



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

*CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE  
MUERTE CELULAR INDUCIDO POR LOS  
DERIVADOS  
BISACILIMIDOSELENOCARBAMATO*

*Iranzu Lamberto Pérez*





Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR  
LOS DERIVADOS BISACILIMIDOSELENOCARBAMATO

Memoria presentada por D<sup>a</sup> Iranzu Lamberto Pérez para aspirar al grado de  
Doctor por la Universidad de Navarra.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de  
Química Orgánica y Farmacéutica y autorizo su presentación ante el Tribunal  
que lo ha de juzgar.

Pamplona, 19 de Junio de 2012

Dr. Juan Antonio Palop Cubillo

Dr. Ignacio José Encío Martínez



*“Never stop dreaming. What seemed impossible yesterday can become a reality tomorrow”*

*(Charles L. Schepens)*



## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis doctoral, me ha supuesto un esfuerzo y una dedicación que sin la ayuda de mucha gente hoy no hubiera sido posible llevarla a cabo. Durante estos años de trabajo son muchas las personas e instituciones que han participado y quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada. Quiero expresar mi agradecimiento:

A la Universidad de Navarra, en especial a las Facultades de Ciencias y Farmacia, por su formación y por darme la oportunidad de poder realizar este trabajo.

Al Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra por su disponibilidad y sus instalaciones.

Al Gobierno de Navarra y al Proyecto de la CAN, por la financiación recibida durante estos años.

A mis directores de tesis, Dr. Juan Antonio Palop y Dr. Ignacio Encío, mi más sincero agradecimiento por su generosidad al brindarme esta oportunidad. El apoyo y confianza recibida en el desarrollo de esta tesis y en mi formación como investigadora.

A la Dra. Carmen Sanmartin por haberme ayudado en todo momento y su apoyo incondicional en este proyecto.

A la Dra. María Font por su ayuda y su aportación a la consolidación de las bases para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Ángel Cid-Arregui por darme la oportunidad de introducirme en el mundo de la investigación, por sus consejos y por creer en mí.

A Carmen Elizalde, por su ayuda y su cariño, por hacerme sentir como en casa. Por los buenos momentos vividos, que siempre quedarán en mi memoria, gracias.

A Rosa Jiménez, por su compañía en el laboratorio y su cariño recibido.

Para todos mis compañer@s del departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra (Adeli, Aleix, Álvaro, Ana, Carlos, Elsa, Gali, Gorka, Guillermo, Gurbindo, Laura, Mikel, Ner, Roberto, Saioa, Silvia P., Torres), en especial a mis compañer@s de grupo (Bea, Dani, Elena, Enrique, Esther, Marta, Pilar, Vero, Xandra, Ylenia), sólo tengo palabras de agradecimiento, con los cuales he compartido incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos momentos, por aguantarme y por escucharme.

Gracias a Esther y a Ylenia por vuestra ayuda y amistad que no tiene precio. Y sobre todo a mi compañera de fatigas, Ylenia, por aguantarme a todas horas y por su compañía en numerosas vivencias increíbles, con o sin dramas.

A mis compañer@s del departamento de ciencias de la salud de la Universidad Pública de Navarra (Idoia, Irantzu, Ion, Mirja, María, M<sup>a</sup> José, Iván, Ronces) por su apoyo y consejo, y sobre todo por su amistad, por hacerme sentir una más.

Para tod@s aquell@s amig@s que han compartido conmigo los “ires y venires” en el plano personal durante toda mi vida, aportándome enriquecedoras experiencias y ayudándome a superar todo tipo de retos. A mis amigas de Larraga (Andrea, Cecilia, Desi, Esther, Irene, IsaG, IsaV, Leire, Maite B., Maite O., María, Marina, Miriam) por acompañarme en todo momento, sin ningún tipo de reparo, contando siempre con su confianza y lealtad. A mis amig@s de la Universidad (Berta, Fuen, Haizea, Mainer G., Mainer I., María S., Mariví, Noe, Rachel, Teresa...), por haberme acompañado en los mejores años de mi vida. A mis compañeras de piso (Amaia, Ana, Hanna y Lucía) que me han soportado en los buenos y malos momentos durante estos años. De tod@s ell@s me quedo con su cariño infinito y las experiencias vividas, y las que quedan!!

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido es para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración incondicional no habría sido posible llevar a cabo esta dura y enriquecedora experiencia. A mis padres, por su ejemplo de lucha y honestidad, por su amor, cariño y comprensión; a mi hermana María por su cariño, paciencia, generosidad, valentía y capacidad de superación. A Benedicto, por ser un ejemplo de optimismo e inspiración, y darme su afecto como un hermano más. A mi abuela Albina, por su consejo y apoyo. Por ell@s y para ell@s!!

*A mis padres*

*A mi hermana*



## ABREVIATURAS

- Akt:** Protein quinasa B (*Protein Kinase B*)
- Apaf-1:** Factor activador de proteasa apoptótica 1 (*Apoptotic Peptidase Activating Factor 1*)
- ATCC:** *American Type Culture Collection*
- ATM:** Ataxia telangiectasia mutada (*Mutated in Ataxia Telangiectasia*)
- ATP:** Adenosin trifosfato (*Adenosine Triphosphate*)
- ATR:** Kinasa de La ataxia telangiectasia y Rad3 relacionados (*ATM-Related Kinase*)
- Bax:** Proteína X asociada a Bcl-2 (*Bcl-2-associated X protein*)
- Bcl-2:** Linfoma de células B/leucemia-2 (*B-Cell Lymphoma/Leukaemia-2*)
- Bid:** Interacción de dominio BH3 agonista de la muerte (*BH3-Interacting Domain Death Agonist*)
- BRUCE:** (*BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme*)
- BSC:** Derivados Bisacilimidóselenocarbamato
- CARD:** Dominio de reclutamiento de caspasas (*Caspase recruitment domain*)
- CCRF-CEM:** Leucemia aguda T-linfoblástica
- Cdk:** Quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin-Dependant Protein Kinase*)
- CH<sub>3</sub>Se:** Metilseleno
- CH<sub>3</sub>SeH:** Metilselenol
- Chk2:** Kinasa Del punto de control 2 (*Checkpoint Kinase 2*)
- Cip/Kip:** (*Cdk Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein*)
- CKIs:** Proteína Inhibidora de proteína quinasas dependientes de ciclina (*Cyclin-Dependant Protein Kinases Inhibitor*)
- CM-H<sub>2</sub>DCFDA:** 5-(y 6-) carboxi-2'7'-diclorodihidrofluoresceína (5-(and-6)-carboxy-2'7'-*Dichlorodihydrofluorescein Diacetate*)
- DD:** Dominio de muerte (*Death Domain*)
- DED:** Dominio efector de muerte (*Effector Death Domain*)
- DEVD-AMC:** Ácido Asp-Glu-Val-Asp (DEVD) -7-amino-4-metilcumarina (*Ac-Asp-Glu-Val-Asp (DEVD)-7-Amino-4-methylcoumarin*)
- DFF:** Factor de fragmentación de DNA (*DNA Fragmentation Factor*)

**DMEM:** Medio Dulbecco modificado Eagle (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

**DMSO:** Dimetil sulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*)

**DNA:** Ácido desoxirribunucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

**DTT:** Ditiotreitól (*Dithiothreitol*)

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermic Grow Factor*)

**EMEM:** Medio mínimo esencial Eagle (*Eagle's Minimal Essential Medium*)

**FADD:** Dominio de muerte asociado a Fas (*Fas-associated protein with a death domain*)

**FBS:** Suero bovino fetal (*Fetal Bovine Serum*)

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)

**GI<sub>50</sub>:** Concentración que inhibe el 50% del crecimiento de las células (*Growth Inhibition 50%*)

**GSH:** Glutathion (*Glutathione*)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrógeno

**H<sub>2</sub>Se:** Seleniuro de hidrógeno

**HPETES:** Ácidos hidroperoxi-eicosatetraenoico (*Hydroperoxyeicosatetraenoic Acids*)

**HT-29:** Adenocarcinoma de colon

**HTB-54:** Adenocarcinoma epidermoidal de pulmón

**IAPs:** Proteínas inhibidoras de apoptosis (*Inhibitor Apoptosis Proteins*)

**IETD-AMC:** Ácido Ile-Glu-Thr-Asp (IETD)-7-amino-4-metilcumarina (*Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-7-Amino-4-methylcoumarin*)

**ILP2:** *IAP Like Protein 2*

**IP:** Ioduro de Propidio

**LEHD-AMC:** Ácido Leu-Glu-His-Asp (LEHD)- 7-amino-4-metilcumarina (*Ac-Leu-Glu-His-Asp-7-Amino-4-methylcoumarin*)

**LD<sub>50</sub>:** Concentración que mata el 50% de las células (*Lethal Dosis 50%*)

**MCF-7:** Adenocarcinoma de mama

**MMP:** Potencial de membrana mitocondrial (*Mitochondrial Membrane Potential*)

**MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*)

**MOMP:** Potencial de membrana externa mitocondrial (*Mitochondrial Outer Membrane Potential*)

**MSA:** Ácido metilselenínico (*Methylseleninic Acid*)

**NAIP:** Proteína neuronal inhibitoria de apoptosis (*Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein*)

**NaN<sub>3</sub>:** Ázida sódica

**NCCD:** Comité de nomenclatura de muerte celular (*Nomenclature Committee on Cell Death*)

**NF-κB:** Factor nuclear κ-B (*Nuclear Factor κ-B*)

**PARP:** Poli-(ADP-ribosa) polimerasa (*Poly ADP (Adenosine Diphosphate)-Ribose Polymerase*)

**PBS:** Tampón de sales de fosfato (*Phosphate buffer solution*)

**PC-3:** Adenocarcinoma de próstata

**PCD:** Muerte celular programada (*Programmed Cell Death*)

**PCNA:** Proliferación del antígeno nuclear celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

**PIDD:** Proteína con dominio de muerte inducida por p53 (*p53-induced protein with a death domain*)

**PUMA:** (*p53 Upregulated Modulator of Apoptosis*)

**RAIDD:** Receptor asociado a interleuquina con el DD (*Receptor interacting protein-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a DD*)

**RNA:** Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

**ROS:** Radicales libres de oxígeno (*Radical Oxygen Species*)

**r.p.m:** Revoluciones por minuto

**SeC:** Selenocisteína (*SelenoCysteine*)

**SD:** Desviación estándar (*Standard Deviation*)

**SDS:** Dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

**SEM:** Error típico (*Standard Error of the Mean*)

**SeL:** Selenito de sodio

**SeM:** Selenometionina (*SelenoMethionine*)

**SeMC:** Selenometilcisteína (*SelenoMethylCysteine*)

**SIDA:** Síndrome de Immunodeficiencia Adquirida

**siRNA:** ARN pequeño de interferencia (*small interfering RNA*)

**tBid:** Fragmento truncado de la proteína Bid (*truncated Bid*)

**TdT:** Desoxinucleotidil transferasa terminal (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*)

**TGI:** Concentración que inhibe totalmente el crecimiento de las células (*Total Growth Inhibition*)

**TNF:** Factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)

**TNRF-1:** Receptor 1 del factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1*)

**TRAIL:** Ligando de apoptosis inducida por el receptor de TNF (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)

**TUNEL:** Marcado del extremo libre dUTP por TDT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*)

**UBA:** Dominio ubiquitina asociada (*Ubiquitin B Associated*)

**VDAD-AMC:** Ácido Asp-Glu-Val-Asp-(VDAD)-7-amino-4-metilcumarina (*Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-methylcoumarin*)

**z-VAD-fmk:** Benciloxicarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona (*Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone*)

**184B5:** Células de glándula mamaria derivadas de células no-malignas

# ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Cáncer .....	3
2. Desarrollo de nuevos quimioterápicos .....	8
2.1 Selenio.....	9
3. Muerte celular programada .....	13
4. Apoptosis.....	16
4.1 Alteraciones morfológicas y bioquímicas .....	16
4.2 Caspasas .....	17
4.3 Vías de activación de apoptosis .....	20
4.4 Radicales libres de oxígeno y apoptosis.....	25
5. Ciclo celular .....	27
5.1 Fases del ciclo celular .....	27
5.2 Regulación del ciclo celular.....	28
6. Papel de p53: Control de la proliferación y la muerte celular .....	31
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
1. BSC: nueva serie de compuestos químicos con actividad antitumoral .....	39
2. Cultivo celular .....	40
3. Ensayos de citotoxicidad.....	41
4. Detección de apoptosis.....	43
5. Análisis del ciclo celular .....	46
6. Medida de los niveles intracelulares de ROS.....	47
7. Análisis de la activación de las caspasas.....	47
8. Inhibidor de caspasas .....	48
9. Análisis de la expresión de las proteínas reguladoras .....	49
10. Medición de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial.....	53
11. Análisis estadístico.....	54
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
1. Resultados de citotoxicidad.....	57
2. Los compuestos BSC inducen apoptosis .....	59
2.1 Determinación de apoptosis en CCRF-CEM y MCF-7.....	60
2.2 Determinación de apoptosis en MCF-7 a diferentes tiempos y concentraciones .....	62
3. Los derivados BSC inducen alteraciones en la mitocondria .....	67
3.1 Los derivados 3g y 3n provocan disipación de $\Delta\Psi_m$ .....	67
3.2 Los derivados 3g y 3n provocan estrés oxidativo en las células MCF-7 .....	68
3.3 Los derivados BSC inducen cambios en la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bid .	69

3.4	Los BSC inducen activación de caspasa-2 en las células MCF-7 .....	72
3.5	Efecto de z-VAD-fmk en el proceso de muerte celular inducido por los BSC .....	73
4.	Los BSC inducen alteraciones en el ciclo celular .....	74
5.	Efectos de los BSC en la expresión de las proteínas implicadas en la regulación de la muerte celular y ciclo celular .....	78
5.1	Los compuestos BSC disminuyen la expresión de las Cdk1 y Cdk2 .....	78
5.2	Los compuestos BSC no alteran la expresión de las ciclinas A y B1 .....	81
5.3	Los compuestos BSC inducen alteraciones en la expresión de la proteína p21 <sup>CIP</sup> ....	83
5.4	Los compuestos BSC no alteran la expresión de p53 .....	85
5.5	Los compuestos BSC inducen una disminución de la expresión de Chk2.....	86
<b>DISCUSIÓN.....</b>		<b>89</b>
1.	Caracterización del proceso de muerte celular inducido por BSC .....	91
1.1	Efecto de los derivados BSC en la mitocondria .....	92
1.2	Efecto de los derivados BSC en el ciclo celular.....	95
1.3	El tratamiento con BSC no altera la expresión de p53.....	96
1.4	Efecto de los BSC en las proteínas reguladoras en el proceso del ciclo celular.....	97
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>107</b>
<b>ANEXO .....</b>		<b>127</b>

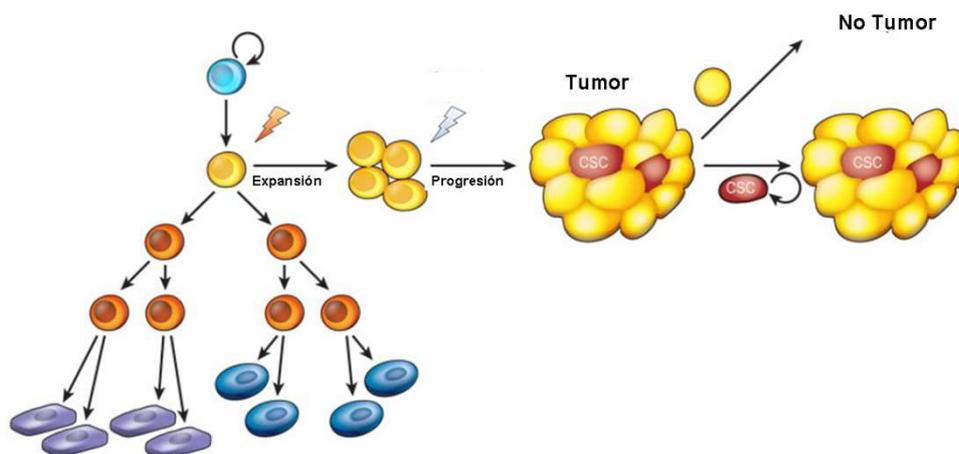
# **INTRODUCCIÓN**



## 1. CÁNCER

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo y puede llegar a convertirse en la causa más común en el futuro (Rizky, A., 2005). A pesar de los recientes avances en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer y del desarrollo de nuevas terapias para su tratamiento, esta enfermedad sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en el mundo civilizado (Debatin, K.M., 2006).

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células (Figura 1). Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. Esta división celular incontrolada da lugar a un tumor o nódulo. Cuando las células que constituyen dicho tumor no poseen la capacidad de invadir y destruir otros órganos, hablamos de tumores benignos. Pero cuando estas células además de crecer sin control sufren nuevas alteraciones y pueden invadir tejidos y órganos de alrededor (infiltración), y trasladarse y proliferar en otras partes del organismo (metástasis), hablamos de tumor maligno, que es a lo que llamamos cáncer. No en todos los cánceres aparece un nódulo. En las leucemias las células alteradas crecen e invaden la médula ósea. Con el tiempo, las células salen al exterior e invaden la sangre y otros órganos (www.aecc.es).



**Figura 1. Desarrollo del cáncer.** Imagen adaptada de Visvader, J.E., Cells of origin in cancer. *Nature*, 2011; 469(7330):314-22.

Muchos tipos de cáncer se podrían prevenir evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco. Además, un porcentaje importante de cánceres pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana (www.who.int/es).

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad y el número total de casos está aumentando en todo el mundo. Se prevé que, a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% entre 2007 y 2030 (pasará de 7,9 millones a 11,5 millones de defunciones), debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población. En las estimaciones se han tenido en cuenta las ligeras reducciones previstas de la mortalidad por algunos tipos de cáncer en países con grandes recursos. Se estima que durante el mismo periodo el número de nuevos casos de cáncer aumentará de 11,3 millones en 2007 a 15,5 millones en 2030. En la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa principal de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, y los datos epidemiológicos muestran el comienzo de esta tendencia en el mundo menos desarrollado, en particular en los países «en transición» y países de ingresos medianos, por ejemplo en América del Sur y Asia. Más de la mitad de los casos de cáncer se registran ya en países en desarrollo (www.who.int/es) (Figura 2).

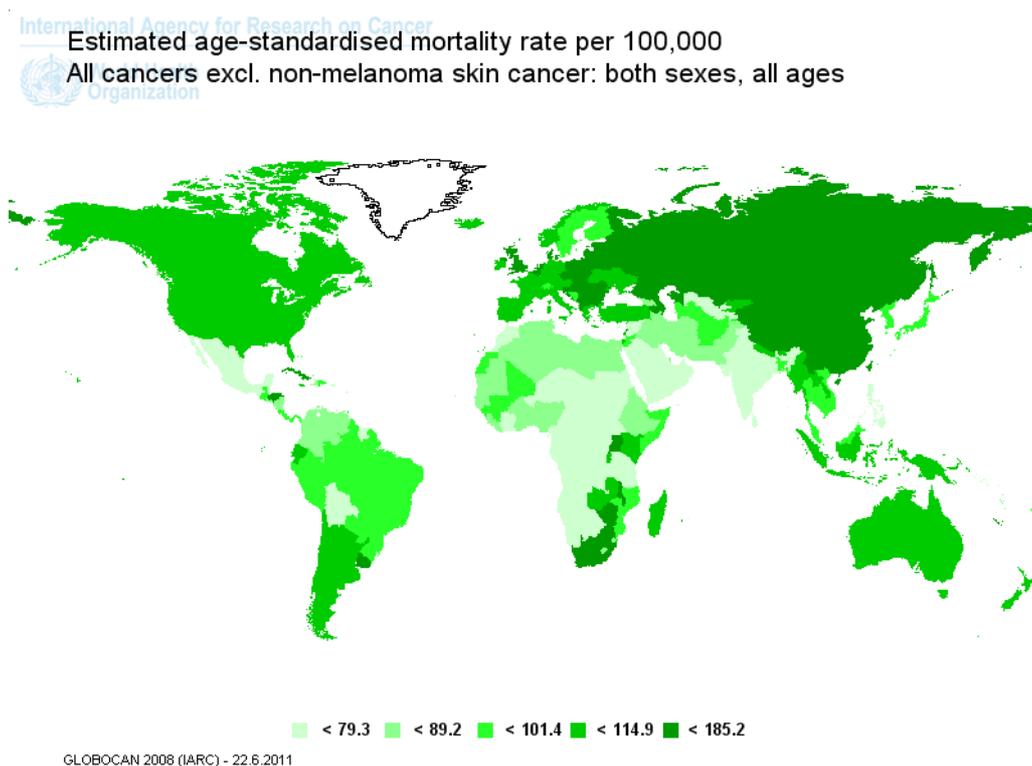


Figura 2. Mapa de mortalidad de cáncer según países. Imagen tomada de GLOBOCAN 2008.

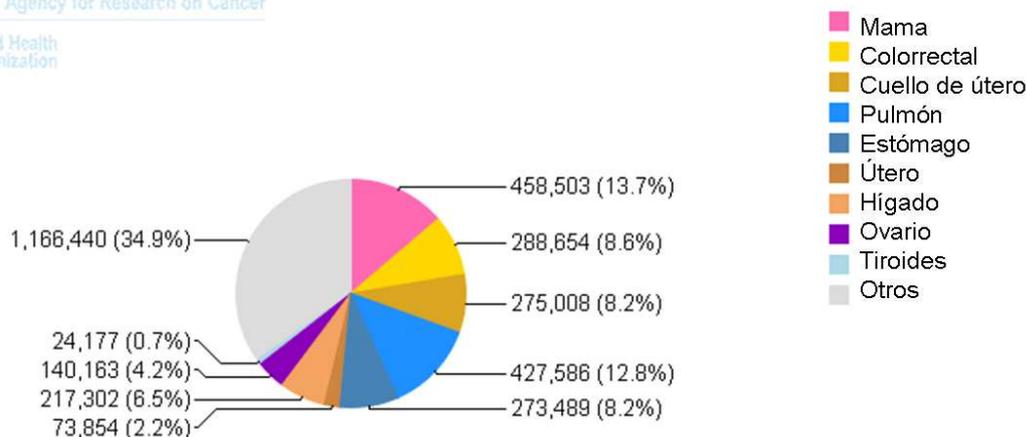
Los principales tipos de cáncer son los siguientes ( [www.who.int/es](http://www.who.int/es)):

- pulmonar (1,4 millones de defunciones);
- gástrico (740.000 de defunciones);
- hepático (700.000 de defunciones);
- colorrectal (610.000 de defunciones);
- mamario (460.000 de defunciones).

El cáncer de pulmón mata a un mayor número de gente que cualquier otro tipo de cáncer, y se prevé un aumento de esta tendencia hasta 2030 a menos que se intensifiquen las actividades de control mundial del tabaquismo. Algunos tipos de cáncer, como los de próstata, mama y colon, son más frecuentes en los países desarrollados. Otros tipos de cáncer, como los de hígado, estómago y cuello uterino, son más frecuentes en los países en desarrollo ( [www.who.int/es](http://www.who.int/es)).

Los tipos de cáncer más frecuentes en mujeres son los de mama, cérvix, colorrectal y pulmón (Figura 3). En hombres son los de pulmón, próstata, estómago y colorrectal (Figura 4) ( [www.who.int/es](http://www.who.int/es)).

