en la línea celular PC3, la pérdida de la asimetría de fosfolípidos en la membrana plasmática, translocando la PS a la superficie celular y con ello determinar si dichos compuestos tienen actividad apoptogénica.

Al realizar el ensayo de Anexina V, mediante citometría de flujo (Figura 14), se obtuvo que la línea celular PC3 bajo el tratamiento durante 24 horas con la  $\text{CI}_{50}$  de los compuestos KSC-21 y KSC-41, presentó marcaje con Anexina V

conjugada al fluorocromo Alexa fluor 488 (en el cuadrante F4) diferencial al obtenido con el control, es decir, las células PC3 bajo el tratamiento con los compuestos presentaron fluorescencia verde, lo que indica la presencia de la PS en la superficie celular, es decir, ambos compuestos promueven la pérdida de la asimetría de fosfolípidos en la membrana plasmática, mediante la translocación de la PS de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática. Cabe destacar que la Anexina V no es capaz de unirse a las células viables ya que la molécula no es capaz de penetrar en la bicapa de fosfolípidos (Devaux, 1991), como se observa en nuestros resultados en el cuadrante F3, donde las células no presentan marcaje, además se puede observar una disminución en el porcentaje de las células PC3 viables bajo el tratamiento con los compuestos. En las células muertas, sin embargo, la cara interna de la membrana está disponible, permitiendo la unión de Anexina V a la PS, ya que se pierde la integridad de la membrana plasmática. Para discriminar entre las células muertas y apoptóticas, se emplean moléculas fluorescentes que sean impermeables a la membrana y se unan al ADN, el yoduro de propidio (PI) es una de esas moléculas y se puede añadir simultáneamente a la suspensión celular, de esta manera se logró identificar en nuestros resultados en el cuadrante F1 y F2 el porcentaje de células no apoptóticas (células muertas) y células apoptóticas tardías, respectivamente. De esta manera, las células viables, apoptóticas y muertas se discriminaron en base al doble marcaje con Anexina V y PI, y se analizaron por citometría de flujo (Mattis y col., 1997).

Debido a que este fenómeno es un evento exclusivo de la apoptosis se puede decir entonces que los compuestos KSC-21 y KSC-41 promueven la activación de la



apoptosis en la línea celular tumoral PC3, después de 24 horas de tratamiento con la  $CI_{50}$  de los compuestos antes mencionados, debido a que inducen la translocación de la PS a la superficie de las células, la cual fue detectada por parte de la Anexina V. Cabe destacar que el compuesto KSC-21 activa la apoptosis con mayor eficiencia que el compuesto KSC-41, ya que el tratamiento con este último presentó un menor porcentaje de células apoptóticas.

### **6.3 Los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen en la línea celular tumoral PC3 la fragmentación del ADN**

La degradación de ADN nuclear en unidades nucleosomales es una de las características de la muerte celular apoptótica y se produce en respuesta a diversos estímulos de apoptosis en una amplia variedad de tipos de células (Earnshaw, 1995).

El ADN nuclear se escinde en segmentos de 50 a 200 kb en etapas tempranas de la apoptosis, escindiéndose más tarde en unidades nucleosomales. El tamaño de estos segmentos corresponde a la longitud de ADN que se enrolla alrededor de cada nucleosoma. Los nucleosomas, constituidos por un núcleo de histonas rodeadas por dos asas de ADN, son elementos estructurales de la cromatina. Durante la muerte inducida por la apoptosis se activan proteasas específicas que promueven la degradación de proteínas de los filamentos intermedios de la matriz nuclear como la lámina A y la lámina B, como la cromatina se encuentra adosada a estos filamentos, la degradación de estas proteínas de la matriz nuclear promueve la desorganización de la cromatina. La subsecuente activación de endonucleasas, dependientes de  $Ca^{+2}$ , que tienen acceso a las regiones del ADN entre cada

nucleosoma hidroliza el ADN generando fragmentos cuya longitud es un múltiplo del número de bases enrolladas en un nucleosoma (Vaux, 1993; Peitsch y col., 1994; Duke y col., 1996). Además de la fragmentación del ADN, los núcleos se condensan durante la apoptosis (Liu y col., 1998)

En base esto se realizó el ensayo de TUNEL, mediante microscopia confocal, con el fin de evaluar si los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen la fragmentación nucleosomal del ADN en la línea celular PC3, fenómeno que está relacionado con el proceso apoptótico. El TUNEL es una de las técnica más comúnmente utilizada para cuantificar la apoptosis en tejidos que han sido fijados (Rao y col., 1998; Whiteside y col., 1998; Whiteside y Munglani, 1998) (Gavrieli y col., 1992; Willingham, 1999; Alfaro y col., 2000)

Los resultados obtenidos (Figuras 15 y 16) demostraron que los tratamientos a las 48 y 72 horas con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 y KSC-41 presentaron células con marcaje TUNEL positivo, es decir, se observaron células con fluorescencia verde localizada en el núcleo, resultado de la incorporación de nucleótidos marcados con Fluoresceína, identificándose estas como células apoptóticas. Cabe destacar que el IP permitió discriminar las células no apoptóticas, mediante el marcaje IP positivo y TUNEL negativo.

La facilidad y la sensibilidad de esta técnica y su poder cuantitativo han dado lugar a su amplia aceptación y su uso actual. Sin embargo, un inconveniente grave permanece en su supuesta incapacidad para discriminar las células necróticas dado que estas últimas también tienen ADN con extremos 3'-OH libres, sobre todo después

de una lesión oxidante y tóxica. Esto ha llevado a muchos a cuestionar la validez del ensayo de TUNEL en condiciones donde la apoptosis y necrosis coexisten (Charriaut-Marlangue y Ben-Ari, 1995; Yasuda y col., 1995).

Sin embargo, se ha reportado que el empleo del IP junto con la reacción del TUNEL en cultivos celulares y tejidos enteros bajo diferentes tipos de estrés, permite la identificación de células necróticas y su exclusión de aquellas que presentan marcaje TUNEL positivo, identificándose estas últimas como células apoptóticas. Esto da especificidad y sensibilidad a la reacción de TUNEL que permite la cuantificación de la apoptosis en tejidos que se han fijado con un mayor grado de confianza (Kelly y col., 2003). Esto confirma los resultados obtenidos, es decir que las células que presentaron un marcaje TUNEL positivo son células apoptóticas, lo implica que ambos compuestos inducen la activación de la apoptosis, lo que trae como consecuencia la activación de endonucleasas dependientes de  $Ca^{+2}$  que generan la fragmentación nucleosomal del ADN.

#### **6.4 Los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen en la línea celular tumoral PC3 la activación de caspasas efectoras 3/7**

En vista de que las caspasas 3/7 son una de las proteínas ejecutoras centrales de la apoptosis en nuestro estudio se evaluó la capacidad que tienen los compuestos KSC-21 y KSC-41 de inducir la activación de caspasas 3/7 en la línea celular PC3. En este caso se empleó un kit comercial que permitió no solo evaluar la actividad de caspasas 3/7 sino también la citotoxicidad y la viabilidad de la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41.

El ensayo en una primera parte permitió determinar el efecto citotóxico que presentaron los tratamientos con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 y KSC-21 en la línea celular PC3, así como también la viabilidad de la línea celular bajo el efecto de dichos compuestos. La primera parte del ensayo permitió medir simultáneamente dos actividades proteasas; una de ellas indicador de la viabilidad celular, mientras que la otra un indicador de citotoxicidad.

El método se basa en la detección diferencial de las actividades proteolíticas ubicuas asociadas con las células viables intactas y células que han perdido la integridad de la membrana. La actividad proteasas de células vivas se restringe a las células viables intactas y se mide utilizando un sustrato peptídico (GF-AFC), mientras que la actividad proteasa de células muertas, células que tienen pérdida de la integridad de la membrana se mide utilizando el sustrato peptídico (bis-AAF-R110), el cual es impermeable a las células intactas (Niles y col., 2007). En nuestro estudio se evidencio este hecho y además se confirmó el resultado en cuanto a la citotoxicidad y viabilidad de los compuestos sobre la línea celular PC3 (Figuras 17 y 18), donde la citotoxicidad incrementa a medida que aumenta el tiempo de incubación con dichos compuestos, lo que indica que la integridad de la membrana de las células se ve comprometida, por lo cual hay un aumento en la actividad proteasa de las células muertas que es proporcional al número de células que presenta pérdida de la integridad de las membranas, un indicativo de cuan toxico es el compuesto; en cambio con respecto a la viabilidad, esta disminuyen a medida que aumenta el tiempo de incubación con los compuestos, es decir, la actividad proteasa de las células vivas

disminuye, como consecuencia de la disminución de la viabilidad celular. Estos resultados confirman que los compuestos tienen una actividad citotóxica importante sobre la línea celular PC3.

La segunda parte del ensayo permitió medir la actividad de caspasa 3/7 mediante la tecnología del ensayo Caspasa-Glo, proporcionando un sustrato luminógeno que contiene la secuencia del tetrapéptido DEVD. El sustrato presente es escindido por las caspasas efectoras 3/7, generando como producto la luciferina, la cual al unirse a la Luciferasa y ATP generan una señal luminiscente. La luminiscencia es proporcional a la actividad caspasa presente (Ren, y col., 2004), este hecho se evidencia en nuestro estudio (Figura 19), donde las células PC3 después del tratamiento con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 y KSC-41 a las 24 horas presenta una luminiscencia característica proporcional a la actividad de caspasas 3/7 presente, lo que indica que los compuestos inducen la activación de las caspasas efectoras en la línea celular PC3. En el caso del tratamiento con el compuesto KSC-21 se observó que la activación de las caspasas 3/7 se inicia a las 24 horas de tratamiento y dicha activación se eleva considerablemente con respecto al control a las 48 horas y 72 horas, la actividad de caspasas 3/7 aumento a medida que aumento el tiempo de incubación con dicho compuesto, es decir, que la escisión del sustrato aumento con el tiempo; por otro lado el tratamiento con el compuesto KSC-41 induce la activación de las caspasas 3/7 a las 24 horas de manera importante, pero esta disminuye a las 48 y 72 de tratamiento subsecuentemente. Este puede estar relacionado con el hecho de que las caspasas son proteasas que pueden regular su propia activación, es decir, una

vez activa puede activar directa o indirectamente a su propio precursor, lo cual ocasiona una activación exponencial hasta lograr su objetivo (fase de ejecución), posteriormente en la fase final del proceso apoptótico disminuye su actividad (Thornberry y Lazebnik, 1998).

### **6.5 Los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen hiperpolarización de la membrana mitocondrial en la línea celular tumoral PC3**

La vía intrínseca es una vía de activación de la apoptosis muy conservada que también es llamada vía mitocondrial. Como su nombre lo indica el eje central de control de esta vía es la mitocondria. Al decir intrínseca no significa que los estímulos de activación son siempre internos. Son numerosos los estímulos que pueden activar esta vía entre ellos: daño del ADN por agentes químicos, físicos o biológicos, privación de nutrientes o factores de crecimiento u otro tipo de estrés. Todos estos estímulos convergen en la mitocondria induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (por sus siglas en inglés, MOMP) (Green y Reed, 1998; Kroemer y col., 1997; Tait, y Green, 2010), lo que trae como consecuencia pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) asociado a un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico y síntesis de ATP (Cadenas y Davis 2000; Patel, 2004). Por lo tanto la pérdida del  $\Delta\psi_m$  se considera un hecho determinante en el desencadenamiento de la apoptosis, al tratarse de un punto de no retorno de este proceso (Hirsch y col., 1998). La pérdida del  $\Delta\psi_m$  precede a otros eventos apoptóticos típicos como es la salida del citocromo c y otras proteínas

proapopticas, fragmentación del ADN y mayores cambios en el potencial redox (Kroemer, 1997)

En base a esto se evaluó el  $\Delta\Psi_m$  de la línea celular PC3 bajo el tratamiento con la  $CI_{50}$  de los compuestos KSC-21 y KSC-41 a diferentes tiempo, Figura 20 y 21, con el fin de identificar si los mismos inducían una disminución en el  $\Delta\Psi_m$  como consecuencia de la despolarización de la membrana mitocondrial, lo que permitiría identificar la ruta de activación de la apoptosis. Para determinar si se producen alteraciones en el  $\Delta\Psi_m$ , se midió la absorción de un fluorocromo mitocondrial específico, MitoTracker Red CMXRos. La absorción del MitoTracker Red CMXRos se cuantifico mediante citometría de flujo.

En este estudio se observó que ambos compuestos incrementaron la absorción del MitoTracker Red CMXRos por parte de las mitocondrias, es decir que el  $\Delta\Psi_m$  aumento, como consecuencia de la hiperpolarización de la membrana mitocondrial. Se han reportado evidencias que apoyan la hiperpolarización, la hinchazón de las mitocondrias, y la posterior liberación del citocromo c, en la inducción de la apoptosis (Vander Heiden y col., 1997). La hiperpolarización mitocondrial así como la acidificación citoplasmática se puede dar por el cierre de VDAC y que estos cambios dependen de la actividad de la ATP-sintasa (Gottlob y col., 2001).

En condiciones fisiológicas, VDAC regula el intercambio de metabolitos, incluyendo los nucleótidos de adenina, dentro y fuera de la mitocondria, que es crítica para la homeostasis y función mitocondrial (Marzo y col., 1998; Newmeyer y

Ferguson-Miller, 2003). El cierre de VDAC conduce a una disfunción mitocondrial, hinchazón de la matriz mitocondrial y posterior ruptura de la membrana mitocondrial externa (en última instancia), debido a la incapacidad de intercambiar el ATP por ADP citosólico y la capacidad para disipar el gradiente de protones de la membrana mitocondrial interna, lo que resulta en la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna (Vander Heiden y col., 1999; Gottlob y col., 2001).

En este estudio se observó que el  $\Delta\Psi_m$  incremento a medida que aumento el tiempo de incubación con los compuestos, la hiperpolarización se mantiene en el tiempo, lo que puede estar relacionado con la cantidad insuficiente de ADP para la síntesis de ATP en la matriz, por lo que los protones se acumulan en el espacio intermembrana (Vander Heiden y Thompson, 1999; Vander Heiden y col., 1999).

Las enzimas glucolíticas como la hexoquinasa que influye en gran medida en la estructura y la conductancia del VDAC (Vyssokikh y Brdiczka, 2003). La hexoquinasa cataliza el primer paso de la glucólisis, la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato (G-6-P) (Middleton, 1990). La Hexoquinasa interactúa directamente con la mitocondria (Robey y Hay, 2006), lo que permite que tenga acceso directo a altas concentraciones de ATP, el producto principal de la mitocondria, el cual emplea para fosforilar inmediatamente las moléculas de glucosa disponibles. La capacidad de la hexoquinasa mitocondrial de utilizar el ATP le permite acoplar la glucólisis con la fosforilación oxidativa cuando los niveles de ATP citosólico son bajos. La expresión de hexoquinasas mitocondriales incrementa en los tumores; su expresión se cree que se correlaciona con la tasa de crecimiento del tumor. (Rossignol y col., 2004). La hexoquinasa tiene alta afinidad por el VDAC y su



asociación viene dada por la fosforilación de la hexoquinasa por parte de AKT (Miyamoto y col., 2008).

Nuestro sistema de estudio, es decir, la línea celular PC3, presenta una activación constitutiva de AKT, lo que puede favorecer la unión directa de la hexoquinasa al VDAC, regulando la apertura del poro VDAC mitocondrial, manteniendo así la membrana polarizada (Nakashima y col., 1986; Nakashima, R.A. 1989; Azoulay-Zohar y col., 2004). Pero cuando la línea celular PC3 está bajo el tratamiento con los compuestos KSC-21 y KSC-41 se observó en los ensayos de inmunodetección de la proteína AKT (Figura 22 y 23) que esta tiende a disminuir su expresión a medida que aumenta el tiempo de incubación con los compuestos. Si se inhibe la actividad de AKT, esta no puede fosforilar la hexoquinasa, inhibiendo la asociación entre la hexoquinasa y el VDAC, lo que trae como consecuencia alteración en el metabolismo de la glucosa, debido a la falta de contacto entre la hexoquinasa y el ATP mitocondrial disponibles y alteración en el potencial de membrana mitocondrial, debido al cierre del poro VDAC en la membrana mitocondrial externa (Pastorino y col., 2002). El cierre del poro puede conducir a la hiperpolarización mitocondrial y la posterior inflamación y ruptura de las mitocondrias.

Se podría decir que los compuestos KSC-21 y KSC-41 actúan sobre la vía de señalización PI3K/AKT, impidiendo que AKT mantenga la integridad mitocondrial, promueva la glucólisis y la supervivencia celular, a través de la fosforilación de hexoquinasa, que promueve su asociación con la estructura de poro mitocondrial VDAC (Stiles, 2009).

Además de la regulación directa de la hexoquinasa y VDAC por AKT, la estructura de poros en la membrana mitocondrial también se somete a una regulación a través de la señalización de PI3K. Uno de los mejores objetivos caracterizados de AKT aguas abajo es GSK3 $\beta$ . La fosforilación de GSK3 por AKT inhibe su actividad enzimática como una quinasa. GSK3 $\beta$  tiene varios sustratos, incluyendo la glucógeno sintasa y  $\beta$ -catenina. (Stiles, 2009)

Se identificó que GSK3 $\beta$  fosforila a VDAC en Thr 51, lo que interrumpe su unión a la hexoquinasa (Pastorino y col., 2005). La actividad de Akt también puede inducir la unión de VDAC y hexoquinasa mediante la fosforilación y la inhibición de GSK3 $\beta$  (Stiles, 2009). Por lo tanto al disminuir la actividad de AKT como se observó en nuestros resultados, se podría favorecer la actividad de GSK3 $\beta$  inhibiendo la unión de la hexoquinasa al VDAC, lo que conlleva al cierre de VDAC y posterior hiperpolarización de la membrana mitocondrial.