International Agency for Research on Cancer



**Figura 3. Mortalidad de cáncer en mujeres.** Imagen adaptada de GLOBOCAN 2008.

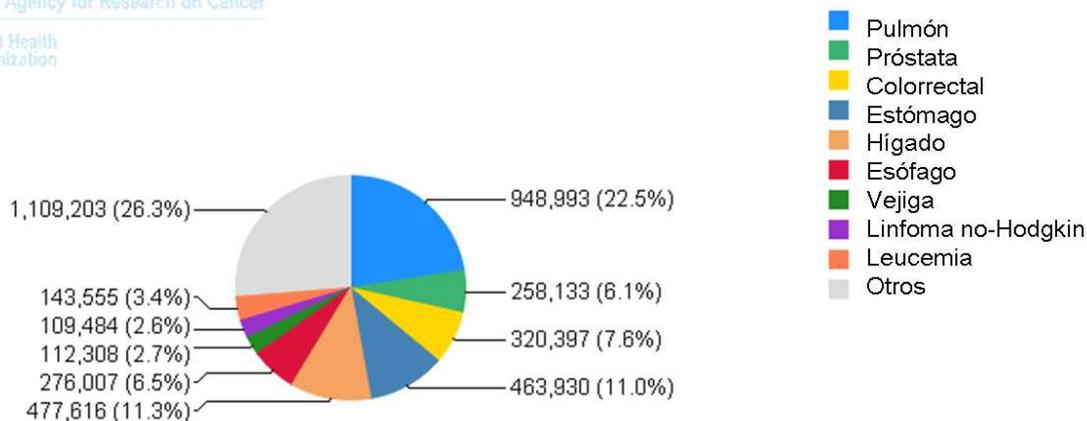


Figura 4. Mortalidad de cáncer en hombres. Imagen adaptada de GLOBOCAN 2008.

La aparición de cáncer se ha asociado a varios factores de riesgo comunes, a saber:

- un modo de vida poco sano (consumo de tabaco y alcohol, dieta inadecuada, falta de actividad física).
- exposición a carcinógenos (por ejemplo amianto) en el entorno laboral o en el medio ambiente (por ejemplo por contaminación del aire en locales cerrados).
- radiación (por ejemplo ultravioleta o ionizante) y algunas infecciones (por ejemplo hepatitis B o infección por virus del papiloma humano) ([www.who.int/es](http://www.who.int/es)).

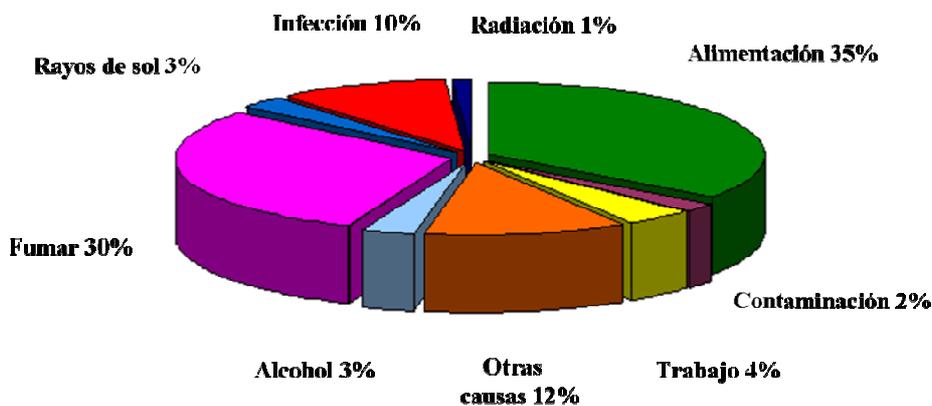


Figura 5. Factores de Riesgo asociados a cáncer.

El envejecimiento es otro factor común en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad ([www.who.int/es](http://www.who.int/es)).

Los avances científicos y tecnológicos de los últimos años han proporcionado nuevos conocimientos sobre la aparición, desarrollo y crecimiento del cáncer, lo que se traduce en una mejora de los diagnósticos, de los tratamientos de la enfermedad y una disminución de los efectos secundarios derivados de ellos (Rosenthal, S.A., 2009).

Las principales modalidades de tratamiento son cirugía, radioterapia y quimioterapia. Aunque, también puede administrarse otro tipo de terapias específicas para algunos tumores como la hormonoterapia, la inmunoterapia, el tratamiento con láser, la crioterapia, la terapia génica, etc. (www.cancerquest.org). El empleo de una u otra terapia depende del tipo de cáncer y del paciente. Los mejores resultados son obtenidos de la combinación de una terapia local (cirugía, radioterapia) y otra sistémica (quimioterapia), la cual puede acceder a todas las células tumorales que se hayan desarrollado y diseminado en el organismo.

Los agentes quimioterápicos son una gran variedad de fármacos (agentes químicos citotóxicos) capaces de destruir las células cancerígenas que componen el tumor con el fin de reducir y/o eliminar la enfermedad y pueden utilizarse separadamente como monoterapia o bien en combinación (Klimes, D., 2009).

Los compuestos quimioterápicos que se emplean en el tratamiento del cáncer pueden ser divididos en distintos grupos (Flórez, J., 2008):

- Fármacos antimetabolitos: actúan en la fase de síntesis del ciclo celular porque interfieren en la síntesis de DNA y RNA. La mayoría son análogos estructurales de los metabolitos. Normalmente, interfieren en los procesos de crecimiento y división, razón por la que se pueden incorporar a las moléculas de DNA y RNA, y desde allí transmitir falsos mensajes. Otros inhiben enzimas específicas necesarias para la síntesis de compuestos esenciales. Su eficacia, en general, es máxima cuando la proliferación celular es rápida.

- Productos naturales:

- a) *Inhibidores de la mitosis*. Ejercen su acción citotóxica porque, tras unirse a la tubulina, inhiben la mitosis. La acción en los microtúbulos varía: pueden inhibir su formación (alcaloides de la *Vinca*) o, por el contrario, incrementarla y estabilizarla haciéndola poco funcional (taxanos). Son activos en una determinada fase del ciclo celular, provocando su cese en metafase.

b) *Inhibidores de topoisomerasas*. El alcaloide de planta camptotecina y sus análogos topotecán e irinotecán, inhiben la topoisomerasa I. La topoisomerasa II es inhibida por los derivados de la podofilotoxina (etopósido y tenipósido) y por antibióticos antraciclínicos (daunorubicina y doxorubicina).

c) *Antibióticos*. Son de origen y estructura muy diversos y su mecanismo de acción también puede ser muy diferente: intercalarse entre cadenas de DNA, inhibir topoisomerasas y alterar la membrana celular. La mayoría no son específicos del ciclo celular.

d) *Enzimas*. La L-asparaginasa rompe el aminoácido asparagina, privando de su actividad a la célula que no es capaz de sintetizarlo.

- Agentes alquilantes y formadores de enlaces en el DNA: Los agentes alquilantes muestran gran afinidad por el DNA y las proteínas, a los que adicionan sus radicales altamente reactivos. Así, producen enlaces entre cadenas de DNA y otras transformaciones, impidiendo su replicación y transcripción de RNA. Su acción tiene lugar en cualquier fase del ciclo y su toxicidad puede ser diferida en forma de trastornos gonadales y carcinogénesis. Los principales son: las mostazas nitrogenadas, como la mecloretamina y el clorambucilo entre otros; alquilsulfonatos, como el busulfano; las nitrosoureas, como la cloroetilnitrosourea, lomustina o carmustina; y otros alquilantes atípicos, como la dacarbazina y procarbazona.

- Diversas hormonas (hipotalámicas, glucocorticoides, andrógenos, estrógenos y gestágenos) y sus correspondientes antagonistas son muy eficaces en tumores hormonodependientes.

## 2. DESARROLLO DE NUEVOS QUIMIOTERÁPICOS

A pesar de los avances, los medicamentos quimioterápicos de los que se dispone en la actualidad tienen una eficacia limitada y carecen de una verdadera especificidad por las células tumorales. Estos fármacos son activos no sólo sobre las células tumorales, sino también sobre las células normales, dando lugar a una citotoxicidad que limita el tratamiento con los mismos. El descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos útiles en el tratamiento del cáncer es uno de los principales retos, ya que en los últimos años se ha observado un declive en la producción de agentes quimioterápicos que proporcionen un avance clínico lo suficientemente importante para que su uso sea aprobado.

## **2.1 Selenio**

Hace cuatro décadas, el selenio (Se) pasó de considerarse un oligoelemento altamente tóxico a clasificarlo como un mineral esencial al comprobar en estudios geográficos que las zonas con menor incidencia de cáncer correspondían a regiones con altos niveles de selenio en el suelo (Shamberger, R.J., 1969; Brozmanová, J., 2010). Desde entonces, un gran número de evidencias indican que el selenio juega un papel importante en la prevención del cáncer (Combs G.F. Jr, 1998; Whanger, P.D., 2004; Rayman, M.P., 2005; Chen, T., 2009).

Aunque su modo de acción anticancerosa no es aún del todo conocido, se han propuesto diversos mecanismos, como el de protección antioxidante de las selenoenzimas, la inhibición específica del crecimiento celular del tumor por metabolitos de Se, la modulación del ciclo celular y la apoptosis, y el efecto en la reparación del DNA. Además, recientes estudios sugieren que el selenio tiene un potencial que no solo se emplea en la prevención del cáncer, sino que también en el tratamiento contra el cáncer donde en combinación con otras drogas antitumorales o radiación, puede incrementar la eficacia de la terapia contra el cáncer ( Brozmanová, J., 2010).

El selenio por sí mismo no es anticanceroso. La actividad biológica del selenio es resultado de la acción de una gran variedad de metabolitos de selenio. Este efecto no es organoespecífico, ya que se ha documentado inhibición tumoral en la glándula mamaria, hígado, piel, páncreas, esófago, colon, próstata y en algún otro tejido. Se ha comprobado también que pequeñas modificaciones en la estructura de los compuestos pueden tener efectos sorprendentes en la actividad biológica (Chen, T., 2009).

La efectividad de los compuestos de selenio como agentes quimiopreventivos parece que está relacionada con el papel que juegan en la regulación del ciclo celular, ya que estimulan la apoptosis e inhiben la migración de células tumorales evitando que invadan otros tejidos sanos (Zeng, H., 2008).

Los niveles de selenio en la dieta pueden prevenir muchos tipos de cáncer. El efecto de los compuestos de selenio en las células es dependiente de la concentración y de la composición. A altas concentraciones, los compuestos de selenio pueden ser tanto citotóxicos como posibles carcinogénicos (Spallholz, J.E., 1994). Por el contrario, niveles bajos de selenio pueden dar diferentes patologías como alteraciones cardiovasculares, problemas articulares y musculares, etc. (Finley, J.W., 1998).

Además, el estado del selenio y la variación genética de pruebas individuales podrían representar razones adicionales para los resultados negativos (Hurst and Fairweather-Tait 2009; Platz and Lippman 2009; Rayman et al. 2009). Sin embargo, la mayoría de los estudios en animales han mostrado que tanto los compuestos orgánicos como los inorgánicos de selenio son capaces de reducir el tumor producido por dosis más altas de las necesarias en la dieta diaria. El selenio ha mostrado inhibición específica del crecimiento celular y estimulación de programas de muerte celular en modelos de cultivo de células cancerígenas. Todos estos resultados han estimulado un gran interés en el mecanismo por el cual el selenio puede influir en los procesos relacionados con la prevención, inducción e inhibición de la carcinogénesis. Mientras la mayoría de las investigaciones del selenio han focalizado su papel como nutriente en la quimiopreención, se ha prestado menos atención a sus efectos tóxicos que podrían representar una herramienta para combatir el cáncer (Brozmanová, J., 2010).

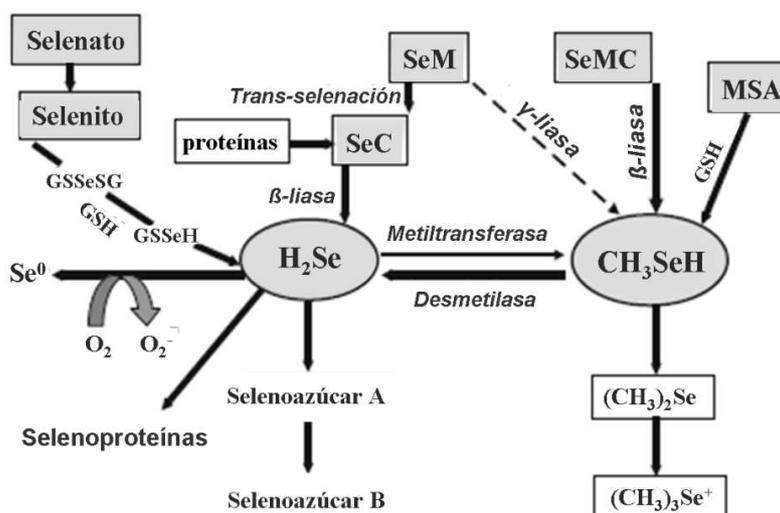
El selenio puede presentar muchos tipos de actividades antitumorales dependiendo de la dosis en la que se encuentre. Estas actividades pueden ser ejecutadas por algunas enzimas dependientes de selenio (*selenoproteínas*), en dosis bajas, o por determinados metabolitos de selenio ( $\text{CH}_3\text{SeH}$ ,  $\text{H}_2\text{Se}$ ) generados en mayor cantidad cuanto mayor es la dosis del elemento (Juang, S.H., 2007).

En la lucha contra las células cancerosas, el selenio actúa tanto como pro-oxidante como antioxidante, induciendo apoptosis por la generación de estrés oxidativo. Así, el compuesto inorgánico de selenio, el selenito de sodio (SeL), debido a su carácter de pro-oxidante, representa una prometedora alternativa para la terapia del cáncer (Brozmanová, J., 2010).

Hay una clara evidencia de que el cáncer y otras enfermedades relacionadas con una mutación pueden ser prevenidas no solo con evitar las exposiciones a los conocidos factores de riesgo sino también favoreciendo el consumo de factores protectores y con la modificación de las defensas y los mecanismos de reparación del DNA del organismo hospedador (Brozmanová, J., 2010). Numerosos estudios posteriores han indicado que el selenio podría contener unas propiedades quimiopreventivas importantes (Combs, G.F.Jr., 1998; Rayman, M.P., 2005). Los más señalados son los estudios de 1996, los cuales muestran un descenso en la incidencia de cáncer de próstata, pulmón y colorrectal en el grupo de americanos mayores con suplemento de selenio (Clark, L.C., 1996).

La suplementación con selenio a bajas dosis muestran no solo beneficios para la prevención del cáncer, pero puede influir positivamente a muchas otras funciones en el organismo para la reducción de la inflamación, enfermedades cardiovasculares y regulación de la presión sanguínea (Brozmanová, J., 2010).

Las formas tanto orgánica como inorgánica de selenio pueden ser utilizadas como fuente nutricional o de suplemento de selenio. El selenito de sodio (SeL) fue el primer compuesto inorgánico de selenio empleado en estudios quimioterápicos. Lo encontramos raramente en la naturaleza y en concentraciones muy bajas. En presencia de glutathion (GSH), este compuesto es reducido a seleniuro de hidrógeno ( $H_2Se$ ) en varios pasos intermedios (Meuillet, E., 2004; Suzuki, K.T., 2007). Esta vía de reducción está rigurosamente conectada con la producción de radicales superóxidos ( $O_2^-$ ). Por otro lado, la forma orgánica del selenio está representada por los aminoácidos selenados, como la selenocisteína (SeC) y la selenometionina (SeM), o por aminoácidos metil selenados, como la selenometil selenocisteína (SeMC). La principal forma nutricional, SeM, no es un agente oxidante; sin embargo, estos metabolitos tienen un fuerte potencial oxidante (Schrauzer, G.N., 2000; Seitomer, E., 2008). La SeM es transformada en  $H_2Se$  o por trans-selenación por SeC seguido de una reacción  $\beta$ -liasa o directamente por una reacción  $\gamma$ -liasa en metilselenol ( $CH_3SeH$ ) seguido de una reacción de desmetilación; La SeC es transformada en  $H_2Se$  por la reacción  $\beta$ -liasa. La SeMC es adquirida por transformación en  $H_2Se$  por desmetilación. El ácido metilselenínico (MSA) es reducido a  $CH_3SeH$  y no necesita ser metabolizado por vía acción de la  $\beta$ -liasa (Ip, C. 2000; Brozmanová, J., 2010) (Figura 6).



**Figura 6. Metabolismo del selenio.** Imagen adaptada de Suzuki, K.T., Selenocysteine beta-lyase and methylselenol demethylase in the metabolism of Se-methylated selenocompounds into selenide. *Biochim Biophys*, 2007; 1770:1053–1061.

El  $\text{CH}_3\text{SeH}$  es un metabolito principal en la quimioprevención por selenio (Ip, C., 1998; Spallholz, J.E., 2004). Los compuestos de selenio monometilados, SeM y MSA, han mostrado tener mayor efectividad que otros compuestos de selenio en sus actividades quimiopreventivas. El  $\text{CH}_3\text{SeH}$  es un intermediario clave en la producción de  $\text{H}_2\text{Se}$  en el caso de los compuestos selenometilados, como  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$  y  $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$ , implicados en la excreción de niveles excesivos de selenio. El equilibrio entre  $\text{H}_2\text{Se}$  y  $\text{CH}_3\text{SeH}$  depende de las actividades de metilación y desmetilación, y también de la eliminación del selenio en forma de selenoproteínas y selenoazúcares derivados de  $\text{H}_2\text{Se}$ , como la eliminación de  $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$  y  $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$  derivados de  $\text{CH}_3\text{SeH}$ . La 1-Glutationilseleno-*N*-acetil-*D* galactosamina (Selenoazúcar A) es transformada en 1-metilseleno-*N*-acetyl-*D*-galactosamina (Selenoazúcar B) en los órganos (Suzuki, K.T., 2007).

La eficacia quimiopreventiva del átomo de selenio se demuestra en diversos estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales (Gurusamy, K., 2007; Ceung, E., 2008). La importancia del selenio en cáncer y la gran variedad de mecanismos por los cuales los selenocompuestos inhiben la carcinogénesis nos ha animado a desarrollar y probar *in vitro* las actividades citotóxica y antiproliferativa de nuevos compuestos que contienen en su estructura un átomo de selenio. Entre estos compuestos se encuentran los derivados bisacilimidosenocarbamato (BSC) (Plano, D., 2007), los selenodiazoles (Plano, D., 2009) y los derivados aril y heteroaril del ácido selenilacético (Sanmartin, C., 2009). Algunos de los selenodiazoles han mostrado una buena actividad antiproliferativa en células MCF-7, donde la 6-bromo[1,2,5]selenodiazol[3,4-b]piridina induce apoptosis y provoca una parada en el ciclo celular con una disminución significativa de la población celular en la fase  $G_0/G_1$  y un aumento en las fases S y  $G_2/M$  (Plano, D., 2009). Los derivados aril y heteroaril del ácido selenilacético también exhiben una actividad citotóxica y antiproliferativa importante en células MCF-7 y PC-3. Sin embargo, estudios preliminares con los ácidos benzoilseleniacéticos indicaron que su mecanismo de acción es independiente de la inducción de apoptosis y la modulación del ciclo celular (Sanmartin, C., 2009). Respecto a los derivados bisacilimidosenocarbamato (BSC), se ha analizado su actividad citotóxica en células de cáncer de próstata, PC-3, obteniendo buenos resultados (Plano, D., 2007).

### 3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA

El equilibrio entre la división celular y la muerte celular es de suma importancia para el desarrollo y mantenimiento de los organismos multicelulares. Los desórdenes de cualquiera de estos procesos tienen consecuencias patológicas y pueden llevar a una embriogénesis interrumpida, enfermedades neurodegenerativas o al desarrollo de cáncer. Por eso, el equilibrio entre la vida y la muerte es controlado rigurosamente, hasta el punto de que los elementos defectuosos pueden ser efectivamente eliminados por un proceso de muerte celular programada (PCD: “*programmed cell death*”) (Kerr, J.F., 1972; Bröker, L.E., 2005).

La muerte celular puede clasificarse según la apariencia morfológica (pueden ser apoptótica, necrótica, autofágica o asociada a mitosis), criterios enzimáticos (con o sin la implicación de nucleasas o de diferentes clases de proteasas, como caspasas, calpainas, catepsinas y transglutaminasas), aspectos funcionales (programado o accidental, fisiológico o patológico) o características inmunológicas (inmunogénico o no inmunogénico) (Kroemer, G., 2009). El Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (“*Nomenclature committee on Cell Death*”, NCCD) propuso una clasificación “oficial” de las modalidades de muerte celular (Galluzzi, L., 2007):

**Apoptosis:** En décadas pasadas, la PCD estuvo relacionada con la apoptosis, un proceso de muerte caracterizado por cambios morfológicos como el encogimiento de la célula, la condensación de la cromatina, y la desintergración de la célula en pequeños fragmentos, llamados “cuerpos apoptóticos”, que pueden ser eliminados por fagocitosis (Kerr, J.F., 1972; Bröker, L.E., 2005). El proceso de apoptosis va acompañado de la activación de las caspasas, la activación de algunas proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (MMP), la fragmentación del DNA y la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, entre otras (Galluzzi, L., 2007).

Mientras que la apoptosis es una muerte celular programada controlada, su homólogo conceptual, la necrosis, es una forma de morir más caótica, que se debe a circunstancias externas a la célula, y se caracteriza por un edema celular y la rotura de la membrana plasmática, llevando a la liberación de componentes celulares y a una respuesta inflamatoria del tejido (Kerr, J.F., 1972; Hirsch, T., 2000; Bröker, L.E., 2005).

La apoptosis se caracteriza por ser un proceso más ordenado y regulado desde el punto de vista bioquímico que la necrosis. En la figura 7 se observa las principales diferencias morfológicas y fisiológicas entre los dos tipos de muerte celular. Aún así, se considera que ambos procesos están relacionados y que pueden ser causados por un mismo estímulo, dependiendo de su intensidad, del tipo celular afectado y del estado en que se encuentra.

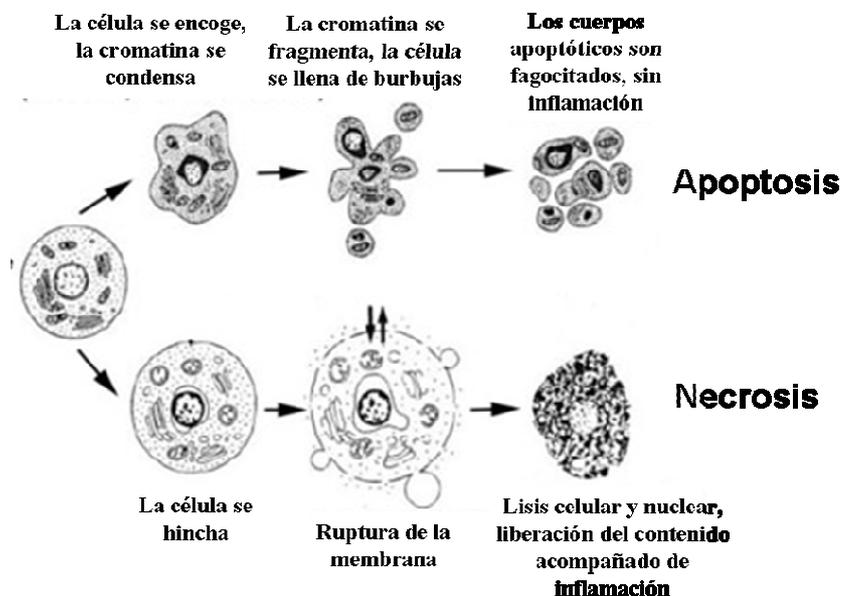


Figura 7. Alteraciones morfológicas durante los procesos de Apoptosis y Necrosis. Imagen adaptada de [www.celldeath.de](http://www.celldeath.de)

En los últimos años, se ha hecho evidente que la comparación clásica entre apoptosis y necrosis es una simplificación de procesos muy sofisticados que protegen el organismo de células no deseadas y potencialmente dañinas. Aunque las caspasas pueden ser indispensables para la morfología apoptótica típica, el proceso de activación de las caspasas no es lo único determinante en las decisiones de vida o muerte controlada (Blagosklonny, M.V., 2000; Wyllie, A.H., 2001; Bröker, L.E., 2005). La PCD puede darse en ausencia de caspasas, y puede ejecutarse con otras proteasas que no sean caspasas (Borner, C., 1999; Stoka, V., 2001; Bröker, L.E., 2005).

**Necrosis:** es un tipo de muerte celular caracterizado por el aumento del volumen del citoplasma y de los orgánulos citoplasmáticos, de la condensación moderada de la cromatina y la rotura de la membrana plasmática con la consecuente salida del contenido intracelular (Tabla 1). Este proceso incluye alteraciones mitocondriales como la producción de ROS, la permeabilización de la membrana mitocondrial, también incluye cambios lisosomales y nucleares, degradación de lípidos, aumento de la concentración citosólica de calcio provocando la activación de proteasas como las calpaínas y catepsinas (Festjens, N., 2006; Zong, W.X., 2006; Yuan, J., 2006; Galluzzi, L., 2007).

**Autofagia:** es un modelo de PCD que difiere de la apoptosis (Clarke, P.G., 1990; Jäättelä M., 2003; Bröker, L.E., 2005). Es un proceso evolutivamente conservado de degradación intracelular no selectiva, en que los componentes citoplasmáticos son digeridos por la acción de enzimas de los lisosomas. Va acompañada de una vacuolización autofágica y una ausencia de condensación de la cromatina (Tabla 1) (Galluzzi, L., 2007).

**Catástrofe Mitótica:** Es un tipo de muerte celular desencadenada por un fallo en la mitosis causado por un defecto en los puntos del control del ciclo celular y el desarrollo de células aneuoploides que están predestinadas a morir (King, K.L., 1995; Bröker, L.E., 2005). Normalmente, este proceso implica eventos de micronucleación y multinucleación (Tabla 1) que se dan antes de la muerte celular (Galluzzi, L., 2007). Este proceso incluye la activación de p53 o de la caspasa 2, permeabilización de la membrana mitocondrial y activación de caspasas (Galluzzi, L., 2007).

**Tabla 1. Aspectos morfológicos de los diferentes tipos de PCD.**

Tipo de muerte celular	Características morfológicas
<b>Apoptosis</b>	Redondeo de la célula
	Reducción del volumen celular y nuclear (picnosis)
	Retracción de pseudópodos
	Fragmentación nuclear (cariorraxis)
	Ligera modificación de los orgánulos citoplasmáticos
	Pérdida de la membrana plasmática
<b>Autofagia</b>	Ausencia de condensación de cromatina
	Vacuolización masiva del citoplasma (vacuolas autofágicas de doble membrana)
<b>Necrosis</b>	Hinchazón citoplasmático
	Ruptura de la membrana plasmática
	Hinchazón de los orgánulos citoplasmáticos
	Condensación moderada de la cromatina
<b>Catástrofe mitótica</b>	Micronucleación
	Multinucleación

## 4. APOPTOSIS

La apoptosis se define como una forma de deceso celular caracterizada por la ejecución de un programa de muerte que tienen todas las células, y que está codificado genéticamente. Es un proceso innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica (Ameisen, J.C., 1996). Juega un papel esencial en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis en los tejidos por eliminación de las células innecesarias o dañinas. El deterioro del mecanismo de defensa promueve la proliferación aberrante celular y la acumulación de defectos genéticos, resultando en tumorigénesis, y proporcionando con frecuencia a las células cancerígenas resistencia a los fármacos. La regulación de la apoptosis a varios niveles es esencial para el mantenimiento del delicado equilibrio entre la supervivencia celular y la señalización de muerte que es requerida para la prevención de enfermedades (Kerr, J.F., 1972; Cotter, T.G., 2009; Plati, J., 2011).

La apoptosis puede ser provocada por señales de dentro de la célula, como el estrés genotóxico, o por señales extrínsecas, como la unión de ligandos a los receptores de muerte de la superficie celular (Plati, J., 2011).

La mayoría de las células de eucariotas superiores tienen la capacidad de autodestruirse por activación de un mecanismo celular de suicidio programado cuando no son necesarias o están seriamente dañadas. El término apoptosis fue definido originalmente para incluir ciertas características morfológicas como daños en la membrana, disminución del tamaño nuclear y citoplasmático, y condensación de la cromatina diferentes al proceso de necrosis. Esta definición inicial ha llegado a ser utilizada ampliamente para referirse a todas las características morfológicas y bioquímicas de la muerte celular programada.

### 4.1 Alteraciones morfológicas y bioquímicas

Durante el proceso de apoptosis, la célula sufre una serie de cambios, los cuales pueden dividirse en tres etapas:

- *Fase de iniciación*: es la fase donde la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte. La muerte apoptótica puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares. Las primeras son, en muchos casos, originadas por estrés biológico, el cual provoca la liberación de citocromo *c* de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que algunas señales extracelulares desencadenan el proceso apoptótico al unirse a su ligando presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía extrínseca) (Hengartner, M.O., 2000). La

naturaleza de los inductores puede ser fisiológica (hormonas, citocinas), biológica (bacterias, virus, parásitos), química (fármacos) o física (radiaciones) (Thompson, C.B., 1995).

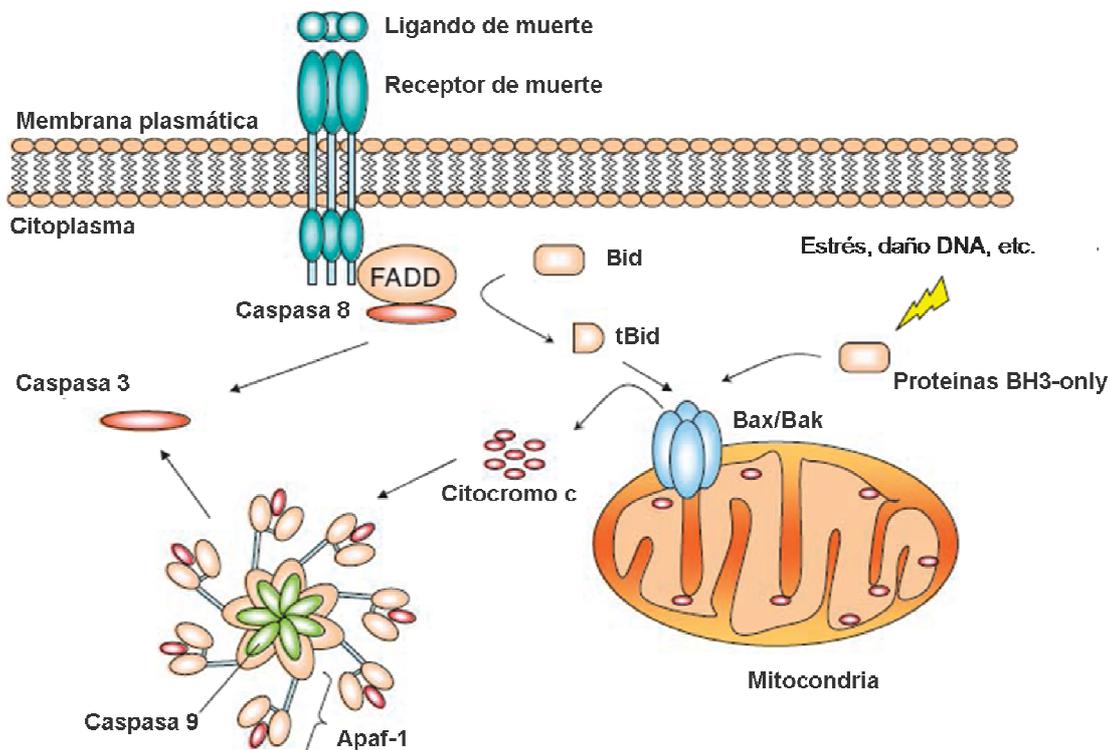
- *Fase de ejecución*: en esta fase se dan la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis. La célula que ha recibido una señal que le induce apoptosis, pierde contacto con las células vecinas y su citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular (picnosis). En la mitocondria, se observan cambios como la reducción del potencial transmembrana, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones para la síntesis de ATP y el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno (Kroemer, G., 1997; Kroemer, G., 2009). En etapas posteriores, la cromatina se condensa manteniéndose alrededor de la envoltura nuclear y se fragmenta. Finalmente, la célula apoptótica genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática íntegra, que contiene parte de la cromatina y de los organelos celulares. Estas vesículas se conocen como cuerpos apoptóticos (Cohen, J.J., 1993). A nivel bioquímico, cuando un inductor de apoptosis llega a su célula blanco, avanza a través de ella gracias a intermediarios que dirigen dicha señal hacia la maquinaria enzimática responsable de los cambios que presenta la célula durante la apoptosis. Esta maquinaria básica la constituyen principalmente las caspasas (Vaux, D.L., 1996; Kroemer, G., 1997; Thornberry, N.A., 1998; Mehmet, H., 2000; Kroemer, G., 2009).

- *Fase de eliminación*: aunque la muerte celular ocurre de manera constante en el organismo, las células que están muriendo por apoptosis son rara vez vistas *in situ* debido a que son rápida y eficientemente eliminadas por células fagocíticas (Willye, A.H., 1980; Cohen, J.J., 1992; Savill, J., 1993; Cohen, J.J., 1993; Platt, N., 1998;). Los responsables de retirar la mayoría de las células apoptóticas son los fagocitos, pero existen evidencias de que las células dendríticas, epiteliales y fibroblastos también participan en la eliminación de las células apoptóticas (Gregory, C.D., 2000).

## 4.2 Caspasas

A nivel molecular, la apoptosis es una forma de destrucción celular ordenada controlada por una familia de enzimas proteolíticas denominadas caspasas (Debatin, K.M., 2006). Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas altamente conservadas con especificidad para cortar proteínas tras residuos de ácido aspártico. Las caspasas juegan un papel clave en la regulación y la ejecución de la apoptosis (Li, J., 2008). Estas proteasas se encuentran normalmente en la

célula en forma de pro-enzima inactiva, y pueden ser activadas mediante proteólisis dando lugar a la enzima funcional.



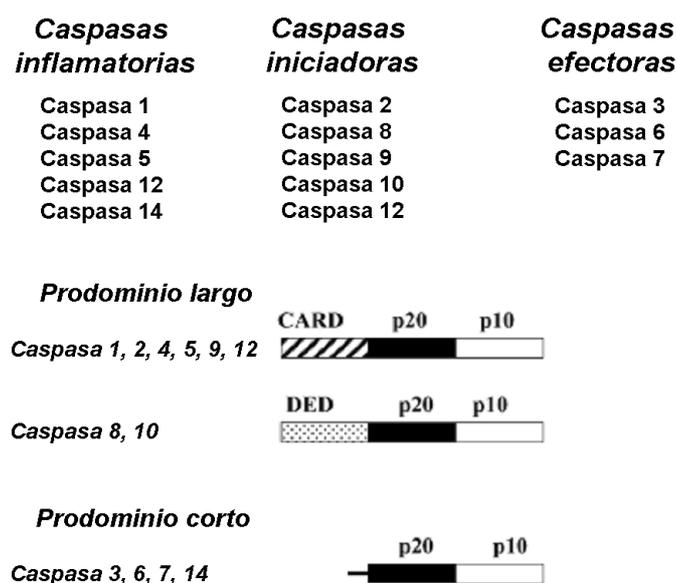
**Figura 8. Vías de activación de las Caspasas.** Representación esquemática de las vías extrínseca e intrínseca de activación de las Caspasas. Imagen adaptada de Li J., Caspases in apoptosis and beyond; *Oncogene*, 2008 Oct 20; 27(48):6194-206.

Las caspasas pueden ser clasificadas por dos métodos alternativos. En base a sus principales funciones conocidas, las caspasas son agrupadas en dos subfamilias (Li J., 2008):

- Las caspasas proapoptóticas (-2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10) son conocidas por estar implicadas en la mediación de la transducción de la señalización de muerte celular.
- Las caspasas proinflamatorias (-1, -4, -5, -12 y -14) están involucrados en la maduración de las citoquinas.

Esta clasificación, sin embargo, puede ser demasiado simple. Diversas evidencias indican que las caspasas tienen un papel en otros muchos procesos celulares por lo que no sólo pueden ser clasificadas en proapoptóticas o proinflamatorias. Además, la activación de las caspasas “proinflamatorias” puede claramente inducir apoptosis. Una clasificación alternativa es la división de las caspasas de acuerdo a la longitud de sus prodominios, los cuales se corresponden a sus posiciones en la cascada de señalización apoptótica. En base a esta clasificación, las caspasas están divididas en (Li, J., 2008):

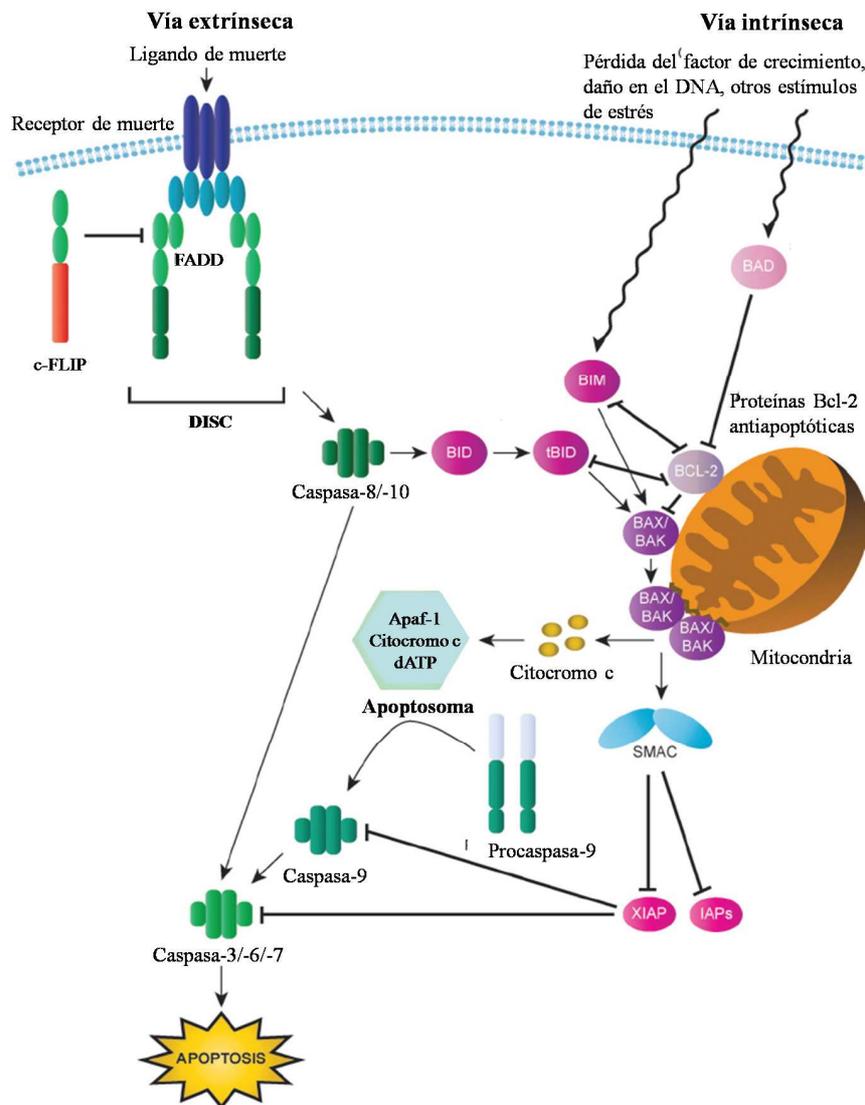
- Las caspasas iniciadoras (caspasa -2, -8, -9, -10 y -12) poseen largos prodominios que contiene motivos de interacción con otras proteínas, como los denominados dominios CARD (*caspase recruitment domain*; dominio de reclutamiento de caspasa) en el caso de la caspasa-2 y caspasa-9 o los denominados DED (*death effector domain*; dominio efector de muerte) en el caso de las caspasa-8 y caspasa-10, que les permiten interactuar con proteínas adaptadoras y, así, ser reclutadas hacia complejos oligoméricos, donde la dimerización de las caspasas induce su activación. La función de las dos principales caspasas iniciadoras, -8 y -9, se alcanza por distintas vías, las cuales terminan activando la procaspasa efectora -3 en el citosol. Las procaspasas son activadas después de la activación proteolítica, normalmente iniciada por ellas mismas, las cuales resultan de la fragmentación entre las subunidades larga y corta (Degterev, A., 2003).
- Las caspasas efectoras (caspasa -3, -6, -7 y -14) participan esencialmente en la fase de degradación. Las caspasas efectoras son responsables de la fragmentación de muchos sustratos apoptóticos, como DFF (*DNA Fragmentation Factor*) o PARP (*poly-ADP-ribose polymerase*) (Fischer, B., 2003), los cuales caracterizan la apoptosis nuclear. Las caspasas efectoras poseen dominios cortos y son activadas gracias a la actividad proteolítica de las caspasas iniciadoras (Shi, Y., 2004). Una vez activadas, procesan a su vez otros sustratos proteicos que mediarán en las distintas vías de apoptosis. La iniciación de estas reacciones en cascada está regulada por inhibidores de caspasas. Las caspasas efectoras catalizan la rotura de una serie de proteínas clave de la célula, causando las transformaciones morfológicas asociadas a la muerte de las células apoptóticas.



**Figura 9. Representación esquemática de los diferentes grupos de caspasas.** Imagen adaptada de Oliver L., The role of caspases in cell death and differentiation; *Drug Resist Updat*, 2005; 8(3):163-70.

### 4.3 Vías de activación de apoptosis

Existen dos vías de señalización fundamentales que propagan la señal de apoptosis en la célula (Figura 10). Ambas se diferencian en el modo de iniciación: la vía intrínseca depende de cambios en la mitocondria y la vía extrínseca es activada por señales extracelulares que actúan vía receptores de muerte.

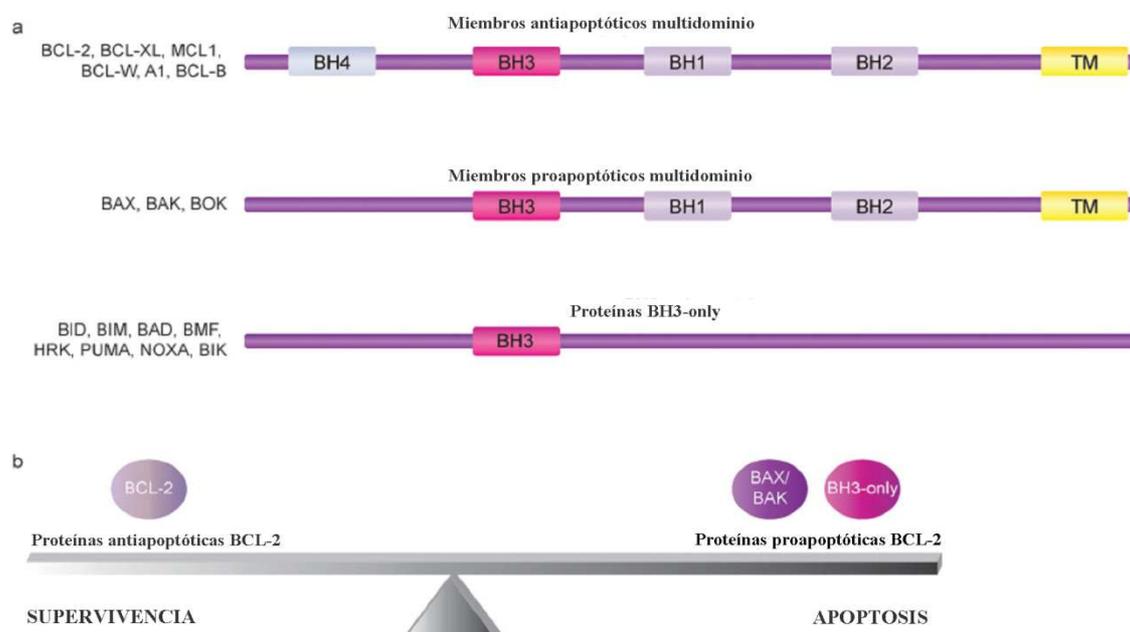


**Figura 10. Vías de activación de apoptosis.** Representación esquemática de las vías extrínseca e intrínseca de activación de la Apoptosis. Imagen adaptada de Plati J., Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy; *Integr. Biol.*, 2011; 3(4):279-96.

**Vía intrínseca** mediada por la mitocondria, en la que las señales de apoptosis o determinadas formas de estrés celular (por ejemplo, acumulación de radicales libres de oxígeno) dan lugar a las alteraciones en la fisiología mitocondrial. En esta vía se origina un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, lo que lleva a la liberación de una serie de

proteínas proapoptóticas fuera de la mitocondria, como es el caso del citocromo *c*. Diversos daños o señales de estrés activan uno o más miembros de la familia de proteínas BH3-only. La activación de las proteínas BH3-only supera el efecto inhibitorio de la familia Bcl-2 y promueve el ensamblaje de los oligomeros Bak-Bax en la membrana exterior mitocondrial, la cual es seguida con una liberación del citocromo *c* (Chipuk, J.E., 2008).

Los miembros de la familia Bcl-2 están presentes en todos los organismos multicelulares y juegan un papel principal en la regulación de la apoptosis dependiente de mitocondria/apoptosoma. La familia Bcl-2 es responsable del control de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Plati J., 2011). Las proteínas de la familia de Bcl-2 tienen en común uno o varios motivos estructurales homólogos denominados dominios BH (Bcl-2 Homology), de los cuatro (BH1-4) (Plati J., 2011).



**Figura 11. Subgrupos de los miembros de la familia de Bcl-2.** (a) Clasificación de los miembros de la familia Bcl-2 en función de la composición de los dominios BH. (b) Proteínas Bcl-2 juegan un papel clave en la mediación del delicado balance entre la supervivencia celular y la muerte celular. Imagen adaptada de Plati J., *Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy; Integr. Biol.*, 2011; 3(4):279-96.

Los miembros de la familia Bcl-2 están clasificados en tres subgrupos: uno anti-apoptótico y dos pro-apoptóticos, según la función y la composición de los dominios (Figura 11). Los miembros anti-apoptóticos multidominio, incluyen a Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, BCL-w, A1, y Bcl-b, que contienen de tres a cuatro dominios BH. Los miembros pro-apoptóticos multidominio representados por Bax, Bak, y Bok muestran secuencias similares con las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. Como miembros de la familia, ambos subgrupos multidominio contienen BH1, BH2 y BH3. Las proteínas “BH-only”, son la tercera clase de

miembros de la familia Bcl-2, son un subconjunto de proteínas pro-apoptóticas que, como indica su nombre, solo muestra una secuencia similar con las proteínas Bcl-2 multidominio en una sola región, el dominio BH3. La familia “BH3-only” incluye Bid, Bim, Bad, Bmf, Hrk, PUMA, NOXA y Bik (Plati J., 2011).

Diversas evidencias sugieren que algunos miembros de la familia Bcl-2 tienen un doble papel, sirviendo de mediadores moleculares tanto en apoptosis como en la progresión del ciclo celular. Se ha propuesto una doble función de algunos miembros de la familia de Bcl-2, en la regulación de apoptosis y en el gobierno del ciclo celular por miembros multidominio, mientras que el papel de las moléculas con sólo el dominio BH3 es muy variable (Zinkel, S., 2006; Maddika, S., 2007).