#### **6.6 Los compuestos KSC-21 y KSC-41 no afectan los niveles de expresión de Bcl2, Bcl-xL o Bax, sino los niveles de expresión de Survivina y AKT**

Las proteínas de la familia Bcl-2 son fundamentales en la vía intrínseca. Probablemente el mecanismo principal por el cual las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la apoptosis sea mediante el control de la liberación del citocromo c. La sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas como: Bcl-2 o Bcl-xL impide la liberación de citocromo c de la mitocondria, la activación de caspasas y la muerte celular. Por el contrario, la expresión ectópica del promotor de muerte, Bax, desencadena la liberación del citocromo c de la mitocondria (Rossé y col., 1998;

Finucane y col., 1999). Aunque Bcl-2 parece ser una proteína exclusiva en la membrana, más que todo en la membrana de las mitocondrias, otras proteínas como: Bid, Bad y Bim, que se encuentran en el citosol se trasladan a las mitocondrias durante apoptosis (Kluck y col., 1997; Vander Heiden y col., 1997; Hsu y col., 1997; Desagher y col., 1999; Downward, 1999). Estas proteínas juegan un papel importante en la transducción de señales desde el citosol a las mitocondrias, donde se unen y regulan la actividad de los miembros de la familia Bcl- 2 que controlan la liberación de citocromo c. Después de un estímulo de muerte, varios cambios afectan Bax y conducen a su activación. En primer lugar, Bax se transloca del citosol a la mitocondria, a menos que ya se encuentre acoplado al orgánulo (Hsu y col., 1997; Desagher y col., 1999; Gross y col., 1998; Goping y col., 1998). A continuación, Bax sufre un cambio conformacional, seguido de una oligomerización. Por último, Bax se inserta en la membrana externa de la mitocondria y se convierte en una proteína integral de membrana, formando un canal, a través del cual se da la liberación del citocromo c de las mitocondrias (Gross y col., 1998; Goping y col., 1998; Eskes y col., 2000).

Por lo tanto cuando la apoptosis se activa, la expresión y transcripción de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (26 kDa) y Bcl-xL (30 kDa) disminuye, mientras que la expresión y transcripción de la proteína proapoptótica Bax (21 kDa) aumenta. Estas proteínas son empleadas como indicadoras de la activación del proceso apoptótico (Kirsch y col., 1999).

En base a esto se evaluó el patrón de expresión de Bcl-2 y Bcl-xL y la proteína proapoptótica, Bax, en la línea celular PC3 bajo el efecto de los compuestos

KSC-21 y KSC-41, mediante Western blot, (Figura 22 y 23). Esto con el fin de identificar si la apoptosis inducida en la línea celular PC3 es a través de la vía intrínseca.

Los resultados obtenidos indicaron que los patrones de expresión de las proteínas evaluadas bajo el efecto de los compuestos KSC-21 y KSC-41 no presentaron cambios a medida que aumentó el tiempo de incubación con los compuestos, es decir, los niveles de expresión de estas proteínas no se vieron afectados en la línea celular tumoral. A pesar de que se ha reportado que la proteína Bcl-2 se encuentra sobre-expresada en la línea celular PC3 (Zhou y col., 2006), los niveles de expresión se mantienen en presencia de los compuestos.

Adicionalmente, se evaluó el patrón de expresión de la proteína proapoptótica AIF, el cual forma parte del grupo de proteínas apoptogénicas que se encuentra en el espacio intermembranar de la mitocondria y que es liberada de allí al citosol, tras un estímulo apoptótico, una vez en el citosol se transloca al núcleo, promoviendo la condensación y fragmentación del ADN (fragmentos de alto peso molecular de aproximadamente 50 kDa) (Daugas y col., 2000). Los resultados evidenciaron (Figura 22 y 23) que los niveles de expresión de esta proteína en la línea celular PC3 bajo el tratamiento con los compuestos KSC-21 y KSC-41 no presentaron cambios por efecto de la exposición a los compuestos.

La Survivina, un miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP), juega un papel importante en la regulación de ese proceso y en la división celular (Li y col., 1998). Se han encontrado evidencias que demuestran que la sobreexpresión de la Survivina le confiere la supervivencia celular y la resistencia a la apoptosis a

diversas células cancerígenas, entre ellas las que dan lugar al cáncer de próstata, así como en la línea celular PC3 empleada en nuestro estudio (Gong y col., 2007). En base a esto se realizó la inmunodetección de la proteína Survivina, de manera de determinar si los compuestos KSC-21 y KSC-41 inhiben la expresión de la misma, permitiendo que las células sean sensibles a la apoptosis. En los resultados obtenidos en la Figura 22 y 23 se puede observar que los niveles de expresión de la proteína Survivina disminuyen de manera tiempo-dependiente, es decir a medida que aumenta el tiempo de incubación con los compuestos los niveles de expresión de Survivina disminuyen. En el tratamiento con el compuesto KSC-21 a partir de las 16 horas se observa una disminución evidente y a las 48 horas prácticamente desaparece, mientras que en el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41 la disminución se puede apreciar a las 48 horas. Ambos compuestos disminuyen los niveles de expresión de Survivina, así como se ha reportado que en células PC3 bajo tratamiento con Etopósido y Paclitaxel (Thomas y Shan, 2005).

Se ha reportado que la sobreexpresión de la Survivina se asocia con la activación de la vía de señalización PI3K/Akt. La primera evidencia de la regulación de Survivina a través de la vía de señalización PI3K/Akt fue demostrada en células endoteliales (Papapetropoulos y col., 2000). Posteriormente otros grupos de investigación mostraron que la expresión de Survivina se activa por la vía de señalización PI3K/Akt, en diversas células cancerígenas, incluyendo aquellas que originan el cáncer de próstata (Gong y col., 2007). Akt media la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis mediante la estimulación de la síntesis de Survivina. En la línea celular PC3 la actividad constitutiva de la vía de señalización PI3K/AKT

promueve la sobreexpresión de la Survivina (McEleny y col., 2002; Suh y col., 2002; Toser y Yoeli-Lerner, 2006).

En vista de los resultados obtenidos en cuanto a la disminución de los niveles de expresión de la Survivina se realizó la inmunodetección de la proteína AKT, de manera de dilucidar si dicha disminución viene dada por la caída en los niveles de AKT, lo que implicaría una inhibición de la transducción de señales por parte de la vía de señalización PI3K/AKT. Se puede observar en la Figura 23 y 24 que bajo el tratamiento con el compuesto KSC-21 los niveles de expresión de AKT disminuyen evidentemente a partir de las 24 horas, se podría pensar que el compuesto KSC-21 actúa a nivel transcripcional ya que disminuye la expresión de AKT o que puede estar inhibiendo la actividad de AKT, lo que conlleva a la inhibición de la Survivina. En el caso del tratamiento con el compuesto KSC-41 no se observa un cambio evidente en los niveles de expresión, pero según el análisis densitométrico AKT disminuye a partir de las 24 horas. Sin embargo, la disminución es leve; probablemente el compuesto actúa sobre la actividad de AKT, es decir puede estar inhibiendo la activación de AKT, suprimiendo así la expresión de la Survivina. Se han encontrado evidencias que indican que la supresión de proteínas IAPs, así como la Survivina, promueven la activación de la apoptosis mediante mecanismos que involucren la cascada de señalización AKT/JNK y activación de caspasas (Sanna y col., 2002). Otros reportes sostienen que la inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT regula la baja la expresión de Survivina, y potencia la apoptosis mediada por TRAIL en neuroblastomas (Kim y col., 2004), probablemente los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen apoptosis en la línea celular PC3 de este modo.

Los compuestos empleados en nuestro estudio parecen tener un efecto similar a la Perifosina, que inhibe la proteína quinasa B (PKB) y la actividad de AKT en células PC3 (Kondapaka y col., 2003). Otros estudios evidencian que Perifosine en células de mieloma múltiple (MM) inhibe a su vez la expresión de Survivina, sin promover alteración de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 (Hideshima y col., 2007), similar a los resultados obtenidos en cuanto a la evaluación de niveles de expresión de estas proteínas antiapoptóticas.

Estos resultados sugieren que la vía de señalización de PI3K/Akt podría estar implicada en la regulación de la expresión de la Survivina en respuesta a los compuestos citotóxicos evaluados. Al verse afectada la transducción de señales de AKT se podría estar reprimiendo la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, por lo tanto éste no podría translocarse al núcleo y promover la expresión de la Survivina (Gilmore, 1999).

Cabe destacar que la vía de señalización PI3K/AKT también regula la actividad del factor de transcripción Forkhead (FOXO). Cuando AKT está activa, ésta fosforila e inactiva el factor de transcripción FOXO, el cual media la expresión de algunos genes que inducen la activación de la apoptosis, tales como el gen de ligando de Fas (FasL). (Pommier y col., 2004). Al estar inactiva AKT, el factor de transcripción FOXO promueve la expresión de FasL, probablemente este sea otro mecanismo a través del cual los compuestos KSC-21 y KSC-41 podrían inducir la activación de la apoptosis en la línea celular PC3.