En respuesta a diversos tipos de estrés celular, las proteínas del grupo BH3-only llevan a cabo un papel clave como reguladores de la vía apoptótica intrínseca por activación de proteínas como Bax. El principal papel de las proteínas como Bax, situadas en la cascada de las proteínas BH3-only en la señalización apoptótica mediada por mitocondria, ha sido establecido por diversos estudios que han demostrado que las proteínas BH3-only no pueden inducir apoptosis en células deficientes en Bax o Bak. La activación de Bax y Bak implica cambios conformacionales que permite su autoasociación, necesaria para la formación de homodímeros seguido de una homo-oligomerización y una inducción de MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*). A pesar de la indiscutible importancia de la función de Bax y Bak en la inducción de MOMP y la consecuente liberación de factores apoptogénicos, el mecanismo por el cual Bax y Bak son activados ha sido un tema de controversia en estos últimos años. Estudios previos han llegado a distintas conclusiones como que el subconjunto de proteínas BH3-only pueden llevar a cabo apoptosis por unión directa de Bax/Bak y por ello, se proponen dos modelos distintos de activación de Bax/Bak, el modelo de activación indirecta y el modelo de activación directa.

En el modelo de activación indirecto, el efecto de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, que en un principio están unidas a los complejos heterooligoméricos de Bax/Bak manteniéndolos inactivos, es neutralizado por las proteínas BH3-only, activándose el complejo dando lugar a la apoptosis sin interactuar directamente con Bax o Bak. En este caso, las proteínas BH3-only se unen a las proteínas anti-apoptóticas permitiendo la liberación de Bax/Bak, con la consiguiente homo-oligomerización y la consecuente inducción de MOMP. De acuerdo con el modelo indirecto, este mecanismo de reemplazo, es la principal manera por la cual las proteínas BH3-only inducen apoptosis y la actividad pro-apoptótica.

En el modelo de activación directa, las proteínas BH3-only activadas, pueden unirse directamente y activar Bax/Bak. Las proteínas activadas BH3-only, incluye a Bim, tBid, y otras como PUMA.

Se deduce que las proteínas pro-apoptóticas del subconjunto BH3-only actúan como sensores de diferentes tipos de estrés celular y, una vez activados, inducen la muerte celular a través de la permeabilización de la membrana mitocondrial regulada por las demás proteínas de la familia Bcl-2.

En resumen, las regulaciones bioquímicas y fisiológicas llevadas a cabo por los miembros de la familia de Bcl-2 son determinantes para la supervivencia celular o la inducción de apoptosis (Lanave, 2004; Maddika, S., 2007).

**Vía extrínseca**, la estimulación de la vía apoptótica extrínseca es iniciada por la unión de un ligando de la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) a uno de los receptores de muerte en la superficie celular (Figura 12). La mayoría de los miembros de la familia TNF son sintetizados como proteínas transmembrana tipo II que se ensamblan en trimeros activos. La familia TNF incluye 19 ligandos entre los que se encuentran el propio TNF- $\alpha$ , Fas-L, o TRAIL.

La señalización de muerte por los receptores conlleva la trimerización del receptor que implica la agregación de un motivo intracelular común en los miembros de la familia de los receptores de muerte, conocido como dominio de muerte (DD). La trimerización de los receptores de muerte se inicia por la unión del ligando, pero existen evidencias a favor de la formación de un receptor preconcentrado de oligómeros de forma independiente del ligando. La unión del ligando al receptor provoca un reclutamiento de proteínas adaptadoras que contienen un dominio de muerte (DD), como las FADD y TNRF-1 asociadas a DD, que se unen a los dominios de muerte del receptor vía interacción DD-DD. Estas proteínas adaptadoras incluyen también un dominio efector de muerte (DED) y, de nuevo, por interacciones homólogas, recluta en el complejo DISC la procaspasa-8 que contiene DED. Después, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente y la caspasa-8 activa es liberada del complejo DISC al citoplasma formando un heterotetrámero de dos subunidades pequeñas y dos grandes. La caspasa-8 activa rompe varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3, que resulta en su activación y en la finalización de la muerte celular mediante la activación de las caspasas efectoras -3, -6 y -7.

En otras células, la caspasa-8 induce la ruptura de Bid, originando la forma truncada de Bid (tBid) que, interaccionando con otros miembros de la familia Bcl-2, induce la liberación del citocromo *c* y otras proteínas proapoptóticas desde la mitocondria. Bid, por tanto, conecta la vía extrínseca con la vía intrínseca de inducción de apoptosis.

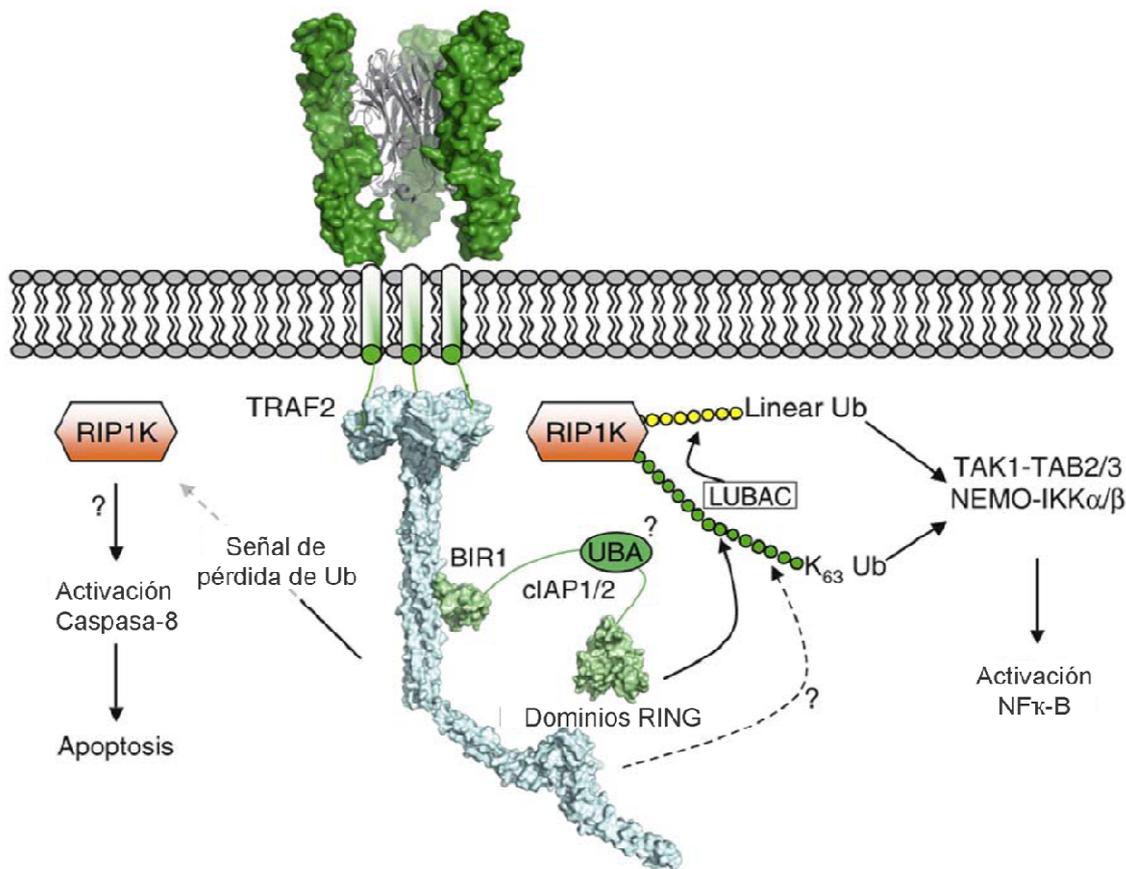


Figura 12. Vía de señalización del receptor TNF. Imagen adaptada de Mace, P.D. Molecular cell death platforms and assemblies 2010.

### Proteínas inhibidoras de apoptosis

Teniendo en cuenta que la proteólisis es un proceso irreversible, un control estricto de la fragmentación proteolítica mediada por caspasas es fundamental para prevenir la destrucción inapropiada de la célula. Por consiguiente, las células emplean múltiples formas de regulación para modular la activación de las caspasas. Una de las formas de regulación implica inhibir la actividad de las caspasas por proteínas IAP. Todos los miembros de la familia de las proteínas IAP (con la familia de proteínas IAP humanas incluidas; NAIP, XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, livina, survivina y BRUCE) contienen al menos un dominio repetido de baculovirus IAP (BIR) y este motivo está repetido en tándem presente en todos IAPs. Tres dominios BIR en tándem (BIR1-BIR3) están presentes en la región N-terminal de las IAPs de mamíferos, XIAP, cIAP1 y cIAP2. Además, de los dominios BIR, estos IAPs contienen en la región C-terminal un dominio RING que confiere actividad ubiquitin E3 ligasa y un dominio ubiquitina asociada (UBA) para la unión de proteínas ubiquitinadas. Este dominio RING promueve la degradación de la propia IAP (Yang, Y., 2000), y presumiblemente de cualquier caspasa unida a ella. Además, cIAP1 y cIAP2 incluyen un dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasa) de función desconocida. Los dominios BIR de IAPs pueden mediar interacciones con varias proteínas y su

habilidad para unirse directamente a caspasas pueden servir como mecanismo para la inhibición de caspasas mediada por IAP, frenando así el proceso de apoptosis (Plati, J., 2011) (Figura 13).



**Figura 13. Organización de los dominios de los inhibidores de apoptosis.** Imagen tomada de Plati J., Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy; *Integr. Biol.*, 2011; 3(4):279-96.

#### 4.4 Radicales libres de oxígeno y apoptosis

El oxígeno es una molécula esencial para todos los organismos aeróbicos, y juega un papel predominante en la generación de ATP, concretamente en la fosforilación oxidativa. Durante este proceso las especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), son generados como subproductos, los cuales son indispensables para las vías de señalización que regulan el crecimiento celular y el estado reducción-oxidación (redox) (Jung, F., 2009).

El estrés oxidativo define una situación donde existe un claro desequilibrio entre la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y la capacidad del sistema biológico de eliminar los reactivos intermediarios y/o la facilidad de reparar el daño causado. El término ROS se refiere a especies que contienen oxígeno que son más reactivas que el propio  $O_2$  (Freinbichler, W., 2011).

El estrés oxidativo está implicado en numerosas patologías como las enfermedades neurodegenerativas, isquémicas, cáncer, diabetes, daños en el hígado y SIDA. El estrés oxidativo podría jugar también un papel importante en el envejecimiento (Freinbichler, W., 2011).

El  $O_2$  actúa como aceptor último de electrones en la cadena respiratoria, por lo que ocupa un lugar destacado en los procesos metabólicos asociados a una existencia aeróbica. Normalmente, el  $O_2$  acepta los electrones y forma agua, pero puede suceder que en lugar de formarse agua, se formen unos intermediarios del oxígeno conocidos como ROS. Estos intermediarios del oxígeno pueden presentar un electrón desapareado, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) o el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), o pueden tener la capacidad de sustraer electrones

de otras moléculas, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Estas especies son altamente reactivas, y reaccionan con las macromoléculas celulares dañándolas directamente (como al DNA), o desencadenando reacciones donde el radical libre va pasando de una a otra macromolécula generando un daño extensivo en estructuras tan importantes como las membranas celulares.

Se ha comprobado que muchos de los tratamientos químicos y físicos que inducen apoptosis también inducen estrés oxidativo, por ejemplo las radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta, etc. De esta manera, el papel del estrés oxidativo como mediador en procesos de apoptosis viene avalado por cuatro observaciones (Higuchi, M., 1998):

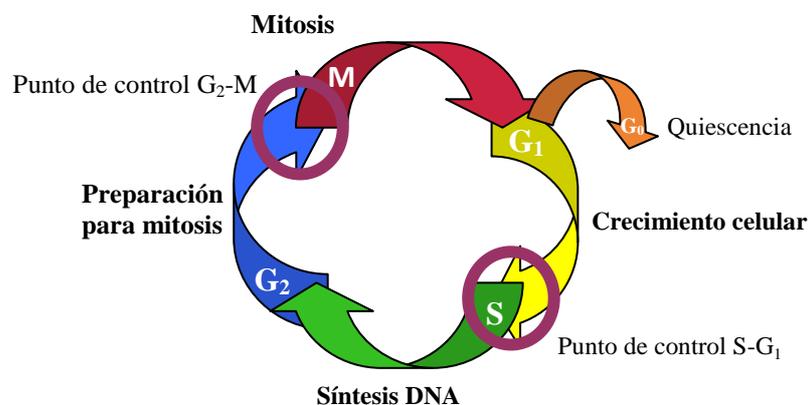
- 1- Determinados agentes antioxidantes son capaces de inhibir ciertos tipos de apoptosis.
- 2- Se ha podido detectar un aumento en la concentración de  $H_2O_2$  en células que están sufriendo un proceso de apoptosis.
- 3- La adición extracelular de ROS induce apoptosis.
- 4- Un aumento de los niveles intracelulares de ROS puede inducir apoptosis.

Se conocen diversos mecanismos a través de los cuales los ROS podrían inducir un proceso de apoptosis. El incremento en los niveles de ROS en la mitocondria tiene como resultado la disminución en el potencial de membrana y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, con la consiguiente salida del citocromo *c* y otras proteínas proapoptóticas al citoplasma. Esto llevaría a la activación de las caspasas y finalmente, a la muerte celular (Oridate, N., 1997; Oridate, N., 1997). También es conocido que el aumento de ROS induce daño en el DNA, y éste a través del aumento de p53 dispara una vía que conduce a la apoptosis (Kinningham, K.K., 1999). Por otra parte, los ROS actúan sobre las membranas produciendo la peroxidación de los ácidos grasos y el colesterol. Este efecto se propaga rápidamente y también induce finalmente apoptosis (Burdon, R.H., 1995; Zampieri, S., 2008). Los ROS podrían también inducir apoptosis a través de la formación de HPETES, unos derivados oxigenados del ácido araquidónico que se comportan como potentes agentes inductores de apoptosis (Yao, Y., 1996). Por último, se ha descrito que el aumento en los niveles de ROS activa la vía de receptores de muerte inducida por TNF- $\alpha$  (Ozsoy, H.Z., 2008) y que, al contrario, inhibe la vía antiapoptótica y prosupervivencia mediada por Akt (Gao, N., 2005; Pozo-Guisado, E., 2005).

## 5. CICLO CELULAR

En células en proliferación, el ciclo celular es el proceso ordenado y repetitivo que se inicia en el momento en que una célula nace a partir de la división de una célula madre y transcurre hasta que esa célula se divide, a su vez, en dos células hijas (Vermeulen, K., 2003; Stein, G.S., 2004). La duración del ciclo celular varía según la estirpe celular, siendo la duración media del ciclo completo de unas 24 horas. Los dos tipos de genes que juegan un papel clave en el ciclo celular, y por eso en el desarrollo del cáncer, son los oncogenes (Her2/neu, Ras, c-Myc, etc.) y los genes supresores de tumores (p53 y Rb). Los estímulos de crecimiento empiezan por una liberación de factores de crecimiento desde la célula. Estos factores se unen a los receptores de la membrana de la célula. Las señales son transducidas a proteínas citoplasmáticas, que a su vez provocan la liberación factores de transcripción dentro del núcleo. Esta secuencia de eventos conduce a la célula en el ciclo celular (Foster, I., 2008).

### 5.1 Fases del ciclo celular



**Figura 14. Fases del ciclo celular.** La población celular transcurre a través de las distintas fases del ciclo celular para completar su crecimiento y división. Los puntos de control regulan el complejo grupo de interacciones que determinan el crecimiento celular, la parada o la apoptosis.

- **Fase G<sub>1</sub>:** Es la primera fase del ciclo. El periodo comprendido entre el nacimiento de la célula y el comienzo de la replicación del DNA. Durante este periodo la célula, con una dotación cromosómica  $2n$ , dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de RNA, proteínas y otros componentes. En un ciclo celular de 24 horas, esta fase tiene una duración de entre 6 y 12 horas.

- **Fase S:** Es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del DNA. La dotación cromosómica varía desde  $2n$ , al comienzo, hasta  $4n$  al final de la fase. Su duración media varía entre 6 y 8 horas.

- **Fase G<sub>2</sub>:** Este periodo comienza cuando todo el DNA se ha replicado, y por tanto, la célula tiene dos juegos diploides completos de cromosomas ( $4n$ ) y acaba cuando comienza la mitosis. Su duración media es de 3 a 4 horas.

- **Fase M o Mitosis:** En esta fase, que dura aproximadamente 1 hora, se produce la división del núcleo y se incluyen cuatro subfases distintas; profase, metafase, anafase y telofase. La mitosis culmina en la citocinesis, es decir, la división del citoplasma, que lleva a la formación de dos células nuevas.

Además de estas cuatro fases típicas de las células en proliferación, existe una quinta fase denominada G<sub>0</sub>, en la que se encuentran las células en quiescencia, células no proliferativas que han abandonado el ciclo celular activo hijas (Vermeulen, K., 2003; Stein, G.S., 2004). En esta fase, la célula, con una dotación cromosómica  $2n$ , similar a la de G<sub>1</sub>, mantiene una actividad basal de síntesis de RNA y proteínas necesaria para el adecuado recambio molecular.

## 5.2 Regulación del ciclo celular

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estrictos. Señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular.

El núcleo del control interno del ciclo celular está formado por dos familias de proteínas; las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Vermeulen, K., 2003; Stein, G.S., 2004).

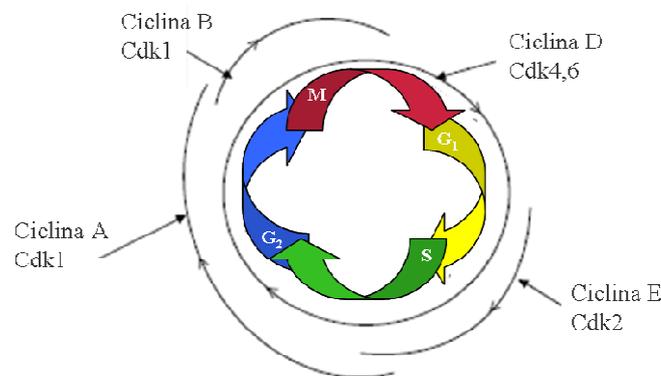


Figura 15. Posición de las distintas ciclinas y Cdk en las fases del ciclo celular.

Las *ciclinas* son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular. Las ciclinas forman complejos con enzimas quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) activando en estas últimas su función quínasa. La concentración de las ciclinas varía a lo largo del ciclo celular; cuando su concentración es baja, la función de su correspondiente quínasa dependiente de ciclina es inhibida. Esto tiene como consecuencia la fluctuación de la actividad de los complejos ciclina-Cdk responsables de los distintos sucesos del ciclo celular.

Hay cuatro tipos de ciclinas, que se unen a las Cdks y actúan en fases específicas del ciclo celular.

- ciclinas D: actúan en la fase  $G_1$  del ciclo.
- ciclina E: actúan al final de la fase  $G_1$  y en la intersección  $G_1/S$ .
- ciclina A: actúa en la fase S y principio de la fase  $G_2$ .
- ciclina B: actúa en la fase  $G_2$ .

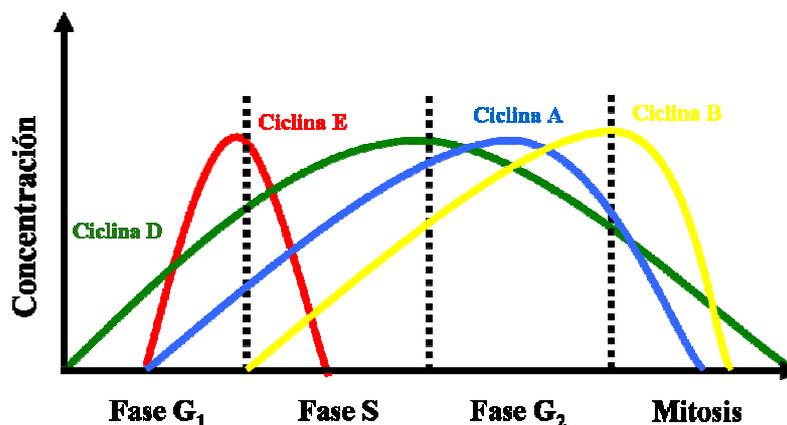


Figura 16. Fluctuación de los niveles de las diferentes ciclinas durante el ciclo celular.

Las *quinasas dependientes de ciclinas (Cdk)* son enzimas que regulan el correcto desarrollo del ciclo celular. Estructuralmente, son heterodímeros constituidos por una subunidad quínasa y una subunidad ciclina. Esta última dota de especificidad a la Cdk y permite la regulación de su actividad, fundamentalmente mediante proteólisis dependiente de ubiquitinación y posterior traslado al proteosoma.

Los cambios cíclicos en la actividad de las Cdk están controlados por otras proteínas que regulan a estas quinasas. Los más importantes son las proteínas conocidas como ciclinas. Las Cdk como su nombre indica, son dependientes de ciclinas para su actividad: a menos que estén fuertemente unidos a una ciclina, no tienen actividad proteínquinasa.

### *Inhibidores de Cdk*

El aumento y la caída de los niveles de ciclinas es el determinante principal de la actividad Cdk durante el ciclo celular. Sin embargo, hay otros mecanismos que modifican la actividad de los complejos ciclina-Cdk y por tanto, regulan el avance a través del ciclo celular, como es el caso del mecanismo llevado a cabo por una clase de proteínas denominadas inhibidores de Cdk o CKIs.

La actividad de las Cdk es controlada por las proteínas inhibidoras del ciclo celular, inhibidores de Cdk (CKIs). Estas proteínas se dividen en dos familias, las INK4 y la familia Cip/Kip. Las proteínas que median el control en la fase G<sub>1</sub>/S han demostrado ser inactivas en la mayoría de los cánceres donde las alteraciones de los puntos de control de G<sub>2</sub>/M son menos comunes (Foster, I., 2008).

Estas proteínas inhibidoras de las Cdk están implicadas en la parada del ciclo celular en respuesta a varias señales antiproliferativas como privación de factores de crecimiento, citoquinas y daño en el DNA celular, entre otras.

La familia INK4 está formada por las proteínas p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c), p19 (INK4d), las cuales inactivan específicamente a las Cdk de la fase G<sub>1</sub> (Cdk4 y Cdk6). A diferencia de las proteínas de la familia Cip/Kip, que se unen a complejos ciclina/Cdk, la familia INK4 se unen a las Cdk solas compitiendo así con las ciclinas D (Carnero, A., 1998; Vermeulen, K., 2003).

La segunda familia de inhibidores, Cip/Kip, está formada por las proteínas p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2), p57 (Kip2). Estos inhibidores inactivan a los complejos ciclina-Cdk (Polyak, K., 1994; Harper, J.W., 1995; Lee, M.H., 1995; Vermeulen, K., 2003). Inhiben a los complejos de la fase G<sub>1</sub>, y en menor grado a los complejos ciclina B-Cdk (Hengst, L., 1998; Vermeulen, K., 2003). Esta familia de inhibidores presenta una especificidad más amplia que la familia INK4, ya que *in vitro* es capaz de unirse e inhibir a todos los complejos ciclina /Cdk. Sin embargo, *in vivo* se ha demostrado que actúan preferentemente inhibiendo los complejos que forman las ciclinas E y A con Cdk2 y los que forman las ciclinas A y B con Cdk1.

La proteína p21 juega un papel esencial en la respuesta a diversas situaciones de estrés celular. La expresión de p21 se incrementa en estas situaciones, especialmente tras el daño al DNA celular. La proteína p21 inhibe la síntesis de DNA por unión e inhibición de la proliferación del antígeno nuclear celular (PCNA) (Pan, Z.Q., 1995; Waga, S., 1997; Vermeulen, K., 2003).