En base a los resultados obtenidos se puede decir que los compuestos KSC-21 y KSC-41 inducen apoptosis mediante la regulación de la vía de señalización PI3K/AKT/Survivina. Por lo tanto ambos compuestos actúan sobre blancos moleculares que están implicados en la regulación de funciones y actividades celulares básicas que favorecen la progresión del cáncer y no sobre la vía tradicional de inducción de apoptosis. Un enfoque novedoso que abre la posibilidad de continuar con las investigaciones que permitan dilucidar el mecanismo de acción de estos compuestos, con el fin de desarrollar una nueva terapia dirigida contra el cáncer de próstata.

En las Figuras 24 y 25 se presenta esquemáticamente un resumen de los cambios en el tiempo de estos compuestos sobre las células PC3. Los compuestos parecen inducir un efecto similar en las células tumorales, pero el compuesto KSC-21 resultó ser más efectivo, puesto que a la hora de determinar su capacidad proapoptótica los cambios obtenidos bajo su acción fueron más evidentes, es decir, indujo la activación de la apoptosis más rápido y en mayor medida que el compuesto KSC-41. Al comparar los esquemas se puede observar que la externalización de la PS en las células PC3 es mayor bajo el efecto del compuesto KSC-21, así como la fragmentación del ADN y la activación de caspasas efectoras, además de una notable disminución en los niveles de expresión de Survivina y AKT. Las diferencias encontradas pueden estar relacionadas con los grupos funcionales presentes en la estructura molecular de dichos compuestos, en el caso del compuesto KSC-21 el grupo funcional éster puede ser el que le confiere al compuesto un efecto más efectivo en las células PC3 que el epóxido (éter cíclico) presente en estructura



molecular del compuesto KSC41. Y por último en la Figura 26 se muestra el posible modelo de inducción de apoptosis en las células PC3 bajo el tratamiento con los compuestos KSC-21 y KSC-41.

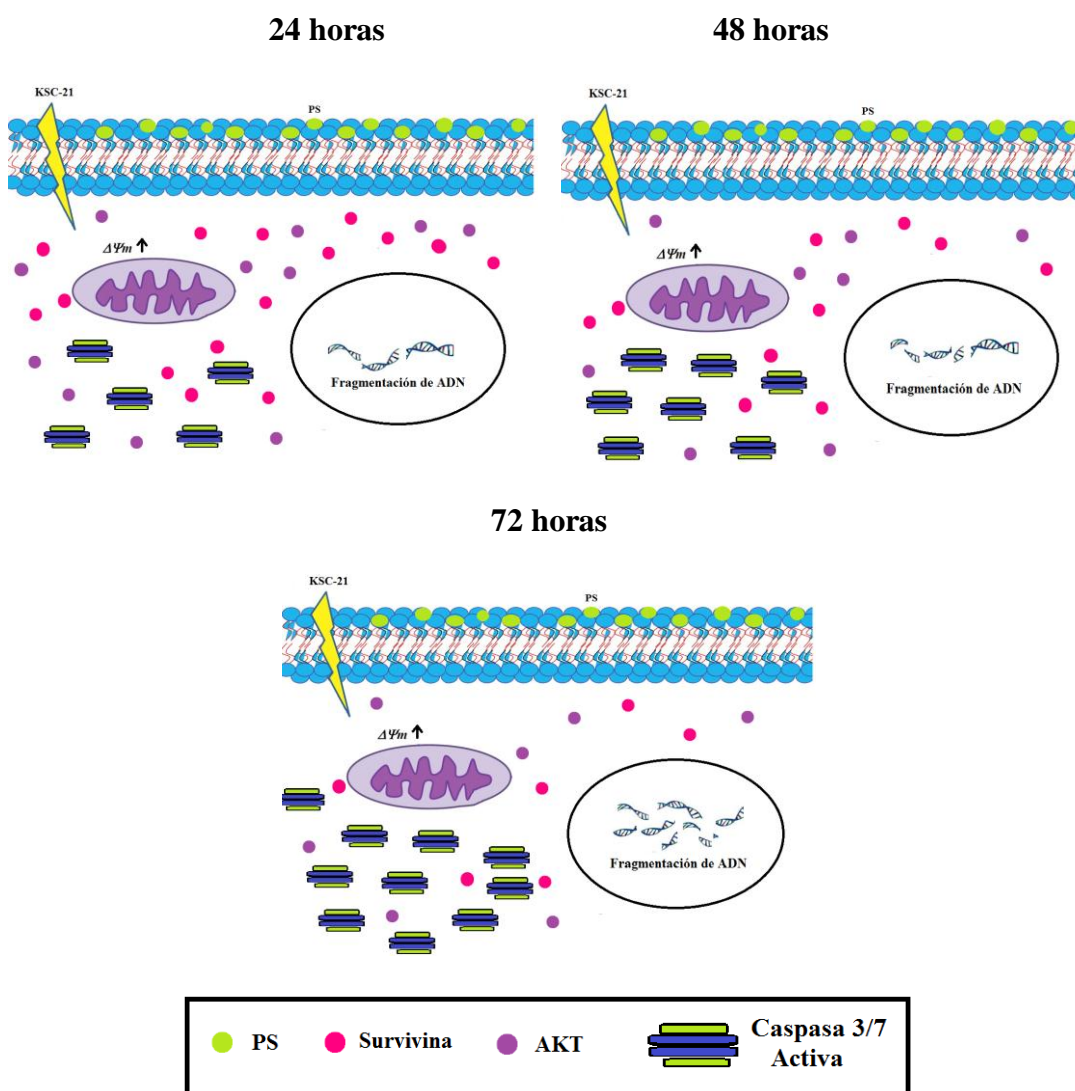


Figura 24. Cambios en el tiempo de las células PC3 bajo el tratamiento con el compuesto KSC-21

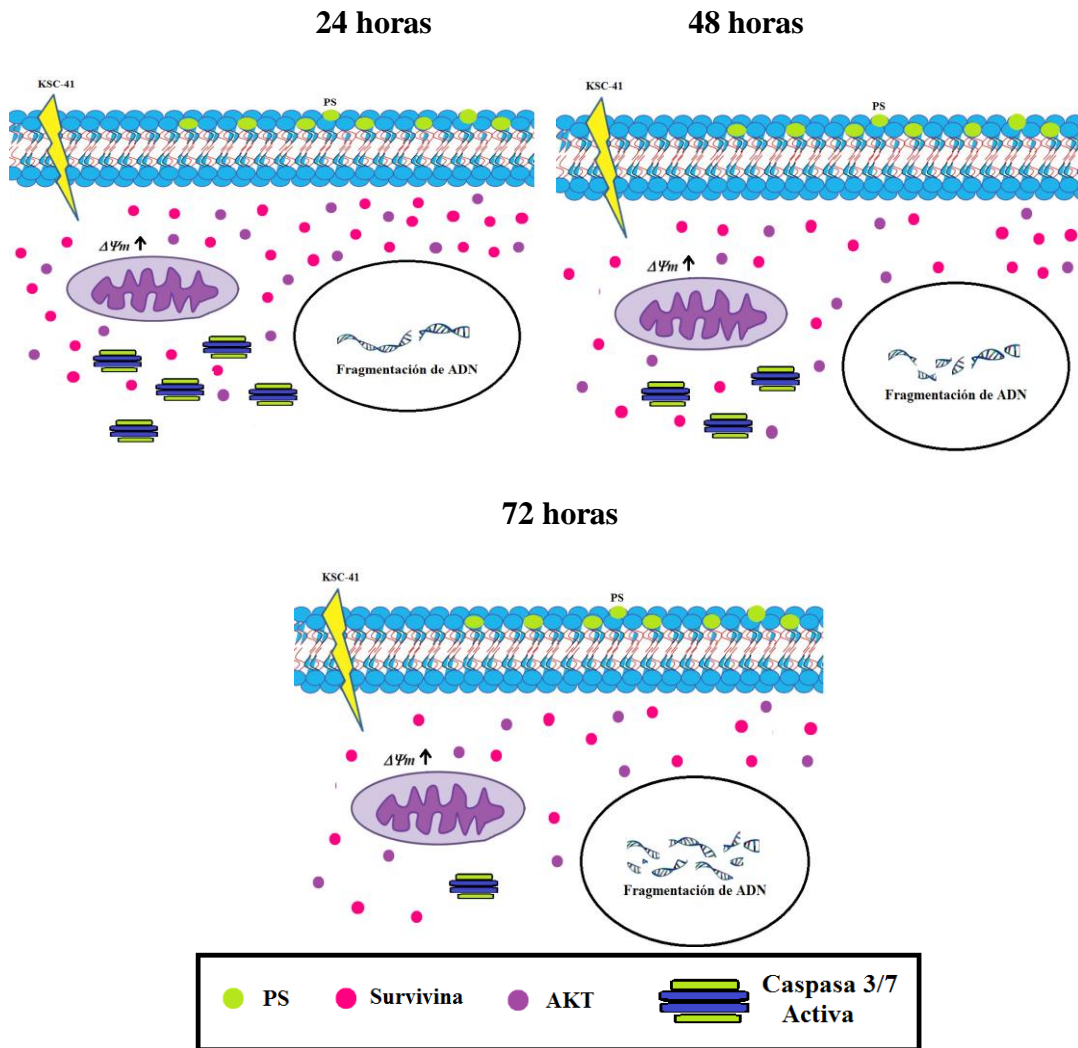


Figura 25. Cambios en el tiempo de las células PC3 bajo el tratamiento con el compuesto KSC-41