## **6. PAPEL DE P53: CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN Y LA MUERTE CELULAR**

La correcta y sincronizada regulación de los procesos de proliferación y muerte celular es crucial para obtener el crecimiento adecuado de un tejido. Esta sincronía se consigue gracias a que muchas proteínas que forman parte de las vías reguladoras que controlan el ciclo celular, tienen un doble papel al participar también, en la regulación de la apoptosis (Pucci, B., 2000).

Los supresores tumorales son un extenso grupo de moléculas que son capaces de controlar la división celular, la estimulación del proceso apoptosis y la supresión de metástasis. La pérdida de función de un supresor tumoral puede desencadenar en cáncer debido a la división celular incontrolada (Sun, W., 2010).

Muchos supresores tumorales tienen actividad tanto en células tumorales como en normales; algunos, como p53, están inactivos en células normales y sólo se activan ante riesgos potenciales de cáncer. Un supresor tumoral posee múltiples mecanismos de supresión de crecimiento de las células tumorales (Sherr, C.J., 2004; Sun, W., 2010). Por ejemplo, el supresor más importante, p53, que está asociado con más o menos el 50% de casos de cáncer (Cadwell, C., 2001; Sun, W., 2010), puede desencadenar procesos de reparación del DNA dañado, inducir la transcripción de otros supresores tumorales, como p21 y p16, e iniciar la apoptosis celular (Sherr, C.J., 2004; Wang, T.J., 2001; Levine, A.J., 2004; Sun, W., 2010). A pesar del enorme crecimiento en la investigación del cáncer y la identificación de numerosos supresores tumorales (Lane, D.P., 2003), su mecanismo de acción no está determinado en todos los casos. Hasta la fecha, se han descrito cuatro mecanismos principales para la acción los supresores tumorales: la supresión de la división celular, la inducción de apoptosis, la reparación del daño en el DNA y la inhibición de metástasis (Sun, W., 2010).

La proteína p53 es posiblemente el gen supresor tumoral más importante de nuestras células. Mediante señales de estrés activa un programa de transcripción responsable del mantenimiento de la homeostasis celular. Muchos de los efectos de p53 son consecuencia de sus acciones como factor de transcripción, que resultan en la inducción la supresión de múltiples genes diana.

La proteína p53 es un factor de transcripción cuyos niveles incrementan en respuesta al daño DNA y otras formas de estrés celular (Beckerman, R., 2010; Rinn, J.L., 2011). Durante la activación de p53 se acumula en el núcleo, donde se une al DNA e induce o reprime la expresión de un gran número de genes diana (Schuler, M., 2001). Se ha comprobado que p53 activa directamente cientos de dianas transcripcionales. Sin embargo, es evidente que la inducción de p53 requiere de la represión de muchos genes diana que interferirían con programas transcripcionales dependientes de p53 (Rinn, J.L., 2011). La muerte celular inducida por la vía p53 es ejecutada por caspasas. La activación de las caspasas por p53 ocurre por la liberación de factores apoptogénicos desde la mitocondria, como el citocromo *c* y Smac/DIABLO. El citocromo *c* liberado permite la formación del apoptosoma, que consta de una proteína adaptadora apaf-1 y la caspasa-9, la cual se activa tras ser reclutada en el apoptosoma. La caspasa-9 activada fragmenta y activa a caspasas efectoras, como la -3 y -7, que ejecutan el programa de muerte. La liberación de Smac/DIABLO facilita la activación de las caspasas por represión de los IAPs. La liberación de los factores apoptogénicos mitocondriales está regulada por las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, que inducen o impiden la permeabilización de la membrana exterior mitocondrial (Schuler, M., 2001).

# **OBJETIVOS**



La apoptosis desempeña un papel esencial en numerosos procesos fisiológicos, desde el desarrollo embrionario hasta el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos en el adulto (Adams, J.M., 2003; Plati, J., 2011). De igual manera, este tipo de muerte celular está implicado en numerosas patologías, entre las que se pueden destacar el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, etc. (Adams, J.M., 2003; Ola, S.M., 2011). El funcionamiento aberrante de los mecanismos de inducción y regulación de apoptosis contribuye en gran medida a la transformación neoplásica (Sayers, T.J., 2011). En cambio, la apoptosis también está presente en el tratamiento del cáncer, ya que la mayoría de los tratamientos con fármacos anticancerosos inducen apoptosis directa o indirectamente.

En la actualidad, se administran una veintena de quimioterápicos como tratamiento contra el cáncer, pero su poca selectividad frente a las células tumorales y sus efectos secundarios, hacen que se demande el desarrollo de nuevos fármacos que mejoren su selectividad y disminuya su toxicidad. La introducción del elemento selenio con la finalidad de desarrollar nuevos fármacos activos frente al cáncer, es un enfoque terapéutico novedoso. Entre los compuestos diseñados y sintetizados en nuestro grupo de investigación, se encuentran los derivados bisacilimidoselecarbamato (BSC) que en ensayos preliminares *in vitro* en células tumorales de próstata, PC-3 han mostrado una prometedora actividad citotóxica (Plano, D., 2007).

El descubrimiento de la capacidad de los derivados BSC de inducir apoptosis en células tumorales sin tener efectos no deseados en células no transformadas los convertiría en un agente con potencial terapéutico. Por ello, el estudio de los mecanismos de acción de dichos compuestos con actividad anticancerosa es el objetivo global de estudio. En él que se pretende:

1. Analizar la posible actividad citotóxica de los derivados BSC en diferentes líneas celulares.
2. Investigar el mecanismo de acción de los derivados BSC más activos.
  - 2.1. Caracterizar el tipo de muerte celular que inducen los derivados BSC.
  - 2.2. Analizar el efecto de los derivados BSC a nivel mitocondrial: disipación del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ), cambios en los niveles intracelulares de ROS y alteraciones en la expresión de las proteínas implicadas.

- 2.3. Estudiar el efecto de los derivados BSC sobre el ciclo celular y sus proteínas reguladoras.
- 2.4. Estudiar el efecto de los derivados BSC sobre el factor de transcripción p53, debido al papel que desarrolla tanto en la regulación de la apoptosis como del ciclo celular.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. BSC: NUEVA SERIE DE COMPUESTOS QUÍMICOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Los compuestos empleados en este trabajo han sido los derivados bisacilimidoselecarbamato (BSC). Estos compuestos se han diseñado en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra, cumpliendo dos características estructurales:

- la simetría, entendida como un núcleo central unido mediante grupos carbonilo a dos cadenas laterales idénticas.
- la presencia de un átomo de selenio, por su demostrada acción anticancerosa.

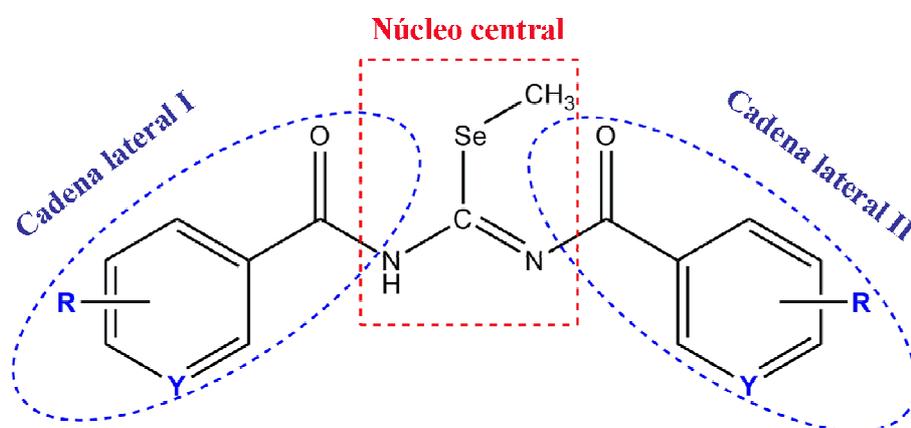


Figura 17. Estructura general de los derivados bisacilimidoselecarbamato (BSC).

En trabajos anteriores del grupo, los derivados bisacilimidoselecarbamato (BSC) fueron probados en la línea celular tumoral PC-3 (adenocarcinoma de próstata) (Plano, D., 2007). Se obtuvieron unos resultados con una potente actividad citotóxica. Por ello, en este trabajo se ha extendido el análisis de su actividad citotóxica a otras líneas celulares tumorales como MCF-7 (adenocarcinoma de mama), CCRF-CEM (leucemia aguda T-linfoblástica), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y HTB-54 (carcinoma epidermoidal de pulmón) y en una línea no tumoral, 184B5 (células de glándula mamaria derivadas de células no-malignas), con el fin de valorar su selectividad.

Observando los datos obtenidos en las distintas líneas celulares tumorales, para profundizar en su mecanismo de acción, se ha escogido la línea celular tumoral MCF-7 (adenocarcinoma de mama), debido a su sensibilidad a estos compuestos. Dentro de los derivados bisacilimidoselecarbamato (BSC) (Figura 19), seleccionamos los compuestos **3g** [metil *N,N'*-bis(3,5-dimetoxibenzoil) imidoselenocarbamato] y **3n** [metil *N,N'*-bis(4-cianobenzoil) imidoselenocarbamato], ya que presentan mayor actividad y selectividad que el resto de los derivados.

Los compuestos fueron disueltos inicialmente en DMSO (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO) a una concentración de 0,01M y filtrados en filtros 0,22 micras (Millipore, Billerica, MA), para su esterilización. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas en medio sin suplementar y se almacenaron a -20°C hasta la realización de cada experimento. Dichos compuestos se emplearon a una concentración de 25 µM.

## **2. CULTIVO CELULAR**

Las líneas celulares que se han empleado son MCF-7 (adenocarcinoma de mama), CCRF-CEM (leucemia aguda T-linfoblástica), HT-29 (adenocarcinoma de colon), HTB-54 (carcinoma epidermoidal de pulmón) y 184B5 (células de glándula mamaria derivadas de células no-malignas), obtenidas de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA). Las células de la línea MCF-7 se han cultivado en medio EMEM (ATCC) suplementado con 10% de suero bovino fetal y penicilina-estreptomicina (0.1mg/ml) en frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Las células de las líneas CCRF-CEM, HT-29, HTB-54 se han cultivado en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de suero bovino fetal de ternera, L-glutamina (2mM) y penicilina-estreptomicina (0,1 mg/ml) en frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Las células de la línea 184B5 (células de glándula mamaria derivadas de células no-malignas) se han cultivado en medio Hams F-12/DMEM (50:50) suplementado (Li, Y., 2007) en frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Los cultivos se han incubado en una estufa a 37°C y en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>.

Los pasos a seguir para el subcultivo de las células adherentes (MCF-7, HT-29, HTB-54 y 184B5) son:

1. Se retira el medio de cultivo del frasco de 75 cm<sup>2</sup> por aspiración.
2. Se lavan las células con 7 mL de PBS (Invitrogen). Se espera 30-45 segundos y se retira el PBS por aspiración.
3. Se añaden 3 mL de tripsina-EDTA (Invitrogen). Se incuban las células durante 5 minutos a 37 °C en una estufa de CO<sub>2</sub>.
4. Se despegan las células del frasco de cultivo, dando pequeños golpes en el frasco hasta que se despegan todas las células.
5. Se neutraliza el efecto de la tripsina-EDTA añadiendo 7 mL de medio suplementado. Se centrifugan a 1500 r.p.m durante 6 minutos a 4°C, eliminándose el sobrenadante por decantación.

6. Se resuspende el pellet en un pequeño volumen de medio suplementado y se procede al recuento de células en un hemocitómetro Neubauer.

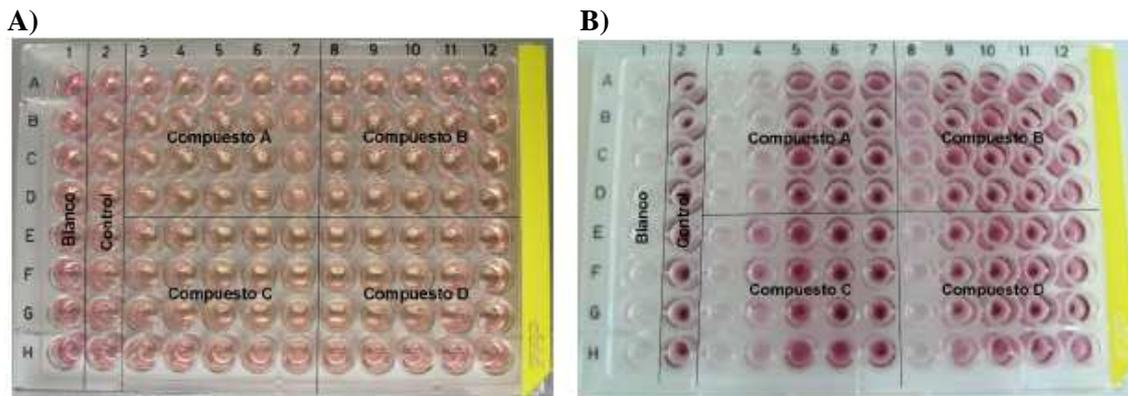
Para mantener el crecimiento exponencial y el subcultivo en monocapa, se han cambiado los medios de cultivo cada 48 horas, procediéndose a la tripsinización de los subcultivos cuando éstos alcanzan una alta confluencia (alrededor del 80% del espacio del frasco ocupado por células).

En el caso de las células que crecen en suspensión (CCRF-CEM) se ha realizado por centrifugación y posterior resuspensión en medio suplementado, no siendo necesaria su tripsinización. Para mantener el crecimiento exponencial, los subcultivos se dividen cada dos días por dilución.

### 3. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Se ha analizado *in vitro* la actividad citotóxica de los compuestos BSC mediante un microensayo colorimétrico de citotoxicidad basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoloilo (MTT) (Mosmann, T., 1983). En este ensayo las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución, a una sal de formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro. La cantidad de formazán formada en esta reacción, que está catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial, puede cuantificarse espectrofotométricamente con facilidad, lo que permite estimar el número de células vivas y metabólicamente activas presentes en los subcultivos en presencia de los productos cuyo efecto se quiere estudiar.

Se ha comparado el crecimiento de las células tratadas y control a las 72 horas con respecto a las células sembradas inicialmente, que fueron determinadas espectrofotométricamente. Los datos citotóxicos se expresan como GI<sub>50</sub> (concentración que inhibe el 50% del crecimiento de las células), TGI (concentración que inhibe totalmente el crecimiento de las células) y LD<sub>50</sub> (concentración que mata el 50% de las células). Dichos valores se obtienen por extrapolación en las curvas dosis-respuesta de la concentración donde los porcentajes de supervivencia son 50 (GI<sub>50</sub>), 0 (TGI) y -50 (LD<sub>50</sub>). En estos ensayos se ha empleado como control positivo la doxorubicina.



**Figura 18. Imagen representativa de un ensayo de citotoxicidad.** En la imagen **A** se observa se muestra la placa de 96 pocillos tras la incubación de las células a 72 horas. En la imagen **B** se observa la placa tras haber retirado el medio y haber añadido el DMSO para la posterior lectura de la placa.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo plano para las células adherentes y de fondo redondo para las células en suspensión. Estos ensayos se realizaron siguiendo dicho procedimiento:

1. Se añaden 20  $\mu\text{L}$  de las distintas disoluciones de los productos en medio a todos los pocillos de las columnas 3-12.
2. Se añaden 80  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo suplementado a los pocillos que tienen compuesto (columnas 3-12), 100  $\mu\text{L}$  del mismo medio a los pocillos control (columna 2) y 200  $\mu\text{L}$  a los pocillos del blanco (columna 1).
3. Se añaden 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de células en medio suplementado, de forma que tengamos un número inicial de 10.000 células para el caso de los cultivos adherentes y de 40.000 células para el cultivo en suspensión, excepto a los pocillos del blanco.
4. De esta manera, el volumen total de todos los pocillos será 200  $\mu\text{L}$ . Las placas se incuban en la estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante el tiempo necesario (72 horas para los experimentos con compuesto y para la placa  $t_0$  se pasa al apartado 5).
5. Se añaden 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de MTT (2 mg/mL en PBS) a todos los pocillos y la placa se incuba durante 4 horas en la estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ .
6. Se aspira el contenido de cada pocillo mediante un aparato lavador de placas programado de forma que sólo quede un volumen de 10  $\mu\text{L}$  en cada pocillo. En el caso de las placas de fondo redondo, se requiere una centrifugación previa a dicha aspiración (1.200 r.p.m durante 2 minutos).

7. Se añaden 150  $\mu$ L de DMSO y la absorbancia se lee en un lector de ELISA Bio Kinetics Reader (BIO-TEK) a una longitud de onda de 550 nm, sustrayendo el valor obtenido a 630 nm para reducir el ruido de fondo.

En todos los experimentos se utiliza como control positivo una muestra de células incubadas con Doxorubicina. Los datos obtenidos se expresan como porcentaje celular medio para cada concentración  $\pm$  SEM (error típico de la media). Estos datos de crecimiento se calculan a partir de los datos de absorbancia obtenidos utilizándose las siguientes fórmulas:  $[(A-A_0)/(A_c-A_0)] \times 100$  cuando  $A \geq A_0$  y  $[(A-A_0)/A_0] \times 100$  cuando  $A < A_0$ , donde A = absorbancia del compuesto;  $A_0$  = absorbancia a tiempo cero;  $A_c$  = absorbancia del control. Así, los datos de  $GI_{50}$ , TGI y  $LD_{50}$  se obtuvieron por extrapolación en las curvas dosis-respuesta y se expresaron en valores micromolar. Los datos se obtienen de al menos tres experimentos independientes con cada concentración repetida por cuadruplicado en cada uno de ellos.

#### 4. DETECCIÓN DE APOPTOSIS

- Anexina V-IP

Para la determinación del porcentaje de apoptosis en la línea celular tumoral CCRF-CEM se ha empleado la técnica de tinción conjunta de anexina V unida a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ioduro de propidio (IP). El complejo anexina V-FITC se une a la superficie celular y su señal se detecta a 525nm. El ioduro de propidio se introduce en el interior de la célula y se une al DNA, detectándose su señal a 620nm.

Se sabe que uno de los acontecimientos tempranos durante el proceso de apoptosis es el movimiento de la fosfatidilserina desde la capa interna hasta la capa externa de la membrana plasmática de las células. La anexina V se une a la fosfatidilserina. Las células apoptóticas reaccionan con la anexina V antes de que se pierda la integridad de la membrana y el ioduro de propidio entre en las células y se una al DNA, cosa que sucede en estadios tardíos del proceso de apoptosis. Por tanto, marcando las células con una combinación de anexina V-FITC e ioduro de propidio es posible diferenciar las células vivas no apoptóticas (FITC<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>), las células apoptóticas tempranas (FITC<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>) y las células apoptóticas tardías o las células necróticas (FITC<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>).

Estos ensayos se realizaron mediante el siguiente procedimiento:

1. Las células se precipitan por centrifugación (1500 r.p.m., 6 min, 4°C).
2. Se incuban las células durante 48 horas a 37°C, a una concentración de  $(1,0-0,6) \times 10^6$  células/mL en placas de 6 pocillos ( $V_f = 3\text{mL}$ ) en presencia o ausencia de los derivados a una concentración de 25  $\mu\text{M}$ . Las células en ausencia de BSC se incubaron en presencia de una cantidad equimolar de su disolvente, DMSO.
3. Al finalizar el tiempo de incubación, se centrifugan las células (1500 r.p.m., 6 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.
4. Se lavan las células resuspendiéndolas con 1 mL de PBS 1x frío, 2 veces en falcons de 15 mL.
5. Una vez lavadas las células se resuspenden en 1 mL de PBS 1x y se pasan a eppendorfs en hielo.
6. Las células se centrifugan (1500 r.p.m., 6 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.
7. A continuación, se procede al doble marcaje de las células con anexina V-FITC e ioduro de propidio (IP) empleando el “*kit Anexina V-FITC*” (BD Biosciences, San Diego, CA). A una muestra de  $5 \times 10^5$  células en 100 $\mu\text{L}$  del tampón de carga 1x se añade 5 $\mu\text{L}$  de anexina V-FITC y 5 $\mu\text{L}$  de IP.
8. Las muestras son incubadas en oscuridad a 4 °C durante 15 minutos.
9. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añade 400 $\mu\text{L}$  del tampón de carga 1x frío.
10. Finalmente, se mide por citometría de flujo en un citómetro *COULTER Epics XL* (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA). Para cada muestra se analizó la fluorescencia verde (debida al FITC) y la roja (debida al IP) procedente de 10.000 células. La longitud de onda de excitación es de 488nm, la fluorescencia del FITC se detecta a 525nm, y la correspondiente al IP a 620nm.

Los resultados se expresan como el valor medio del porcentaje de células apoptóticas  $\pm$  SD. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado.

En todos los experimentos se utiliza como control positivo una muestra de células incubadas con Camptotecina (Sigma-Aldrich) y una muestra de células en presencia de DMSO a una cantidad equimolar, en las mismas condiciones de incubación que los compuestos.

- Kit Apo-Direct

Para la estimación del porcentaje de apoptosis en la línea celular tumoral MCF-7, se ha empleado el kit Apo-Direct™ (BD Biosciences), basado en la técnica TUNEL. Uno de los pasos tardíos en la apoptosis es la fragmentación del DNA, el cual es resultado de la activación de las endonucleasas durante el proceso apoptótico. Estas nucleasas degradan la estructura de la cromatina en pequeños fragmentos de DNA. Este método es empleado en la detección de dichos fragmentos de DNA utilizando una reacción catalizada por TdT (desoxinucleotidil transferasa terminal) exógeno, nombrado como “end-labelling” o “TUNEL”. Este método es analizado por citometría de flujo *COULTER Epics XL*, detectándose el fluorocromo FITC a 525nm y el fluorocromo ioduro de propidio (IP) a 620nm.

Estos ensayos se realizaron siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Se incuban las células durante 24 horas a 37°C, a una concentración de  $1,5 \times 10^6$  células/mL en frascos de 25 cm<sup>2</sup> ( $V_f = 5\text{mL}$ ).
2. Al finalizar el tiempo de incubación, se retira el medio por aspiración. Se añade 5mL de medio suplementado con el compuesto a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  y se incuba el tiempo deseado. En el caso de los experimentos según la concentración de BSC, se añaden los compuestos a la concentración deseada y se incuba 24 horas.
3. Una vez cumplida la incubación, se tripsinizan las células y se fijan resuspendiéndolas en 2mL de paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 1% (p/v) en PBS, incubándolas durante 1 hora a 4°C.
4. A continuación, las células se centrifugan (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por aspiración.
5. Se lavan con 5mL de PBS y se centrifugan (1500 r.p.m. durante 5 min, 4°C), dos veces.
6. Se resuspenden las células en etanol 70% y se incuba un mínimo de 30 minutos a 4°C.
7. Transcurrido ese tiempo, se guardan a -20°C, hasta ser preparadas las muestras para su lectura.

8. Para la lectura de las muestras, se prepara la solución de marcado que consta de Reaction Buffer, TdT Enzyme, FITC-dUTP y agua destilada.
9. Antes de añadir a las células la solución de marcado, son centrifugadas (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y lavadas con Wash Buffer, dos veces.
10. Una vez lavadas, se le añade 50µL de la solución de marcado y se incuban las muestras en un baño a 37°C durante 1 hora.
11. Transcurrido el tiempo de incubación, se añade 1mL de Rinse Buffer y se centrifuga (1500 r.p.m., 5 min, 4°C), dos veces.
12. A continuación, se añade 0,5mL de PI/Rnasa Staining Buffer y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
13. Finalmente, se mide en un citómetro *COULTER Epics XL*. La longitud de onda de excitación es de 488nm, la fluorescencia del FITC se detecta a 525nm, y la correspondiente al IP a 620nm.