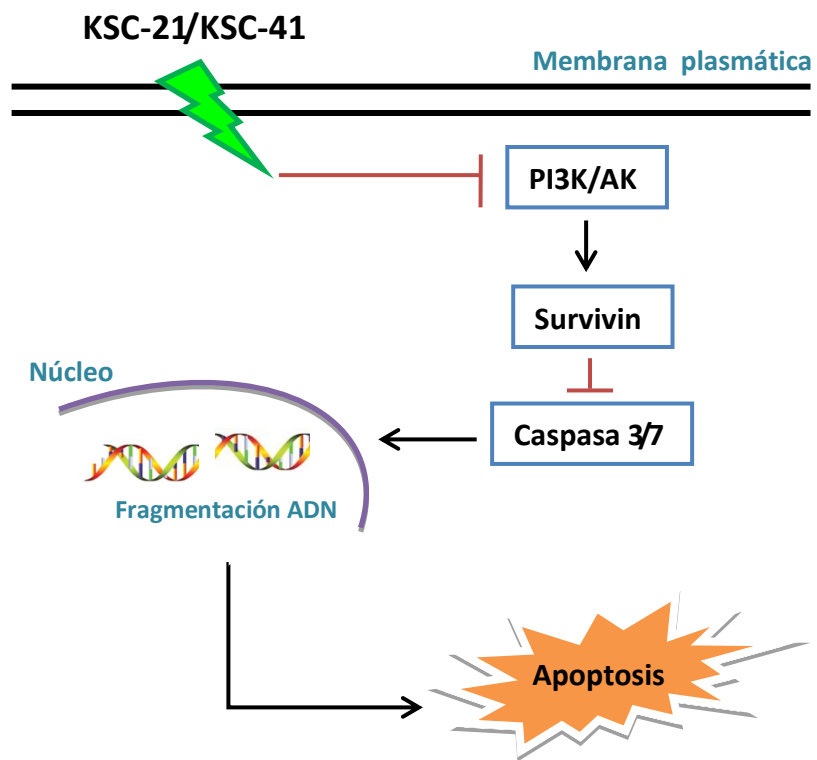


Figura 26. Modelo de inducción de apoptosis en las células PC3 bajo el tratamiento con los compuestos KSC-21 y KSC-41.

## 7. CONCLUSIONES

---

Las modificaciones químicas que se realizaron al compuesto base, Caracasina (KSC-21) para obtener la serie de compuestos semi-sintéticos no mejoraron su efecto citotóxico sobre la línea celular tumoral PC3. En los cultivos primarios de fibroblastos los KSC-37, KSC-41 y KSC-45 fueron los que presentaron un menor el efecto citotóxico.

Los compuestos de mayor interés fueron los compuestos KSC-21 y KSC-41, debido a que estos presentaron un mayor efecto citotóxico en la línea celular PC3 que en los cultivos primarios de fibroblastos, es decir, provocaron la muerte de las células tumorales sin causar un daño excesivo a las células normales. Tras una serie de ensayos, estos compuestos mostraron una actividad apoptogénica importante que al parecer está relacionada con la regulación de la vía de señalización PI3K/AKT1, la cual juega un papel importante en la regulación de la expresión de la Survivina en células tumorales, además de promover la supervivencia de la célula y la proliferación celular, esto representa un aspecto novedoso para el desarrollo de terapias alternativas dirigidas contra el cáncer de próstata.

## 8. RECOMENDACIONES

---

- Los compuestos KSC-21 y KSC-41 al no inducir apoptosis a través de la vía clásica, sino mediante la regulación de la vía de señalización PI3K/AKT/Survivina permiten estudiar, desde el punto de vista terapéutico, una ruta alternativa muy interesante ya que involucra tanto la vía apoptótica como la de proliferación celular. Por lo tanto es recomendable continuar esta línea de investigación con el fin de precisar el mecanismo de acción de estos compuestos.
- De manera de complementar este estudio, se recomienda evaluar los niveles de AKT fosforilada, ya que los compuestos KSC-21 y KSC-41 podrían estar inhibiendo su activación por esta vía.
- De igual forma, es recomendable verificar cual caspasa efectora es la que se está activando, mediante su inmunodetección. La actividad reportada no permitió esa discriminación. Un examen de la actividad catalítica sobre la proteína PARP, como sustrato emblemático de estas proteasas, también sería recomendable.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. 2008. Inmunología celular y molecular. 6ta Edición. *Elsevier España, S.L.*
2. Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M., Altieri, D.C. 1998. Anti-apoptosis gene, Survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*. **351**: 882-883.
3. Adida, C., Crotty, P. L., McGrath, J., Berrebi, D., Diebold, J., Altieri, D. C. 1998. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene Survivin in human and mouse differentiation. *Am. J. Pathol.* **152**: 43-49.
4. Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B.A. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **14**: 6541-6551.
5. Alfaro, E., García, C., Dueñas, A. 2000. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev. Inst. Nat. Cancerol. (Mex)*. **46**: 275-280.
6. Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., y colaboradores. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**: 589-601.
7. Altieri, D.C. 2003. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* **22**: 8581-8589.
8. Altieri, D.C. 2004. Coupling apoptosis resistance to the cellular stress response: the IAP-Hsp90 connection in cancer. *Cell Cycle* **3**: 255-256.

9. Altieri, D.C. 2006. The case for Survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 609-615.
10. Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C. 1997. A novel antiapoptosis gene, Survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* **3**: 917-921.
11. Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., Hermens, W.T., Willems, G.M. 1990. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **265**: 4923-4928.
12. Aoki, Y., Feldman, G.M., Tosato, G. 2003. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases Survivin expression in primary effusion lymphoma. *Blood.* **101**: 1535-1542.
13. Aponte, H., Secin, F., Jonar, W., Amabile, C., 2006. Cáncer de próstata el más común en los varones mayores de 50 años. *Urología Colombiana* 125-132.
14. Arvelo, F. 2002. Mitochondria y apoptosis. *ACV.* **53**: 297-306.
15. Arvelo, F., Suárez, A., Galindo, I., Compagnone, R., Usubillaga, A. 2008. Productos Naturales en la terapéutica actual. *Memorias del Instituto de Biología Experimental* **5**: 69-72.
16. Azoulay-Zohar, H., Israelson, A., Abu-Hamad, S., Shoshan-Barmatz, V. 2004. In selfdefence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.* **377**: 347-355.
17. Bandala, E., Espinosa, M., Maldonado, V., Meléndez-Zajgla, J. 2001. Inhibitor of apoptosis-1 (IAP-1) expression and apoptosis in non-small-cell lung cancer cells exposed to gemcitabine. *Biochem. Pharmacol.* **62**: 13-9.

18. Belinchón, M., Bethencourt, F., García, I., Fraile, B., Fernández, C., Aller, P., González, J., y colaboradores. 2005. Potencial anti-apoptótico de p38 en cáncer de prostata. *Actas. Urol. Esp.* 29: 769-776.
19. Blagosklonny, M.V. 2004. Analysis of FDA approved anticancer drugs reveals the future of cancer therapy. *Cell Cycle* 3: 1035–1042
20. Boatright, K.M., Salvesen, G.S. 2003. Mechanisms of caspasa activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 725-731.
21. Bolton, M.A., Lan, W., Powers, S.E., McClelland, M.L., Kuang, J., Stukenberg, P.T. 2002. Aurora B kinase exists in a complex with Survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by Survivin binding and phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 13: 3064-3077.
22. Bremer, E., Dam, G., Kroesen, B.J., De Leij, L., y Helfrich, W. 2006. Targeted induction of apoptosis for cancer therapy. *Trends. Mol. Med.* 12: 382-93
23. Bretscher, M.S. 1972. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature New. Biol.* 236:11–12.
24. Cadenas, E.; Davies, K.J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29: 222-230.
25. Capote, L. 2006. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev. Venez. Oncol.* 18: 269-281.
26. Carey, F. 2006. Química Orgánica. Ed. McGraw-Hill. 7<sup>a</sup> Edición
27. Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942.