Los resultados se expresan como el valor medio del porcentaje de células apoptóticas  $\pm$  SD a distintos tiempos o concentraciones. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado.

En todos los experimentos se utiliza como control positivo una muestra de células incubadas con camptotecina y una muestra de células en presencia de DMSO a una cantidad equimolar, en las mismas condiciones de incubación que los compuestos.

## 5. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

El estudio de las fases del ciclo celular en MCF-7 se realiza siguiendo la misma metodología empleada para la determinación de apoptosis por el método Apo-Direct™. Los resultados se obtienen registrando la fluorescencia del IP en escala lineal.

Los resultados se expresan como el valor medio del porcentaje de células en las distintas fases del ciclo  $\pm$  SD a distintos tiempos. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado. Se ha empleado como control positivo la camptotecina en todos los experimentos realizados.

## 6. MEDIDA DE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ROS

La generación de ROS se ha evaluado mediante el empleo del diacetato de 5-(y 6-) carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (CM-H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR). Este compuesto reacciona específicamente con ROS dando lugar a un compuesto fluorescente. Dicha intensidad de fluorescencia es proporcional al contenido intracelular de los radicales libres producidos. La concentración de los radicales libres producidos es determinada por citometría de flujo.

Estos ensayos se realizaron según el siguiente procedimiento:

1. Las células se cultivaron durante 4, 12, 24, 48 y 72 horas a una concentración de  $1,5-2 \times 10^6$  células/mL, en frascos de 25 cm<sup>2</sup> ( $V_f = 5$  mL) con o sin compuesto (25  $\mu$ M).
2. Una vez cumplida la incubación, se retira el medio y se añade 5 mL de medio sin suplementar + 12,5  $\mu$ L de fluorocromo, y se incuban durante 1 hora a 37 °C en oscuridad y agitación.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tripsiniza las células.
4. Se resuspenden las células en 2 mL de PBS.
5. Se mide en el citómetro *COULTER Epics XL* a una longitud de excitación de 488 nm.

Para cada muestra, se obtiene el valor de la media aritmética de la fluorescencia a 525 nm procedente de 20.000 células.

Los resultados se expresan como porcentaje de fluorescencia  $\pm$  SD a distintos tiempos. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado.

## 7. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS

La estimación de la actividad de las diferentes caspasas se ha evaluado mediante el empleo del método fluorimétrico, *ApoAlert Caspase assay plate kit* (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA). Este método se basa en una placa de 96 pocillos en los cuales está fijado un sustrato fluorogénico específico para las distintas caspasas inmovilizadas en dichos pocillos. VDAD-AMC, DEVD-AMC, IETD-AMC y LEHD-AMC son los sustratos respectivos de las caspasas -2, -3/-7, -8 y -9.

Estos ensayos se realizaron mediante el siguiente procedimiento:

1. Se incuban las células durante 24 horas a 37°C, a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL en frascos de 25 cm<sup>2</sup> ( $V_f = 5\text{mL}$ ).
2. Al finalizar el tiempo de incubación, se retira el medio por aspiración. Se añade 5ml de medio suplementado con el compuesto a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  y se incuba el tiempo deseado (4, 12 y 24 horas).
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tripsiniza las células y se procede al recuento celular ( $2 \times 10^5$  cs/pocillo).
4. Se centrifuga la suspensión celular (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por aspiración.
5. Se resuspende el pellet con el 1x Cell Lysis Buffer. Incubar 10 minutos en hielo.
6. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifuga (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se transfiere el sobrenadante a tubos de microcentrífuga (se guarda en hielo).
7. Mientras las muestras se mantienen en hielo, se añade 50  $\mu\text{L}$  del Reaction Buffer/DTT a cada pocillo e incubar 5 minutos a 37°C.
8. Una vez transcurrido el tiempo de incubación de la placa, se añade 50  $\mu\text{L}$  del lisado celular a cada pocillo y se incuba 2 horas a 37°C.
9. Finalmente, se mide en un fluorímetro FLUOROSKAN ASCENT FL (Thermo labsystems, Waltham, MA). La longitud de onda de excitación es de 380 nm y la de emisión es de 460 nm.

Los resultados se expresan como tanto por uno respecto al control de fluorescencia  $\pm$  SD a distintos tiempos. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado.

## 8. INHIBIDOR DE CASPASAS

Para la constatación de la implicación de la activación de algunas caspasas en el proceso de muerte celular inducido por los derivados bisacilimidosenocarbamato (BSC) en la línea celular tumoral MCF-7 se han realizado ensayos de apoptosis siguiendo la misma metodología empleada para la determinación de apoptosis por el método Apo-Direct<sup>TM</sup> en presencia de un

inhibidor de caspasas universal, z-VAD-fmk (BD Biosciences). Dicho inhibidor se añade a una concentración de 50  $\mu$ M, una hora antes del posterior tratamiento de las células con los derivados.

Los resultados se expresan como el valor medio del porcentaje de células apoptóticas  $\pm$  SD a distintos tiempos. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por duplicado.

## 9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS REGULADORAS

Tras observar el efecto de los derivados BSC, **3g** y **3n**, en las células MCF-7, se ha querido comprobar la posible alteración de la expresión de las proteínas implicadas en el control de la muerte apoptótica y del ciclo celular. Por ello, se han analizado los niveles de expresión de proteínas de la familia de Bcl-2 (Bcl-2, Bid), de las ciclinas (A, B1), de la Cdk-1 y Cdk-2, del inhibidor de Cdks p21<sup>CIP</sup>, del factor de transcripción p53, Chk-2 y PIDD, mediante el método de inmunofluorescencia indirecta y de Western-blot.

- Análisis por Western-blot:

La técnica de inmunoprecipitación permite la separación de complejos antígeno-anticuerpo específicos de una mezcla compleja de proteínas mediante el empleo de moléculas capaces de unirse específicamente a los anticuerpos, formando unas asociaciones, que tras un SDS-PAGE pueden ser reveladas por Western-blot.

Estos ensayos se llevaron a cabo mediante el siguiente procedimiento:

1. Se incuban las células en presencia o ausencia de los compuestos BSC (25  $\mu$ M) en placas de 6 pocillos durante 24 y 48 horas, respectivamente.
2. Tras la incubación, se depositan las placas en hielo y se recoge la suspensión en eppendorfs.
3. Se lava los pellets con 1mL de PBS.
4. Se centrifuga la suspensión celular (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.
5. Los pellets se resuspenden en tampón de lisis (SDS 0,1%, Triton x-100 0,1%, NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM, EDTA 1mM, ortovanadato sódico 1mM, NaF 10mM, Deoxicolato sódico 0,1% y cocktail de inhibidores SIGMA 0,1%; pH 7.2) en un volumen de 30  $\mu$ L por pocillo durante 30 minutos en hielo.

6. Se centrifuga la suspensión celular (13000 r.p.m., 15 min, 4°C).
7. Se recogen las suspensiones en nuevos eppendorf y se almacena a -80 °C. La determinación de proteína en las muestras se realizó con *BCA*
8. Se cargan las muestras en geles de poliacrilamida al 10% (30 µg por calle), y se lleva a cabo la electroforesis SDS-PAGE según el método Laemmli.
9. Una vez terminada la electroforesis, se procede a la transferencia de las muestras a membranas de fluoruro de polivinilo Hybond-P (GE Healthcare). Para comprobar si la transferencia se ha realizado correctamente, se tiñen las membranas con Ponceau-S.
10. A continuación, se incuban las membranas con una solución de leche desnatada al 5% en buffer TBS-Tween al 1% durante 1 hora en agitación, con el fin de evitar uniones inespecíficas.
11. Posteriormente, las membranas se incuban en agitación durante toda la noche a 4 °C en una solución de anticuerpos primarios dirigidos contra las diferentes proteínas a estudiar. Los anticuerpos se diluyen en buffer TBS-Tween al 1% utilizando un factor de dilución que oscila entre 1:100 y 1:200, dependiendo de la proteína.
12. Tras la incubación, las membranas se lavan 5 minutos en agitación con TBS-Tween al 1%, 5 veces.
13. Una vez lavadas, se incuban con la solución de anticuerpo secundario peroxidado durante 1 hora en agitación.
14. Pasado el tiempo de incubación, se realizan diversos lavados (repetir paso 12).
15. A continuación, se realiza el marcaje mediante el uso del método quimioluminiscente Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

En estos experimentos, se ha empleado la  $\beta$ -Actina (Cell Signalling) como control positivo para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada de cada muestra en los diferentes geles.

Una vez revelado el marcaje anterior, las membranas son sometidas al proceso de *stripping* utilizando la solución Re-Blot Plus Mild Solution (Chemicon Internacional). Para ello, se han llevado a cabo los siguientes pasos:

1. Se incuban las membranas en 5 mL de la solución de stripping (500  $\mu$ L de la solución Re-Blot Plus Mild Solution + 4,5 mL de agua milli Q autoclavada), durante 50 minutos a 60 °C.
2. A continuación, son bloqueadas mediante su incubación en una solución de leche desnatada al 5% en buffer TBS-Tween al 1% durante 1 hora en agitación.
3. Posteriormente, las membranas se incuban en agitación durante toda la noche a 4 °C en una solución de anticuerpos específicos en buffer TBS-Tween al 1% utilizando un factor de dilución 1:750.
4. Tras la incubación, las membranas se lavan 5 minutos en agitación con TBS-Tween al 1%, 5 veces.
5. Una vez lavadas, se incuban con la solución de anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora en agitación.
6. Pasado el tiempo de incubación, se realizan diversos lavados (repetir paso 4).
7. A continuación, se realiza el marcaje mediante el uso del método quimioluminiscente Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

Los valores obtenidos de cada proteína a estudiar se normalizan respecto a la cantidad de  $\beta$ -Actina obtenida en la misma membrana. La intensidad de las bandas se cuantifica mediante un densitómetro GS-800 (Bio-Rad).

- Análisis por Inmunofluorescencia:

Para la cuantificación de los niveles de expresión de las distintas proteínas se ha empleado una segunda técnica más sensible y cuantitativa que el método de Western-blot, la inmunofluorescencia indirecta.

Para la detección de las proteínas, se ha incubado las células tratadas con los anticuerpos primarios correspondientes a cada proteína, y posteriormente, con un anticuerpo secundario unido al fluorocromo FITC. Para la proteína Cdk-1/Cdc2-p34 (B-6), se ha utilizado anticuerpos monoclonales de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Para las proteínas Bcl-2 (N-19), Bid (FL-195), ciclina A (C-19), ciclina B1(H-20), Cdk-2 (M-2) y p21<sup>CIP</sup> (N-20), se han utilizado anticuerpos policlonales de conejo (Santa Cruz Biotechnology). Y para las proteínas p53 (C-19) y Chk-2 (N-17), se han utilizado anticuerpos policlonales de cabra (Santa Cruz Biotechnology).

Como controles negativos se ha utilizado anticuerpos isotípicos de las distintas proteínas fosforiladas (Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas a 37°C. Como anticuerpo secundario se han empleado anticuerpos de cabra y burro conjugados con FITC (Santa Cruz Biotechnology).

Estos ensayos se han realizado siguiendo dicho procedimiento:

1. Las células se cultivan en frascos de 25 cm<sup>2</sup>, en presencia o ausencia de los compuestos BSC (25 µM) durante 24 horas.
2. Tras la incubación, se recogen y se lavan con 5 mL de PBS.
3. Se centrifuga la suspensión celular (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.
4. Se resuspende el pellet en 5mL de buffer lavado (PBS / 0,1% NaN<sub>3</sub> / 1% suero fetal bovino inactivado; pH 7.1-7.4).
5. Se centrifuga la suspensión celular (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.
6. Se realiza la fijación de las células añadiendo gota a gota 10 mL de Etanol frío al 75% (en PBS) al mismo tiempo que se agita con el vórtex. Las células fijadas se incuban a -20°C un mínimo de 2 horas.
7. Una vez pasado el tiempo de incubación, se centrifuga la suspensión celular (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.
8. Se resuspende el pellet en 5mL de buffer lavado (PBS / 0,1% NaN<sub>3</sub> / 1% suero fetal bovino inactivado; pH 7.1-7.4).
9. Se centrifuga la suspensión celular (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.
10. Las células son permeabilizadas con 5 mL de Triton x-100 frío (al 0,25% en buffer de lavado) durante 5 minutos a 4°C.
11. Una vez transcurridos los 5 minutos, se centrifuga la suspensión celular (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.
12. Se resuspende el pellet en 5mL de buffer lavado (PBS / 0,1% NaN<sub>3</sub> / 1% suero fetal bovino inactivado; pH 7.1-7.4).
13. Se centrifuga la suspensión celular (1500 r.p.m., 5 min, 4°C) y se retira el medio por decantación.

14. A continuación, cada muestra de células se separa en cuatro alícuotas ( $10^6$  cs/tubo). Tres de las alícuotas se incuban con el anticuerpo primario correspondiente a cada una de las proteínas y la segunda, utilizada como control negativo, se incuba con el correspondiente anticuerpo primario bloqueado previamente con su péptido específico, según la proteína estudiada.
15. Tras un lavado con 700  $\mu$ L de buffer de lavado, se realiza una segunda incubación con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con FITC.
16. Finalmente, las células son resuspendidas en 700 $\mu$ L de PBS y analizadas mediante citometría de flujo con el citómetro *COULTER Epics XL*.
17. Los resultados se expresan como tanto por uno respecto al control de fluorescencia  $\pm$  SD. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por triplicado.

## **10. MEDICIÓN DE LOS CAMBIOS EN EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL**

Se han analizado los cambios dados en el potencial de membrana mitocondrial mediante el empleo del *Staining Mitochondrial Kit* (Sigma-Aldrich).

Estos ensayos se realizaron siguiendo dicho procedimiento:

1. Se incuban las células durante 24 horas a 37°C, a una concentración de  $2 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos ( $V_f = 2$ mL).
2. Al finalizar el tiempo de incubación, se retira el medio por aspiración. Se añade 2 mL de medio suplementado con el compuesto a una concentración de 25  $\mu$ M y se incuba el tiempo deseado (4, 12, 24 y 72 horas).
3. Una vez cumplida la incubación, se retira el medio y se añade 400  $\mu$ L de la mezcla Staining solution-medio suplementado (50:50) y se incuban durante 20 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.
4. Una vez finalizada la incubación, se retira el medio por aspiración.
5. Se lavan dos veces con 150  $\mu$ l de medio suplementado.

6. Se añade 50  $\mu\text{L}$  de medio suplementado y se mide en un fluorímetro FLUOROSKAN ASCENT FL. La longitud de onda de excitación es de 490 nm y la de emisión es de 530 nm (correspondientes a la fluorescencia de JC-1 monómeros).

En todos los experimentos se utiliza como control positivo una muestra de células incubadas con valinomicina (Sigma-Aldrich) y una muestra de células en presencia de DMSO a una cantidad equimolar, en las mismas condiciones de incubación que los compuestos.

Los resultados se expresan como porcentaje de fluorescencia  $\pm$  SD a distintos tiempos. Para cada compuesto se realizan al menos tres experimentos independientes, en los cuales cada compuesto se determina por cuadruplicado.

## **11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

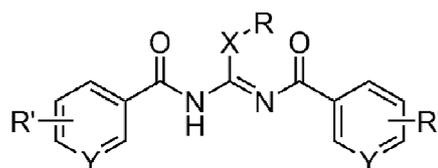
Para la evaluación estadística de los resultados se ha utilizado el programa SPSS 17.00 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU.). Se ha realizado en cada caso el test de normalidad de Shapiro-Wilks y Kolmogorov-Smirnov. En los casos que han resultado significativos, se ha realizado el Test de la U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas, y para los grupos con distribución normal se ha realizado la prueba de t student para muestras paramétricas. Valores de  $p < 0,01$  se han considerado estadísticamente muy significativos. Valores de  $p < 0,05$  se han considerado estadísticamente significativos.

# **RESULTADOS**



## 1. RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD

Se han realizado ensayos *in vitro* de los derivados bisacilimidoselecarbamato (BSC) (Figura 19) en las líneas celulares tumorales de mama (MCF-7), colon (HT-29), pulmón (HTB-54) y leucemia (CCRF-CEM) y en una línea celular inmortalizada no tumoral (184B5) derivada de tejido epitelial normal de glándula mamaria, con la finalidad de valorar su selectividad. La actividad citotóxica se ha determinado mediante el ensayo colorimétrico del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoilo) a 72 horas. Los resultados se expresan como GI<sub>50</sub>, dosis que inhibe un 50% el crecimiento celular con respecto a las células control, TGI, dosis que inhibe totalmente el crecimiento de las células y LD<sub>50</sub>, concentración que mata el 50% de las células. Los parámetros citotóxicos GI<sub>50</sub>, TGI y LD<sub>50</sub> se han determinado por extrapolación en las curvas dosis-respuesta (Figuras 1-17, Anexo). En estos ensayos se ha utilizado doxorubicina como control positivo. Los resultados de los parámetros citotóxicos de los derivados BSC se muestran en la Tabla 2.



Compuesto	X	R	Y	R'
<b>3a</b>	S	CH <sub>3</sub>	N	2-Cl
<b>3b</b>	Se	CH <sub>3</sub>	N	2-Cl
<b>3c</b>	S	CH <sub>3</sub>	C	H
<b>3d</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	H
<b>3e</b>	Se	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C	H
<b>3f</b>	Se	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C	H
<b>3g</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	3,5-diOCH <sub>3</sub>
<b>3h</b>	Se	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C	3,5-diOCH <sub>3</sub>
<b>3j</b>	Se	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C	4-Cl
<b>3k</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	4-Cl
<b>3l</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	4-NO <sub>2</sub>
<b>3m</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	4-CF <sub>3</sub>
<b>3n</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	4-CN
<b>3p</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	4-CH <sub>3</sub>
<b>3q</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	4-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
<b>3r</b>	Se	CH <sub>3</sub>	N	H
<b>3s</b>	Se	CH <sub>3</sub>	C	3,4,5-triOCH <sub>3</sub>

Figura 19. Estructura de los compuestos BSC estudiados en este trabajo.

Tabla 2. Resultados de la actividad citotóxica de los derivados bisacilimidoselecarbamato (BSC) en las distintas líneas celulares.

DERIVADOS BISACILIMIDOSELENOCARBAMATO													
COMPUESTO	PARÁMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES					COMPUESTO	PARÁMETROS CITOTÓXICOS	LÍNEAS CELULARES				
		CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5			CCRF-CEM	HTB-54	HT-29	MCF-7	184B5
3a	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	> 100	> 100	75,30	23,29	<b>0,37</b>	3k	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>2,47</b>	> 100	<b>7,72</b>	<b>1,14</b>	<b>0,54</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	> 100	> 100	> 100	> 100	50,34		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>8,82</b>	> 100	72,11	51,61	35,90
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
3b	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>0,16</b>	<b>5,83</b>	<b>8,06</b>	<b>0,07</b>	<b>0,007</b>	3l	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	71,47	> 100	65,54	<b>0,80</b>	<b>5,19</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>3,22</b>	45,22	44,61	<b>2,59</b>	30,84		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	> 100	> 100	> 100	49,70	52,71
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>9,47</b>	> 100	87,66	49,55	68,81		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
3c	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	17,14	42,19	58,35	<b>0,009</b>	<b>0,006</b>	3m	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>3,87</b>	<b>1,29</b>	<b>0,61</b>	<b>0,004</b>	<b>0,54</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	72,60	80,26	> 100	40,87	36,21		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>6,46</b>	<b>9,39</b>	<b>5,77</b>	<b>2,37</b>	<b>2,20</b>
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	> 100	> 100	> 100	> 100	95,86		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>9,06</b>	70,47	55,40	25,26	<b>6,69</b>
3d	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	18,54	28,81	<b>5,15</b>	<b>0,05</b>	<b>0,07</b>	3n	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>3,35</b>	<b>1,45</b>	<b>0,63</b>	<b>0,002</b>	<b>1,15</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	47,97	60,07	<b>9,15</b>	<b>0,78</b>	<b>0,82</b>		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>6,07</b>	64,40	<b>5,18</b>	<b>0,27</b>	<b>4,60</b>
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	77,40	91,33	62,03	<b>6,98</b>	<b>5,70</b>		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>8,80</b>	> 100	71,92	<b>7,83</b>	<b>8,06</b>
3e	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>2,48</b>	40,02	<b>8,27</b>	<b>0,02</b>	<b>0,002</b>	3p	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>3,03</b>	<b>3,40</b>	<b>5,23</b>	<b>0,10</b>	<b>1,70</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>7,59</b>	69,21	39,03	<b>1,90</b>	15,47		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>5,94</b>	<b>6,93</b>	<b>9,14</b>	<b>1,44</b>	<b>6,13</b>
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	42,24	98,40	70,81	71,34	58,84		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>8,85</b>	23,43	54,82	<b>7,79</b>	21,99
3f	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>6,59</b>	61,35	29,70	<b>3,77</b>	<b>0,004</b>	3q	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>3,96</b>	<b>2,44</b>	<b>3,32</b>	<b>0,08</b>	<b>0,17</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	16,24	> 100	74,79	47,97	33,97		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>7,41</b>	<b>9,84</b>	<b>7,63</b>	<b>5,76</b>	<b>3,14</b>
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	60,21	> 100	> 100	98,06	77,93		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	10,86	> 100	59,51	> 100	<b>7,54</b>
3g	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>2,92</b>	<b>1,99</b>	<b>3,44</b>	<b>0,77</b>	<b>5,41</b>	3r	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	21,40	> 100	<b>4,44</b>	<b>1,45</b>	42,82
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>5,38</b>	<b>5,85</b>	<b>6,48</b>	<b>5,10</b>	31,07		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	49,34	> 100	<b>9,26</b>	<b>8,79</b>	> 100
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>7,85</b>	<b>9,70</b>	<b>9,52</b>	<b>9,85</b>	81,58		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	77,27	> 100	84,54	> 100	> 100
3h	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>5,63</b>	<b>3,95</b>	<b>5,24</b>	<b>0,18</b>	<b>0,35</b>	3s	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>5,25</b>	11,84	<b>6,33</b>	<b>2,44</b>	<b>2,95</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	38,12	> 100	> 100	<b>4,15</b>	<b>0,87</b>		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>9,40</b>	> 100	20,01	<b>6,43</b>	<b>6,25</b>
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	> 100	> 100	> 100	> 100	40,43		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	65,09	> 100	84,97	24,92	<b>9,55</b>
3j	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>4,71</b>	10,26	<b>2,71</b>	<b>0,92</b>	<b>0,18</b>	Doxorubicina	<i>GI50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>0,033</b>	<b>&lt;10<sup>-2</sup></b>	Nd	<b>0,88</b>	<b>0,001</b>
	<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>8,51</b>	88,62	16,71	<b>5,81</b>	<b>3,78</b>		<i>TGI</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>0,071</b>	<b>1,25</b>	Nd	>100	<b>0,40</b>
	<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	54,15	> 100	> 100	99,31	<b>8,32</b>		<i>LD50</i> ( $\mu\text{M}$ )	<b>0,29</b>	<b>3,45</b>	Nd	>100	<b>2,42</b>

Como se muestra en la Tabla 2, siendo las células CCRF-CEM y MCF-7 generalmente más sensibles y las células HTB-54 y HT-29 más resistentes al efecto citotóxico, la mayoría de los compuestos ensayados son capaces de inhibir el crecimiento de las células tumorales en los ensayos *in vitro* con valores de  $GI_{50}$  del rango nM en células MCF-7. Los compuestos **3b**, **3g**, **3n** y **3p**, los cuales poseen un grupo metilseleno, son los derivados más potentes. Además, entre los análogos de azufre/selenio los compuestos **3b** y **3d** han mostrado una toxicidad mucho mayor que **3a** y **3c**, indicando que la sustitución del selenio con azufre no se tolera bien.