28. Cavagnari, B.M. 2011. Terapia génica: opción terapéutica para neoplasias, infecciones y enfermedades monogénicas. *Arch. Argent. Pediatr.* **109**: 326-332.
29. Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J. y colaboradores. 1992. Molecular cloning of the interleukin-1b converting enzyme. *Science* **256**: 97-100.
30. Chae, H.J., Kang, J.S., Byun, J.O., Han, K.S., Kim, D.U., Oh, S.M., Kim, H.M., Chae, S.W., Kim, H.R. 2000. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol. Res.* **42**: 373-381.
31. Charriaut-Marlangue, C., y Ben-Ari, Y. 1995. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport.* **7**: 61-64.
32. Chinnaiyan, A. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* **1**: 5-15.
33. Cohen, G. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* **326**: 1-16.
34. Cordell, G., Kingorn, A. y Pezzuto, J. 1993. Separation, structure elucidation, and bioassay of cytotoxic natural products. In S. Colegate and R. Moleynaux (eds.), *Bioactive Natural products: Detection, Isolation, and Structural determination*, CRC press, Florida. 198-201.
35. Cory, S., y Adams, J. 2002. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature* **2**: 647-656.
36. Cregan, S.P., Dawson, V.L., Slack, R.S. 2004. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **23**: 2785-2796.
37. Crompton, M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **341**: 233-249.

38. Danial, N., Korsmeyer, S., 2004. Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205-219.
39. Daugas, E., Susin, S.A., Zamzami, N., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M.C., y colaboradores. 2000. Mitochondrial-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **14**: 729-739.
40. Deigner, H.P., Kinscherf, R. 1999. Modulating apoptosis: current applications and prospects for future drug development. *Curr. Med. Chem.* **6**: 399-414.
41. Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., y colaboradores. 1999. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome *c* release during apoptosis. *J. Cell Biol.* **144**: 891-901.
42. Devaux, P.F. 1991. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry-us.* **30**: 1163-1173.
43. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**: 300-304.
44. Di Rienzo J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, E.M., Robledo, C.W. 2013. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
45. Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Macchiavelli, R. 2012. Modelos lineales mixtos. Aplicaciones en InfoStat. Edición Electrónica, distribuida con la instalación de InfoStat.
46. Di Rienzo, J.A., Guzman, A.W., Casanoves, F. 2002. A Multiple Comparisons Method based On the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree

Obtained by Average Linkage of the Matrix of Euclidean Distances between Treatment Means. *JABES* **7**: 129-142.

47. Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C.E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., y col. 2004. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**: 34087-34090.
48. Dominguez, X. 1973. Métodos de Investigación: Fitoquímica. 1° edición. Editorial Limusa. Mexico.
49. Downward, J. 1999. How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat. Cell Biol.* **1**: E33–E35.
50. Downward, J. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**: 177–182.
51. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**: 33-42.
52. Duke, R.C., Ojcius, D.M., Young, D.E. 1996. Cell suicide in health and disease. *Sci. Amer.* **52**: 48-55.
53. Earnshaw, W. C. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Biol.* **7**: 337–343.
54. Elmore, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**: 495-516.
55. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., Martinou, J.C. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.* **20**: 929–935.

56. Fadok, V.A., Laszlo, D.J., Noble, P.W., Weinstein, L., Riches, D.W., Henson, P.M. 1993. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J. Immunol.* **151**: 4274–4285.
57. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of Apoptotic lymphocytes trigger specific recognition and removal by Macrophages. *J. Immunol.* **148**: 2207-2216.
58. Finucane, D.M., Bossy-Wetzel, E., Waterhouse, N.J., Cotter, T.G., Green, D.R. 1999. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome *c* release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* **274**: 2225–2233.
59. Florez, J., Armijo, J. y Mediavilla, A. 2008. Farmacología Humana. 5ta. Edición. Ed. Masson.
60. Ford, O., Gregory, C., Kim, D., Smitherman, A., y Mohler, J. 2003. Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J. Urol.* **170**: 1817-1821.
61. Fortugno, P., Beltrami, E., Plescia, J., Fontana, J., Pradhan, D., Marchisio, P.C., Sessa, W.C., y colaboradores. 2003. Regulation of Survivin function by Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 13791-13796.
62. Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C. 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**: 435-437.
63. Fuentes, J., Castro, V., Jakupovic, J., Murillo, R. 2004. Diterpenos y otros constituyentes de *Croton hirtus* (Euphorbiaceae). *Rev. Biol. Trop.* **52**: 269-285.

64. Fulda, S., Debatin, K. 2006. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* **25**: 4798-4811.
65. Furones, J. 2002. Bases científicas para el desarrollo y la utilización de los medicamentos. Farmacología General. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
66. García, J., Bandres, E., Catalan, V., Zubalegui, N. 2000. Conceptos básicos en biología molecular del cáncer. Susceptibilidad genética. *ANALES Sis. San Navarra* **24**: 31-52.
67. García, P., Braga, A., Batista, R. 2007. Occurrence, Biological Activities and Synthesis of Kaurane Diterpenes and their Glycosides. *Molecules* **12**: 455-483.
68. Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C., Kroemer, G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **13**: 1423-1433.
69. Gassmann, R., Carvalho, A., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Hudson, D.F., Honda, R., Nigg, E.A., y col. 2004. Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **166**: 179-191.
70. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* **119**: 493-501.
71. Ghisalberti, E.L. 1997. The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. *Fitoterapia* **68**: 303-325.
72. Ghobrial, I., Witzig, T. y Adjei, A. 2005. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA Cancer J. Clin.* **55**: 178-194.

73. Giang, P., Jin, H., Son, P., Lee, J., Hong, Y. y Lee, J. 2003. *Ent*-kaurane diterpenoids from *Croton tonkinensis* inhibit LPS- Induced NF-kB Activation and NO production. *J. Nat. Prod.* **66**: 1217-1220.
74. Gilmore, T. 1999. The Rel/NF-kB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* **18**: 6842-6844.
75. Giodini, A., Kallio, M.J., Wall, N.R., Gorbsky, G.J., Tognin, S., Marchisio, P.C., Symons, M., y colaboradores. 2002. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by Survivin. *Cancer Res.* **62**: 2462-2467.
76. Gong, J., Lee, J., Akio, H., Schlegel, P.N., Shen, R. 2007. Attenuation of apoptosis by chromogranin A-induced Akt and Survivin pathways in prostate cancer cells. *Endocrinology* **148**: 4489–99.
77. Goodman, L. y Gilman, A. 2001. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill.
78. Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J., y colaboradores. 1998. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J. Cell Biol.* **143**: 207–215.
79. Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, B., Hay1, N. 2001. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* **15**: 1406-1418.
80. Green, D.R., Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.

81. Green, H., Kehinde, O., Thomas, J. 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 5665-5668.
82. Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J. 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*. **17**: 3878–3885.
83. Gulbins, E., Dreschers, S., Bock, J. 2003. Role of mitochondria in apoptosis. *Exp. Physiol*. **88**: 85-90.
84. Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
85. Hengartner, M. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776
86. Hidalgo, M. y Eckhart, S. 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer I*. **93**: 178-93.
87. Hideshima, T., Catley, L., Raje, N., Chauhan, D., Podar, K., Mitsiades, C., Tai, Y., y col. 2007. Inhibition of Akt induces significant down regulation of Survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Brit. J. Haematol*. **138**: 783–791.
88. Higgins, C.F. 1994. Flip-flop: The transmembrane translocation of lipids. *Cell* **79**: 393–395.
89. Hirsch, T.; Susin, S.A.; Marzo, I.; Marchetti, P.; Zamzami, N.; Kroemer, G. 1998. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Biol. Toxicol*. **14**: 141-145.

90. Hsu, Y.T., Wolter, K.G., Youle, R.J. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-xL during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 3668–3672.
91. Huerta, S., Goulet, E.J., Huerta-Yepez, S., Livingston, E.H. 2007. Screening and Detection of Apoptosis. *J. Surg. Res.* **139**: 143-156.
92. Jemal, A., Bray, F., Center, M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.* **61**: 69-90.
93. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., Thun, M.J. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J. Clin.* **58**: 71-96.
94. Jiang, M.C., Yang-Yen, H.F., Yen, J.J., Lin, J.K. 1996. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines. *Nutr. Cancer* **26**: 111-120.
95. Johansson, J., Andrén, O., Andersson, S.O., Dickman, P., Holberg, L., Magnuson, A., y col., 2004. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA*. **22**: 2713-27-19.
96. Jordan, J. 2004. Apoptosis: muerte celular programada. *Ámbito Farmacéutico*. Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Castilla-La Mancha.
97. Juo, P., Kuo, C.J., Yuan, J., Blenis, J. 1998. Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr. Biol.* **8**: 1001–1008.



98. Kaighn, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., Lechner, J.F., Jones, L.W. 1979. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* **17**: 16-23.
99. Kelly, K.J., Sandoval, R.M., Dunn, K.W., Molitoris, B.A., Dagher, P.C. 2003. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**: C1309–C1318.
100. Kerr, J., Winterford, C., Harmon, H. 1994. Apoptosis. Its significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer* **73**: 2013-2026.
101. Kerr, J., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-57.
102. Kidd, V.J. 1998. Proteolytic activities mediate apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 533-73.
103. Kim, S., Kang, J., Qiao, J., Thomas, R.P., Evers, B.M., Chung, D.H., 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates Survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastomas. *J. Pediatr. Surg.* **39**: 516–521.
104. Kirsch, D., Dossedd, A., Chau, N., Lim, D., Souza-Pinto, N., Hansford, R., Kastan, M., y colaboradores. 1999. Caspase-3-dependent Cleavage of Bcl-2 Promotes release of Cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **274**: 21155-21161.
105. Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**: 1132–1136.

106. Kobayashi, K., Hatano, M., Otaki, M., Ogasawara, T., Tokuhisa, T. 1999. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 1457-1462.
107. Kolber, M.A., Broschat, K.O., Landa-Gonzalez, B. 1990. Cytochalasin B induces cellular DNA fragmentation. *FASEB. J.* **4**: 3021-3027.
108. Kondapaka, S.B., Singh, S.S., Dasmahapatra G.P., Sausville, E.A., Roy, K.K. 2003. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol. Cancer Ther.* **2**: 1093-1103.
- 109.** Kouznetsov, V., Merchan, D., Arvelo, F., Bello, J., Sojo, F., Muñoz, A. 2010. New 4-hydroxy-3-methoxyphenyl substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline derivatives as potential antitumoral agents obtained through imino Diels-Alder reactions. *Lett. Drug Des. Discov.* **7**: 632-639.
110. Kroemer, G. 1997. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiotic hypothesis of apoptosis evolution. *Cell Death Differ.* **4**: 443-456.
111. Kroemer, G., Zamzami, N., Susin, S.A. 1997. Mitochondria control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**: 44-51.
112. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., Mackenzie, A. E. 1998. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**: 3247-3259.
113. Lavrik, I, Golks, A., Krammer, P.H. 2005. Death receptor signaling. *J. Cell Scien.* **118**: 265-267.

114. Lens, S.M., Vader, G., Medema, R.H. 2006. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 616-622.
115. Li, F., Altieri, D. C. 1999. The cancer antiapoptosis mouse Survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res.* **59**: 3143-3151.
116. Li, F., Altieri, D.C. 1999. Transcriptional analysis of human Survivin gene expression. *Biochem. J.* **344**: 305-311.
117. Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y. Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C., Altieri, A.C. 1998. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by Survivin. *Nature* **396**: 580-584.
118. Li, J., Yuan, J. 2008. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **27**: 6194–6206.
119. Liu, J.J., Huang, R.W., Lin, D.J., Peng, J., Zhang, M., Pan, X., Hou, M., y col. 2006. Ponicidin, an *ent*-Kaurane diterpenoid derived from a constituent of the herbal supplement PC-SPEs, *Rabdosia rubescens*, induces apoptosis by activation of caspase-3 and mitochondrial events in Lung cancer cells *in vitro*. **24**: 136-148.
120. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., Wang, X. 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 8461–8466.

121. Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.* **69**: 581–593.
122. Lowe, S. y Lin, A. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**: 485– 495.
123. Luque, J. y Herráez, A. 2002. Biología Molecular e Ingeniería Genética. 1<sup>a</sup> edición. Elsevier Science, Madrid.
124. Martin, S.J., Green, D.R. 1994. Apoptosis as a goal of cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.* **6**:616–621.
125. Marusawa, H., Matsuzawa, S., Welsh, K., Zou, H., Armstrong, R., Tamm, I., Reed, J.C. 2003. HBXIP functions as a cofactor of Survivin in apoptosis suppression. *EMBO. J.* **22**: 2729-2740.
126. Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Rémy, R., y colaboradores. 1998. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* **187**: 1261–1271.
127. Mateu, E., Chávez, K., Riina, R., Compagnone, R.S., Monache, F.D., Suárez, A. 2012. Nuevo 3,4 - *Seco-ent*-dímeros kaureno de *Croton micans*. *Nat. Prod. Commun.* **7**: 5-8.
128. Mattis, A.E., Bernhardt, G., Lipp, M., Forster, R. 1997. Analyzing cytotoxic T lymphocyte activity: a simple and reliable flow cytometry-based assay. *J. Immunol. Methods.* **204**: 135–142.
129. Mayo, L.D., Donner, D.B. 2002. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends. Biochem. Sci.* **27**: 462–467.

130. Mayora, A., y Arvelo, F. 2011. Cáncer de próstata y apoptosis. *Invest. Clin.* **52**: 376-396.
131. McEleny, K., Watson, R., Coffey, R., O`Nelly, A., Fitzpatrick, J. 2002. Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer lines. *Prostate* **51**: 133-140.
132. Micheau, O., Tschopp, J. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**: 181–190.
133. Middleton, R.J. 1990. Hexokinases and glucokinases. *Biochem. Soc. T.* **18**: 180–183.
134. Miyamoto, S., Murphy, A.N., Brown, J.H. 2008. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* **15**: 521–529.
135. Mosman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55–63.
136. Nakashima, R.A. 1989. Hexokinase-binding properties of the mitochondrial VDAC protein: inhibition by DCCD and location of putative DCCD-binding sites. *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**: 461–470.
137. Nakashima, R.A., Mangan, P.S., Colombini, M., Pedersen, P.L. 1986. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexyl carbodiimide labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. *Biochemistry-us.* **25**: 1015–1021.
138. Newmeyer, D.D., Ferguson-Miller, S. 2003. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**: 481–490.

139. Niles, A.L., Moravec, R.A., Eric Hesselberth, P., Scurria, M.A., Daily, W.J., Riss, T.L. 2007. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* **366**: 197–206.
140. Noton, E.A., Colnaghi, R., Tate, S., Starck, C., Carvalho, A., Ko Ferrigno, P., Wheatley, S.P. 2006. Molecular analysis of Survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis. *J. Biol. Chem.* **281**: 1286-1295.
141. O'Brien, I.E., Reutelingsperger, C.P., Holdaway, K.M. 1997. The use of Annexin-V and TUNEL to monitor the progression of apoptosis in plants. *Cytom. Part A* **29**: 28–33.
142. O'Connor, D.S., Wall, N.R., Porter, A.C., Altieri, D.C. 2002. A p34 (cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* **2**: 43-54.
- 143.** Oscanoa, T. y Lira, G. 2005. Calidad de prescripción de medicamentos en pacientes geriátricos. *An. Fac. Med.* **66**: 195-202.
144. Papapetropoulos, A., Fulton, D., Mahboubi, K., Kalb, R.G., O'Connor, D.S., Li, F., Altieri, D.C., y colaboradores. 2000. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/Survivin pathway. *J. Biol. Chem.* **275**: 9102–9105.
145. Pardo, G., Hernández, P. y Delgado, R. 2004. La apoptosis y La senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. Temas actualizados: resumen. Universidad de Camagüey. Departamento de Farmacia Cuba.

146. Pastorino, J.G, Shulga, N., Hoek, J.B. 2002. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**: 7610–7618.
147. Pastorino, J.G., Chen, S.T., Tafani, M., Snyder, J.W., Farber, J.L. 1998. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **273**: 7770–7775.
148. Pastorino, J.G., Hoek, J.B., Shulga, N. 2005. Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.* **65**: 10545–10554.
149. Patel, M. 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 1951-1962.
150. Peitsch, M.C., Mannherz, H.T., Tschopp, J. 1994. The apoptosis endonucleases: cleaning after cell death?. *Trends. Cell. Biol.* **4**: 37-41.
151. Pendergrass, W., Wolf, N., Poot, M. 2004. Efficacy of MitoTracker Green™ and CMX Rosamine to Measure Changes in Mitochondrial Membrane Potentials in Living Cells and Tissues. *Cytometry A.* **61**: 162–169.
152. Piantino, C., Salvadori, F., Ayres, P., Kato, R., Srougi, V., Leite. K., Srougi, M. 2009. An Evaluation of the Anti-Neoplastic activity of curcumin in prostate Cancer Cell Lines. *International Braz. J. Urol.* **35**: 354-361.
153. Pommier, Y., Sordet, O., Antony, S., Hayward, R.L., Kohn, K.W. 2004. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* **23**: 2934–2949.

154. Rao, J.K., Letada, P., Haverstick, D.M., Herman, M.M., Savory, J. 1998. Modifications to the in situ TUNEL method for detection of apoptosis in paraffin-embedded tissue sections. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **28**: 131–137.
155. Reed, J.C, Doctor, K.S, Godzik, A. 2004. The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci. STKE 2004* **2004**: 1-29.
156. Ren, Y.G., Wagner, K.W., Knee, D.A., Aza-Blanc, .P, Nasoff, M., Deveraux, Q.L. 2004. Differential regulation of the TRAIL death receptors DR4 and DR5 by the signal recognition particle. *Mol. Biol. Cell* **15**: 5064–5074.
157. Riedl, S.J., y Shi, Y. 2004. Molecular mechanisms of caspasa regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 897-907.
158. Robey, R.B., Hay, N. 2006. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. *Oncogene* **25**: 4683–4696.
159. Rossé, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., y colaboradores. 1998. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome *c*. *Nature* **391**: 496–499.
160. Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., Capaldi, R.A. 2004. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* **64**: 985–993.
161. Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., Goeddel, D. V. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**: 1243-1252.