Los derivados **3g** y **3n** se muestran como dos de los compuestos más potentes con valores para todos los parámetros citotóxicos menores de 10  $\mu$ M en dichas líneas celulares. Cabe destacar el compuesto **3n** como agente citotóxico en MCF-7 (adenocarcinoma de mama), que con valores de  $GI_{50} = 2$  nM, TGI = 270 nM y  $LD_{50} = 7,83$   $\mu$ M, es el compuesto más activo en esta línea celular. El compuesto **3g** es el más activo de toda la serie, con valores de  $GI_{50}$ , TGI y  $LD_{50}$  inferiores a 10  $\mu$ M en todas las líneas celulares de cáncer. Además, posee selectividad en la línea tumoral de mama (MCF-7) frente a la línea no tumoral de mama (184B5) ( $LD_{50}184B5/LD_{50}MCF-7 = 81,58/9,85 = 8,3$ ) (Tabla 2).

## 2. LOS COMPUESTOS BSC INDUCEN APOPTOSIS

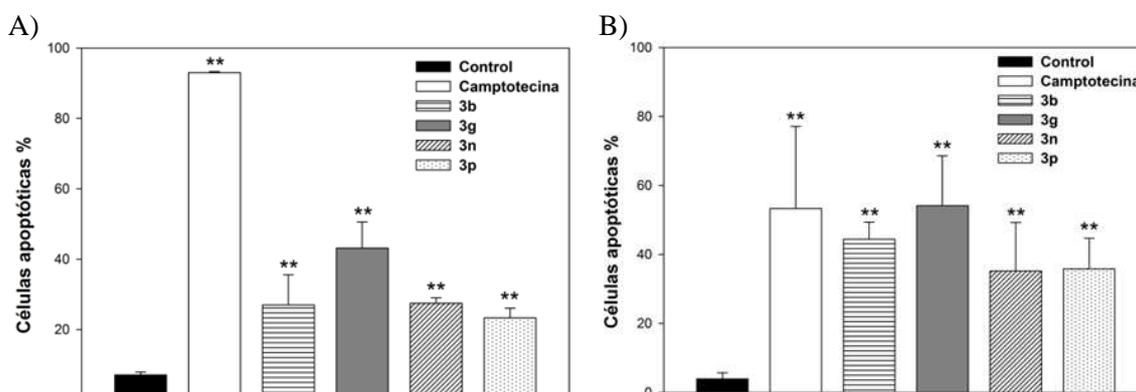
La apoptosis es un tipo de muerte celular empleado por los organismos multicelulares para eliminar las células no deseadas en diversas situaciones (Taylor, R.C., 2008). Además, es un importante proceso celular que puede explicar los efectos preventivos del selenio en cáncer (Philchenkov, A., 2007).

Dado que se ha observado una destacable actividad citotóxica en muchos de los derivados BSC en las diferentes líneas celulares, en este trabajo se ha pretendido caracterizar el proceso de muerte celular inducido por esta serie de moléculas sintetizadas como candidatos a drogas antineoplásicas que en su conjunto denominamos derivados BSC. Dentro de los derivados BSC se han seleccionado los compuestos **3b** [metil *N,N'*-bis(2-cloropiridin-3-carbonil)imidosenocarbamato], **3g** [metil *N,N'*-bis(3,5-dimetoxibenzoil)imidosenocarbamato], **3n** [metil *N,N'*-bis(4-cianobenzoil)imidosenocarbamato] y **3p** [metil *N,N'*-bis(4-metilbenzoil)imidosenocarbamato] para comprobar su capacidad para inducir apoptosis en las líneas celulares tumorales CCRF-CEM y MCF-7.

## 2.1 Determinación de apoptosis en CCRF-CEM y MCF-7

Para determinar si la muerte celular inducida por los derivados BSC **3b**, **3g**, **3n** y **3p**, se produce por apoptosis, se han realizado ensayos en los cuales se determina el porcentaje de células apoptóticas mediante el empleo de la técnica de marcaje conjunto con Anexina V-FITC e ioduro de propidio (IP) seguido de la detección de la doble fluorescencia mediante citometría de flujo en células CCRF-CEM y el empleo del kit ApoDirect™, basado en el efecto TUNEL, para la línea celular tumoral MCF-7 (Figuras 20-22). Las determinaciones se han realizado tras un tratamiento de 48 horas con los BSC seleccionados a una concentración de 25µM. Se ha empleado en todos los experimentos como control positivo camptotecina (25µM).

En la figura 20-A, se resumen los valores medios de porcentaje de células apoptóticas (apoptóticas tempranas + apoptóticas tardías) encontrados tras una incubación a 48 horas en ausencia (control) o presencia de los derivados BSC en células CCRF-CEM. En la figura 20-B, se resumen los valores medios del porcentaje de células subdiploides encontrados tras la incubación a 48 horas en células MCF-7. Como puede observarse en ambas figuras, todos los compuestos han inducido un incremento en el número de células apoptóticas con respecto al control tanto en CCRF-CEM como en MCF-7.

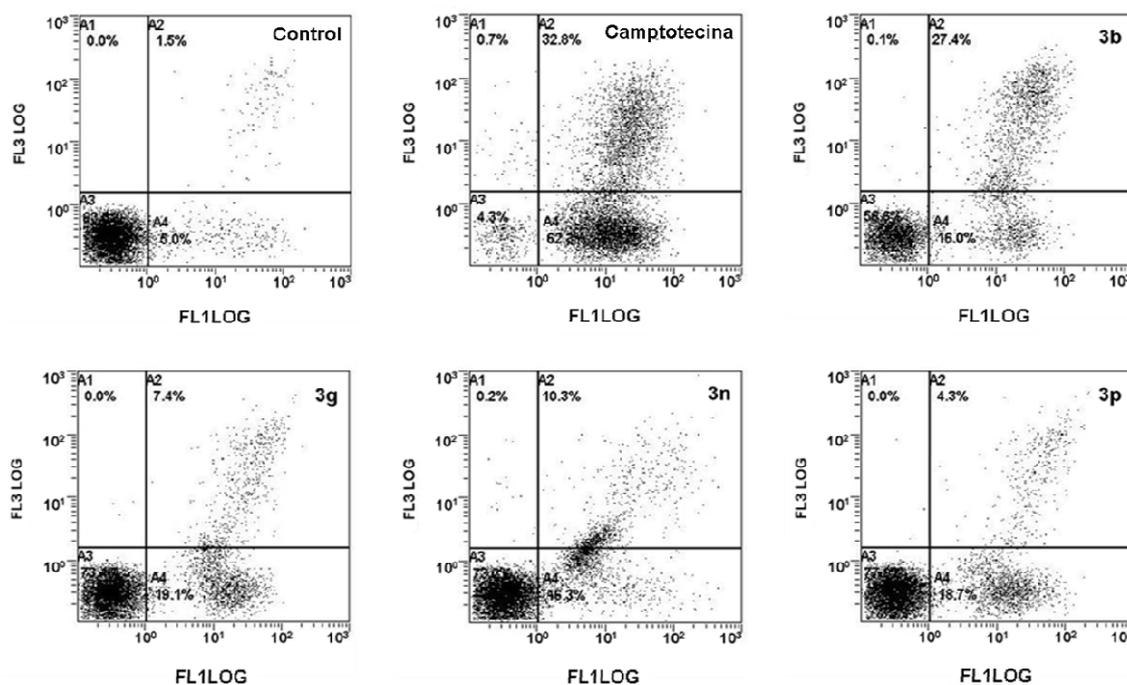


**Figura 20. Apoptosis inducida por los derivados BSC, 3b, 3g, 3n y 3p en CCRF-CEM y MCF-7.** (A) Se han incubado las células CCRF-CEM en ausencia (control) o presencia de los compuestos (25µM) durante 48 horas. El % de apoptosis se refiere a células Anexina V-FITC<sup>+</sup>. (B) Se han incubado las células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de los compuestos (25µM) durante 48 horas. Se ha empleado camptotecina como control positivo (25µM). Los resultados se expresan como la media ± SD de 3 experimentos realizados por duplicado (Tabla1, Anexo). Las células subdiploides se consideran apoptóticas. \*\* (p<0,01) respecto al control en todos los casos.

En la figura 21 se muestra el resultado de un experimento representativo en la línea celular tumoral CCRF-CEM. Las células CCRF-CEM se han incubado en presencia o ausencia del compuesto (25µM) durante 48 horas. Tras 48 horas de incubación en presencia de **3g** se observa un mayor porcentaje de células apoptóticas tempranas (19,1%) con respecto a las incubadas en ausencia del mismo (5,0%). Sin embargo, el aumento del porcentaje de células apoptóticas tardías y/o necróticas en presencia de **3g** con respecto al control es

considerablemente inferior (7,4% frente a 1,5%). Esto indica que el mecanismo de muerte celular principal inducido por **3g** es apoptosis.

Con los compuestos **3b**, **3n** y **3p** se han encontrado resultados similares. Tras 48 horas de incubación en presencia del derivado, se aprecia un aumento en el porcentaje de células apoptóticas tempranas y tardías de **3b** (16,0% y 27,4%), **3n** (16,3% y 10,3%) y **3p** (18,7% y 4,3%) frente a los observados en el control (5,0% y 1,5%). Además, los resultados de **3b** difieren del resto de los derivados BSC, ya que muestran un mayor porcentaje de células apoptóticas tardías que tempranas.



**Figura 21. Apoptosis inducida por los compuestos 3b, 3g, 3n y 3p en CCRF-CEM. Análisis por citometría de flujo.** Se ha incubado las células en presencia o ausencia de compuesto (25 $\mu$ M) durante 48 horas. En cada gráfico, A3 corresponde a células vivas no apoptóticas (anexina V-FITC<sup>-</sup>/IP<sup>-</sup>); A4 corresponde a células apoptóticas tempranas (anexina V-FITC<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup>); A2 corresponde a células apoptóticas tardías y células necróticas (anexina V-FITC<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup>). La figura corresponde a un experimento representativo de un total de 3 ensayos cada uno realizado por duplicado.

En la figura 22 se muestra un ejemplo representativo del análisis obtenido por citometría de flujo con los compuestos **3b**, **3g**, **3n** y **3p** en la línea celular tumoral MCF-7. Las células MCF-7 se han incubado en presencia o ausencia del compuesto (25 $\mu$ M) durante 48 horas. En todos los experimentos se ha empleado como control positivo camptotecina (25 $\mu$ M). Las células subdiploides se consideran apoptóticas.

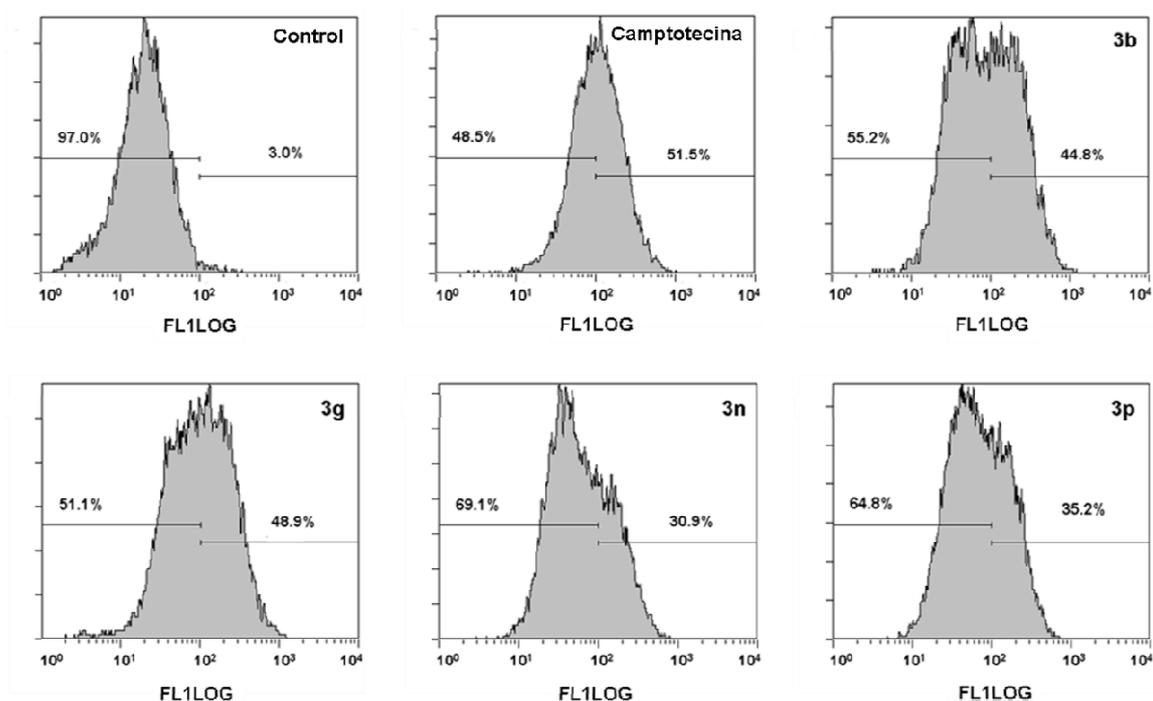
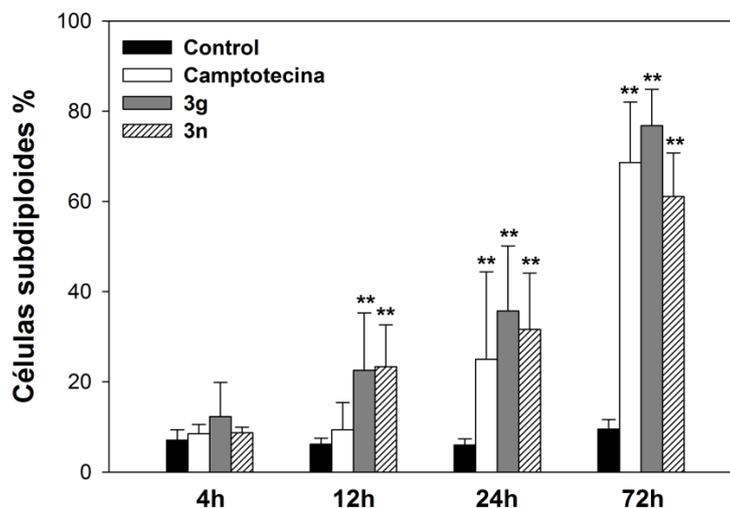


Figura 22. Análisis mediante citometría de flujo del efecto apoptótico de los derivados **3g** y **3n** en la línea celular MCF-7. La figura corresponde a un experimento representativo de un total de 3 ensayos cada uno realizado por duplicado.

## 2.2 Determinación de apoptosis en MCF-7 a diferentes tiempos y concentraciones

A continuación, se ha procedido a analizar si el proceso de muerte celular inducido por los derivados BSC en las células MCF-7 es dependiente de la concentración del derivado y del tiempo de exposición del mismo. Con este fin se ha seleccionado el compuesto **3g** por ser el más activo de la serie en todas las líneas y el compuesto **3n** por ser el más activo en la línea MCF-7. Las determinaciones se han realizado mediante el empleo del kit Apo-Direct™, basado en la técnica TUNEL.

La figura 23 muestra el análisis de los ensayos de apoptosis obtenidos por citometría de flujo con los compuestos **3g** y **3n** a diferentes tiempos de incubación. Las células MCF-7 han sido incubadas en presencia o ausencia del compuesto ensayado (25µM) durante 4, 12, 24 y 72 horas.



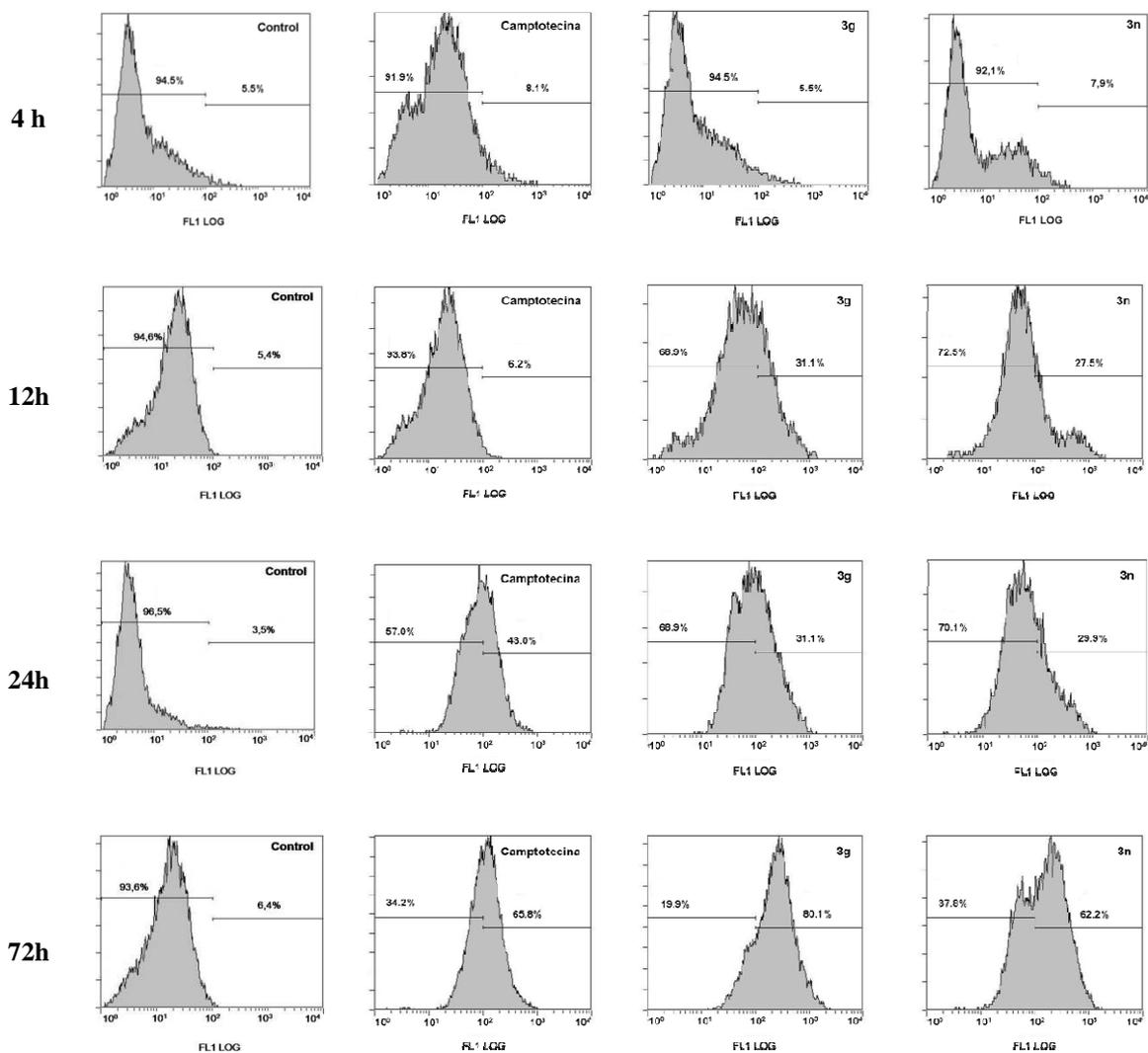
**Figura 23. Apoptosis inducida por 3g y 3n en MCF-7 a distintos tiempos.** Las células se han incubado en ausencia (control) o presencia de los dos compuestos (25 $\mu$ M) durante 4, 12, 24 y 72 horas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (Tabla2, Anexo). Se ha empleado camptotecina como control positivo (25 $\mu$ M). Las células subdiploides se consideran apoptóticas. \*\* (p<0,01), \* (p<0,05) respecto al control en todos los casos.

Tras 4 horas de incubación en presencia del compuesto **3g**, no se han observado cambios significativos en el porcentaje de células apoptóticas respecto al control (12,28% respecto a 7,11%). A partir de 12 horas se observa un mayor porcentaje de células apoptóticas (23,35%) respecto a las células incubadas en ausencia del mismo (6,17%). Esta diferencia de porcentaje va aumentando en función del tiempo de incubación (24 horas: 35,71%; 72 horas: 76,78%).

Respecto al compuesto **3n**, se han observado resultados similares (Figura 23). Se produce un aumento de las células apoptóticas respecto al control a partir de las 12 horas de incubación (22,53% respecto a 6,17%). Este incremento del porcentaje celular se acentúa conforme avanza el tiempo de incubación (24 horas: 31,66%; 72 horas: 61,06%).

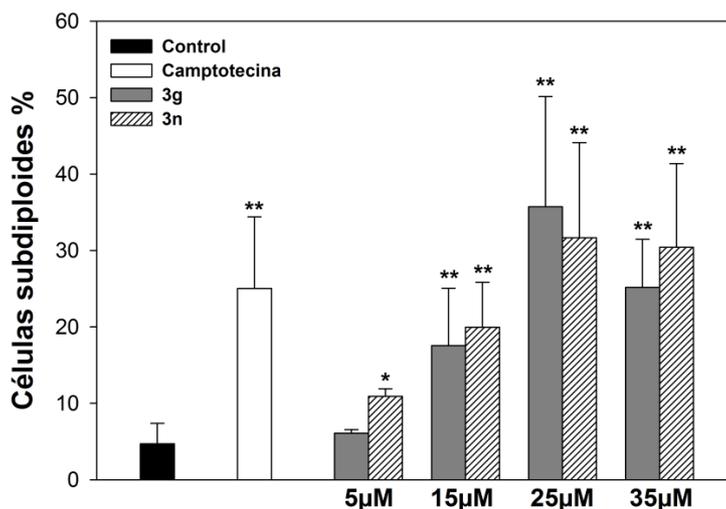
El compuesto **3g** ha resultado ser el compuesto más activo de los dos derivados BSC, induciendo un mayor incremento del porcentaje de células apoptóticas en todos los tiempos de incubación. En todos los experimentos se ha utilizado como control positivo una muestra de células incubadas con camptotecina (25 $\mu$ M).

A continuación, en la figura 24 se muestra un ejemplo representativo del análisis obtenido por citometría de flujo con los compuestos, **3g** y **3n** a diferentes tiempos de incubación.



**Figura 24.** Análisis mediante citometría de flujo del efecto apoptótico de los derivados **3g** y **3n** en la línea celular MCF-7 a diferentes tiempos de incubación. La figura corresponde a un experimento representativo de un total de 3 ensayos cada uno realizado por duplicado.

La figura 25 muestra el resultado obtenido en el análisis de inducción de apoptosis por citometría de flujo con los derivados BSC, **3g** y **3n**, a diferentes concentraciones. Con este fin, las células MCF-7 se han incubado en presencia o ausencia del compuesto ensayado a 5, 15, 25 y 35  $\mu$ M durante 24 horas.