162. Ruiz, Y., Rodriguez, J., Arvelo, F., Usubillaga, A., Monsalve, M., Diez, N., Galindo-Castro, I. 2008. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of ent-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. *Phytochemistry* **69**: 432-438.
163. Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., Van Gorp, M., Van Loo, G., Vandenameele, P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. **23**: 2861-2874.
164. Safiulina, D., Veksler, V., Zharkovsky, A., Kaasik, A. 2006. Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *J. Cell Physiol.* **206**: 347–353.
165. Sambrook, J., Russel, D. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor. Laboratory. Press.* Cold Spring Harbor, N.Y.
166. Sampath, S.C., Ohi, R., Leismann, O., Salic, A., Pozniakovski, A., Funabiki, H. 2004. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* **118**: 187-202.
167. Sánchez, P., Benítez, L. 2006. Procesos Biomoleculares de la Resistencia a drogas. *Cancerología* **1**: 187-199.
168. Sandoval, M., Okuhama, N., Clark, M., Angeles, F.M., Lao, J. Bustamante, S., Miller, M.J. 2002. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. *J. Ethnopharmacol.* **80**: 121-129.
169. Sanna, M.G., Da Silva Correia, J., Ducrey, O., Lee, J., Nomoto, K., Scharantz, N., Deveraux, Q.L., y colaboradores. 2002. IAP suppression of apoptosis

involves distinct mechanisms: the AKT1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol. Cell Biol.* **22**: 1754-1766.

170. Sawyers, C.L. 2003. Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. *Genes. Dev.* **17**: 2998-3010.
171. Sevell, J., Hogg, N., Ren, Y., Haslett, C. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptors in macrophages recognition of neutrophils undergo apoptosis. *J. Clin. Invest.* **90**: 1513-1522.
172. Shi Y. 2004. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell* **117**: 855-858.
173. Shi, Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol. Cell* **9**: 459-470.
174. Shukla, Y., Pal, S.K. 2004. Complementary and alternative cancer therapies: past, present and future scenario. *Asian. Pac. J. Cancer P.* **5**: 3-14.
175. Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. 2012. Cancer Statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* **62**: 10-29
176. Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G. y colaboradores. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.* **144**: 281-292
177. Sommer, K.W., Schamberger, C.J., Schmidt, G.E., Sasgary, S., Cerni, C. 2003. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) Survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. *Oncogene* **22**: 4266-4280.

178. Stennicke, H.R., Ryan, C.A., Salvesen, G.S. 2002. Reprieval from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends. Biochem. Sci.* **27**: 94-101.
179. Stepien, A., Izdebska, M., Grzanka, A. 2007. The types of cell death. *Postepy. Hig. Med. Dosw.* **61**: 420-428.
180. Stiles, B.L. 2009. PI-3-K and AKT: Onto the mitochondria. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **61**: 1276–1282.
181. Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M. 2000. Apoptosis signalling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 217-245
182. Suárez, A., Chávez, K., Mateu, E., Compagnone, R., Muñoz, A., Sojo, F., Arvelo, F. y colaboradores. 2009. Cytotoxic activity of seco-*ent*-kaurenes from *Croton caracasana* on human cancer cell lines. *Nat. Prod. Commun.* **4**: 1547-1550.
183. Suárez, A., Compagnone, R., Salazar, M., Tillet, S., Delle, F., Di Giulio, C., Bruges, G. 2003. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* **88**: 11-14.
184. Suárez, A.I., Chavez, K., Monache, F., Vasquez, L., Delannoy, D., Orsini, G., Compagnone R. 2008. New 3,4-seco-*ent*-Kaurenes from *Croton caracasana* Flowers. *Nat. Prod. Commun.* **3**: 319 – 322.
185. Suen, D.F., Norris, K.L., Youle, R.J. 2008. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* **22**:1577-1590.
186. Suh, J., Payvandi, F., Edelstein, L., Amenta, P., Zong, W., Gelinias, C., Rabson, A. 2002. Mechanisms of constitutive NF-kappa B activation in human prostate cancer cells. *Prostate* **52**: 183-200.

187. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., y colaboradores. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**: 441–446
188. Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F., Legault, J. 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol.* **103**: 99-102.
189. Tait, J.F., Gibson, D., Fujikawa, K. 1989. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J. Biol. Chem.* **264**: 7944–7949.
190. Tait, S., Green, D. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**: 621-632.
191. Takaray, K., Haribe, S., Obata, Y. 2005. Effects of 19 herbal extracts on the sensitivity to Paclitaxel or 5-fluracil in HeLa cells. *Bio. Pharm. Bull.* **28**: 138-142.
192. Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T., Reed, J.C. 1998. IAP family protein Survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* **58**: 5315-5320.
193. Taraphdar, A., Roy, M., Bhattacharya, R.K. 2001. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. *Curr. Sci. India* **80**: 1387-1396.
194. Taylor, R., Cullen, S.P, Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 231-241.

195. Thomas, S., y Shan, G. 2005 Calcitonin Induces Apoptosis Resistance in Prostate Cancer Cell Lines Against Cytotoxic Drugs via the Akt/Survivin Pathway. *Cancer Biol. Ther.* **4**: 1226-1233.
196. Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**: 1312-1316.
197. Toser, A., Yoeli-Lerner, M. 2006. Akt signaling and cancer: surviving but no moving on. *Cancer Res.* **66**: 3963-3966.
198. Vaira, V., Lee, C.W., Goel, H.L., Bosari, S., Languino, L.R., Altieri, D.C. 2007. Regulation of Survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene* **26**: 2678-2684.
199. Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Verma, I.M., Green, D.R. 1998. Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Trends. Cell Biol.* **8**: 107-111.
200. Van Engeland, M., Nieland, L., Ramaekers, F., Schutte, B., Reutelingsperger, C. 1998. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytom. Part. A* **31**: 1-9
201. Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Schumacker, P.T., Tompson, C.B. 1999. Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange. *Mol. Cell* **3**: 159-167.
202. Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., Tompson, C.B. 1997. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* **91**: 627-637.
203. Vander Heiden, M.G., Tompson, C.B. 1999. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?. *Nat. Cell Biol.* **1**: E209-E216.

204. Varfolomeev, E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J., Mett, I., Rebrikov, D. y colaboradores. 1998. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Cell Immunity*. **9**: 267–276.
205. Vaux, D.L. 1993. Toward understanding of the molecular mechanism of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 786-789.
206. Velazco, A., Lorenzo P., Serrano, J., Fernando, A. 1996. Farmacología. Capítulo 4. McGraw-Hill-Interamericana de España.
207. Vyssokikh, M.Y., Brdiczka D. 2003. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochem*. **50**: 389–404.
208. Wade, J.R. 2006. Química Orgánica. Ed. Pearson Educación. 5<sup>ta</sup> Edición.
209. Walensky, D.C. 2006. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ*. **13**: 1339–1350.
210. Walker, J.M. 2002. Protein Protocol Handbook. Segunda Edición. *Human Press*. Totowa, N.J.
211. Wheatley, S.P., Carvalho, A., Vagnarelli, P., Earnshaw, W.C. 2001. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr. Biol*. **11**: 886-890.
212. Whiteside, G. y Munglani, R. 1998. TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labeling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections an update. *Brain Res. Protoc*. **3**: 52–53.

213. Whiteside, G., Cougnon, N., Hunt, S.P., Munglani, R. 1998. An improved method for detection of apoptosis in tissue sections and cell culture, using the TUNEL technique combined with Hoechst stain. *Brain Res. Protoc.* **2**: 160–164.
214. Willingham, M. 1999. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* **47**: 1101–1109.
215. Yao, R., Cooper, G.M. 1995. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* **267**: 2003–2006.
216. Yasuda, M., Umemura, S., Osamura, R.Y., Kenjo, T., Tsutsumi, Y. 1995. Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method. *Arch. Histol. Cytol.* **58**: 185–190.
217. You, L., He, B., Xu, Z., Uematsu, K., Mazieres, J., Mikami, I., Reguart, N., y colaboradores. 2004. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* **23**: 6170–6174.
218. Zhao, J., Tenev, T., Martins, L.M., Downward, J., Lemoine, N.R. 2000. The ubiquitin-proteasome pathway regulates Survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.* **23**: 4363–4371.
219. Zhivotovsky, B., Orrenius, S. 2001. Current Concepts in Cell Death. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Cap 18:Unit 18.1
220. Zhou, B.P., Hung, M.C. 2002. Novel targets of Akt, p21(Cip1/WAF1), and MDM2. *Semin. Oncol.* **29**: 62–70.

221. Zhou, M., Gu, L., Li, F., Zhu, Y., Woods, W.G., Findley, H.W. 2002. DNA damage induces a novel p53-Survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**: 124-131.

**Consulta en línea:**

1. Maldonado, A., Jorrín, J., [En línea] Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*. Depto Bioquímica y Biol. Mol., Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba 2003. <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf> [consulta 10 octubre de 2012].
2. [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Akt\\_PKB.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Akt_PKB.html) [Consulta: 8 octubre de 2013].