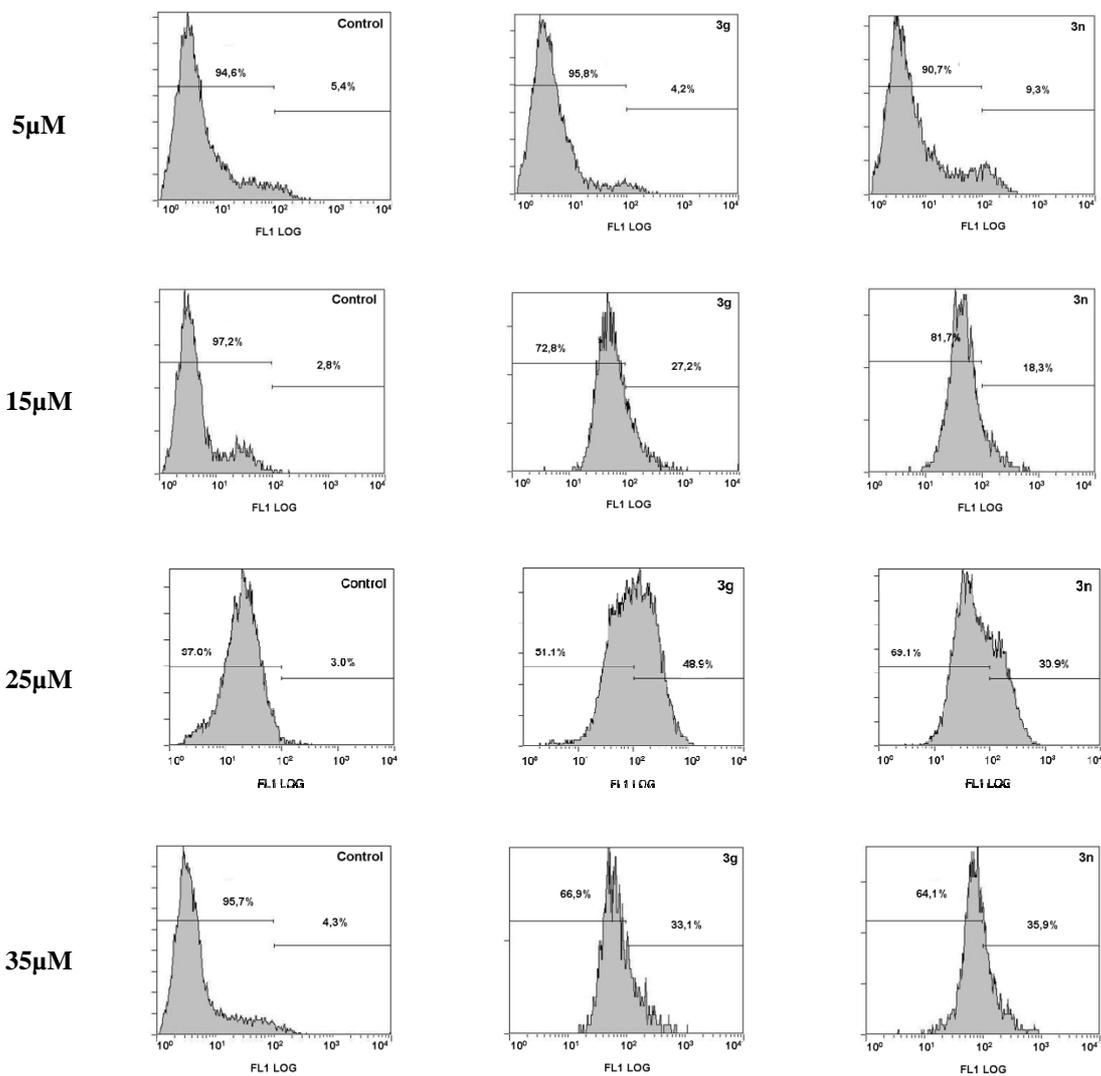
**Figura 25. Apoptosis inducida por 3g y 3n en MCF-7 a distintas concentraciones.** Se han incubado las células en ausencia (control) o presencia de los dos compuestos a 5, 15, 25 y 35  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (Tabla3, Anexo). Camptotecina (25  $\mu\text{M}$ ) empleada como control positivo. Las células subdiploides se consideran apoptóticas. \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) respecto al control en todos los casos.

Como puede observarse, tras 24 horas de incubación en presencia del compuesto **3g** a concentración 5  $\mu\text{M}$  no se ha detectado ningún cambio en el porcentaje de células apoptóticas respecto al control (6,09% respecto a 4,71%). Se ha observado un aumento en el número de células apoptóticas a partir de una concentración de 15  $\mu\text{M}$  del compuesto ensayado (17,56%). Esta diferencia de porcentaje ha ido en aumento en función de la concentración del compuesto **3g**.

En el tratamiento con el compuesto **3n**, se observan valores similares pero el aumento en el número de células apoptóticas respecto a las células incubadas en ausencia de compuesto se hace ya notable a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  (10,91% respecto a 4,71%). El aumento del porcentaje de células apoptóticas respecto al control se acentúa en función de la concentración del compuesto.

En las células tratadas, tanto con el compuesto **3g** como **3n**, a una concentración de 35  $\mu\text{M}$  (25,15%; 30,41% respecto a 4,71%) se produce un aumento del número de células apoptóticas respecto al control, pero el porcentaje de células apoptóticas es menor que a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  (35,71%; 31,66% respecto a 5%). Ésto es debido al error obtenido, lo que significa que no se observan diferencias estadísticas entre ambas concentraciones. En todos los experimentos se ha utilizado como control positivo una muestra de células incubadas con camptotecina (25  $\mu\text{M}$ ).

A continuación, en la figura 26 se muestra un ejemplo representativo del análisis obtenido por citometría de flujo con los compuestos, **3g** y **3n** a diferentes concentraciones en las células MCF-7.



**Figura 26.** Análisis mediante citometría de flujo del efecto apoptótico de los derivados **3g** y **3n** en la línea celular MCF-7 a diferentes concentraciones. La figura corresponde a un experimento representativo de un total de 3 ensayos cada uno realizado por duplicado.

### 3. LOS DERIVADOS BSC INDUCEN ALTERACIONES EN LA MITOCONDRIA

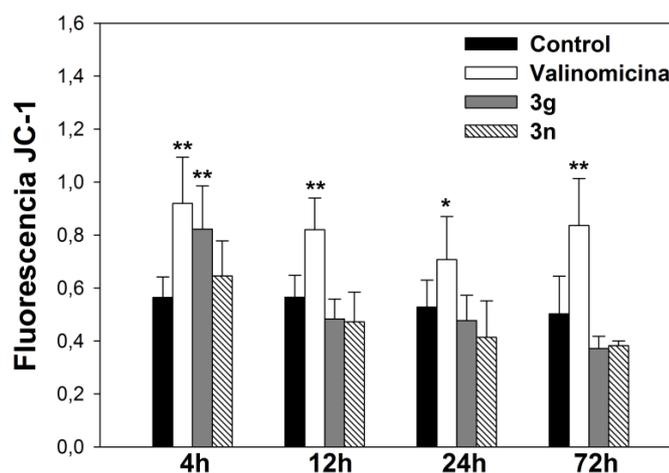
La forma más común de apoptosis en la mayoría de las células de vertebrados se da por la vía mitocondrial, definida por un evento fundamental, la permeabilización de la membrana mitocondrial. Dicha permeabilización se da de manera repentina en la apoptosis (Goldstein, J.C., 2000; Green, D.R., 2004), seguida de la liberación de proteínas que se encuentran normalmente en el espacio entre las membranas interna y externa mitocondrial (citocromo *c*, AIF y otros) en respuesta a una variedad de eventos de la señalización extrínseca e intrínseca. La decisión de muerte mitocondrial se centra en dos procesos: la permeabilización de la membrana interna, como la promovida por las transiciones de permeabilidad de los poros de la mitocondria, que se da cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  alcanza un umbral crítico, y la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP), en la que proteínas proapoptóticas como Bid, Bax y Bak desempeñan un papel clave (Belizário, J.E., 2007).

La pérdida de la integridad mitocondrial es uno de los eventos tempranos en la apoptosis. Para comprobar qué eventos están implicados en la muerte celular inducida por los derivados BSC, se ha analizado la disipación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), los posibles cambios producidos en los niveles intracelulares de ROS y la posible alteración de la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis como Bcl-2 y Bid. Para ello, las células MCF-7 han sido tratadas con los compuestos **3g** y **3n** (25 $\mu\text{M}$ ) a diferentes tiempos de incubación.

#### 3.1 Los derivados **3g** y **3n** provocan disipación de $\Delta\Psi_m$

Para comprobar si los derivados BSC inducen cambios en el  $\Delta\Psi_m$ , se han tratado células MCF-7 con los compuestos **3g** y **3n** a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  durante 4, 12, 24 o 72 horas, tal y como se describe en el apartado Material y Métodos. Se ha empleado en todos los experimentos como control positivo valinomicina (25  $\mu\text{M}$ ).

Como se puede observar en la figura 27, tras tratar las células durante 4 horas con los compuestos **3g** y **3n**, se ha producido una reducción del  $\Delta\Psi_m$ . Pero este efecto no se observa a tiempos más largos, indicando que la reducción de  $\Delta\Psi_m$  inducida por los derivados BSC es reversible.



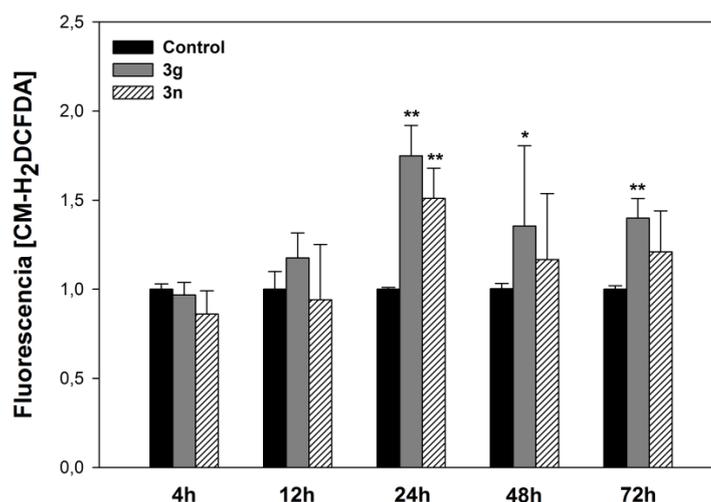
**Figura 27.** Disipación de  $\Delta\Psi_m$  en células MCF-7 inducida por los derivados **3g** y **3n**. Se han incubado las células en ausencia (control) o presencia de los 2 compuestos ( $25\mu\text{M}$ ) a 4, 12, 24 y 72 horas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (Tabla 4, Anexo). Valinomicina ( $25\mu\text{M}$ ) empleada como control positivo. \*\* ( $p<0,01$ ), \* ( $p<0,05$ ) respecto al control en todos los casos.

### 3.2 Los derivados **3g** y **3n** provocan estrés oxidativo en las células MCF-7

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel muy importante en la iniciación y la progresión del cáncer, y los tumores de estadíos avanzados frecuentemente exhiben unos niveles basales elevados de ROS que estimulan la proliferación celular y promueven la inestabilidad genética (Verrax, J., 2011).

La excesiva acumulación de ROS parece jugar un papel esencial en el proceso de apoptosis desencadenado por diferentes fármacos antitumorales (Suzuki, S., 1999; Kim, H.J., 2006). Para evaluar si los derivados BSC, **3g** y **3n**, inducen un aumento en la acumulación de ROS en células MCF-7, se han medido los niveles de ROS en células incubadas durante 4, 12, 24, 48 o 72 horas en presencia o ausencia de estos compuestos ( $25\mu\text{M}$ ). La determinación de los niveles de ROS se ha llevado a cabo mediante citometría de flujo con el fluorocromo CM-H<sub>2</sub>DCFDA.

Como se muestra en la figura 28, los compuestos empleados inducen un cierto incremento en los niveles de ROS intracelulares en la línea celular tumoral MCF-7. Sin embargo, este efecto es detectable a partir de las 24 horas de exposición mientras que el aumento del porcentaje de células apoptóticas inducido por el tratamiento se observa a tiempos más cortos (Figura 23). Este resultado sugiere que el incremento de ROS es consecuencia de la apoptosis inducida por dichos compuestos y que éste no es un mediador esencial en el proceso de muerte celular inducido por dichos derivados.



**Figura 28. Producción de ROS tras la incubación de MCF-7 con los derivados 3g y 3n.** Las células se han incubado en ausencia (control) o en presencia de compuesto (25  $\mu$ M) durante 4, 12, 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, se ha medido la fluorescencia media debida al fluorocromo CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Los resultados de los distintos experimentos se han normalizado adjudicando en cada uno de ellos el valor 1 al obtenido en el control. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (Tabla 5, Anexo). \*\* (p<0,01), \* (p<0,05) respecto al control en todos los casos.

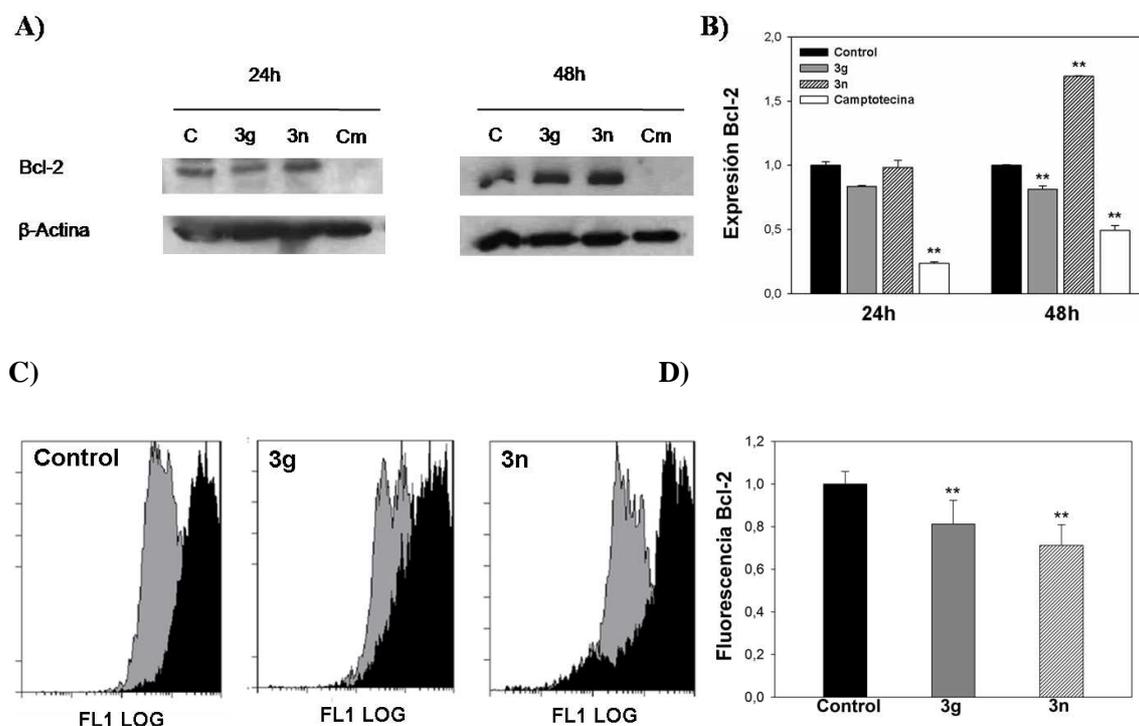
### 3.3 Los derivados BSC inducen cambios en la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bid

La mitocondria juega un papel clave en el mantenimiento de la supervivencia de la célula, pero también es un importante mediador de la muerte celular. El principal evento en la señalización mitocondrial y el control de apoptosis es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de proteínas proapoptóticas en el espacio intermembranoso mitocondrial (Kantari, C., 2011). La apoptosis mitocondrial es principalmente regulada por interacciones moleculares entre los distintos miembros de la familia Bcl-2 (Borner, C., 2003; Youle, R.J., 2008; Kantari, C., 2011).

Las proteínas de la familia Bcl-2 regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la regulación de la apoptosis celular. Entre sus miembros encontramos inductores e inhibidores del proceso apoptótico. Los niveles de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 están alterados en numerosos modelos de apoptosis. La pérdida de  $\Delta\Psi_m$  está regulada en parte por la influencia de la expresión de los miembros de la familia Bcl-2 (Shim, H.Y., 2007), por ello se ha procedido a la medida de los posibles cambios dados en el nivel de expresión de las proteínas antiapoptótica, Bcl-2 y proapoptótica, Bid en las células MCF-7 tratadas con los derivados **3g** y **3n**, mediante las técnicas de western-blot e inmunofluorescencia indirecta.

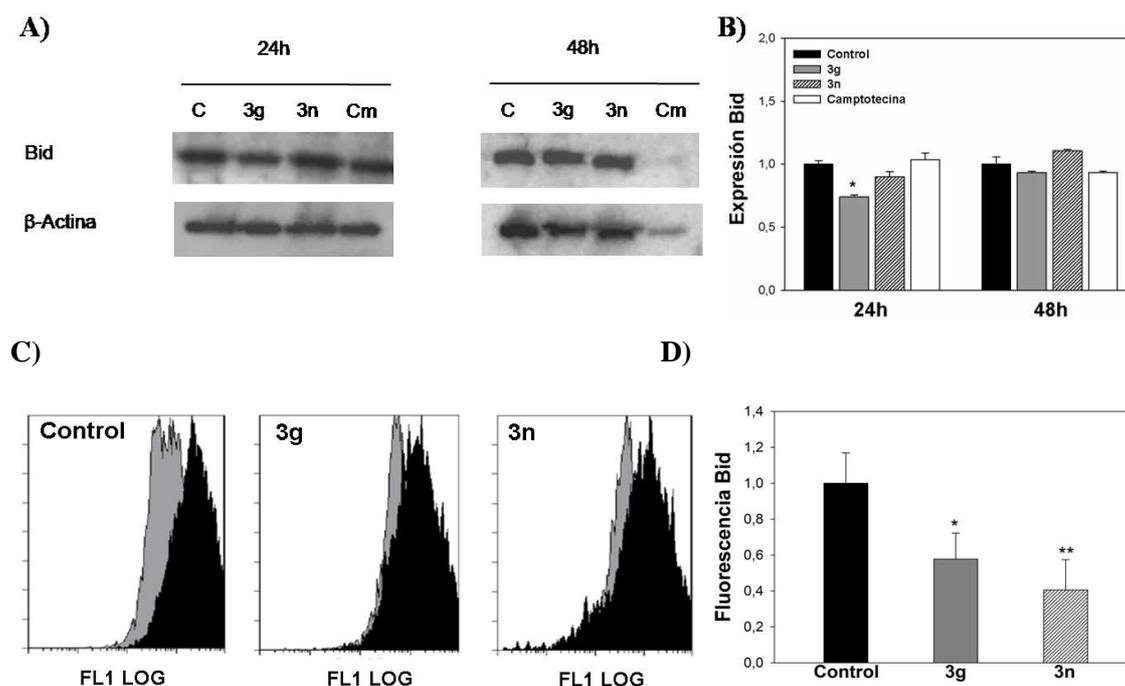
Mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, las células incubadas en ausencia o presencia de **3g** y **3n** (25  $\mu$ M) se han fijado, permeabilizado y expuesto a un anticuerpo primario contra Bcl-2 y posteriormente a un anticuerpo secundario unido a FITC. Para eliminar posibles uniones inespecíficas, en cada caso a la fluorescencia debida a Bcl-2 se ha sustraído la debida a un control negativo formado por un anticuerpo del mismo isotipo que el utilizado para Bcl-2.

La figura 29 muestra que la expresión de Bcl-2 disminuye tanto en células tratadas con **3g** como con **3n** tras 24 horas de tratamiento. Esta disminución es detectable tanto por Western-blot (Figura 29A-B) como por inmunofluorescencia indirecta (Figura 29C-D). La figura 29 también muestra que la disminución de Bcl-2 persiste tras 48 horas de tratamiento con **3g** pero no con **3n**, compuesto con el que transcurrido este tiempo la expresión de Bcl-2 llega incluso a aumentar (Figura 29A-B).



**Figura 29. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de Bcl-2.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. (A) Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. (B) Histograma representativo de los niveles de Bcl-2 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). Camptotecina (2 $\mu$ M) empleada como control positivo. (C) Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de Bcl-2 en células MCF-7 cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n (25 $\mu$ M) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a Bcl-2 (fondo negro). (D) Histograma representativo de los niveles de Bcl-2 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo). \*\* (p<0,01) respecto al control en todos los casos.

Para la medición de los niveles de expresión de la proteína proapoptótica, Bid, se han realizado los mismos pasos descritos con la proteína antiapoptótica Bcl-2. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 30. La figura muestra una disminución en los niveles de expresión de Bid, detectable tanto por Western-blot (Figura 30A-B) como por inmunofluorescencia indirecta (Figura 30C-D), tras 24 horas de tratamiento con los BSC. Sin embargo, esta disminución revierte con el tiempo, por lo que tras 48 horas de tratamiento no se ha detectado diferencias significativas en los niveles de Bid entre las células tratadas y las células control (Figura 30A-B).

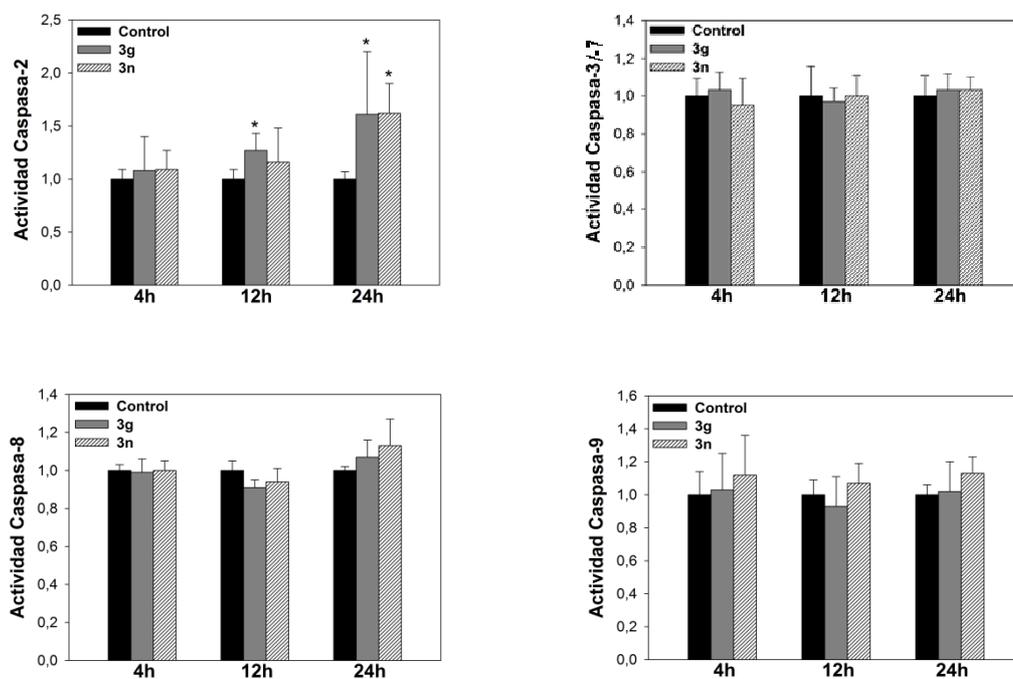


**Figura 30. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de Bid.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. (A) Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. (B) Histograma representativo de los niveles de Bid en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n ( $25\mu\text{M}$ ) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). Camptotecina ( $2\mu\text{M}$ ) empleada como control positivo. (C) Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de Bid en células cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n ( $25\mu\text{M}$ ) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a Bid (fondo negro). (D) Histograma representativo de los niveles de Bid en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n ( $25\mu\text{M}$ ) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo). \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) respecto al control en todos los casos.

### 3.4 Los BSC inducen activación de caspasa-2 en las células MCF-7

En numerosos modelos de apoptosis se ha demostrado la activación de diversas cascadas de señalización que dan lugar a la activación de caspasas, que a su vez regula posteriores eventos de la apoptosis. Puesto que los derivados **3g** y **3n** han inducido un proceso de apoptosis en células MCF-7, se decide estudiar si este proceso se da con activación de las caspasas. Con este fin, se ha procedido a analizar mediante un ensayo colorimétrico la actividad de las caspasas -2, -3, -8 y -9 en células incubadas durante 4, 12 o 24 horas con los compuestos **3g** y **3n** (25  $\mu$ M) (Figura 31).

En la figura 31 se observa la activación de la caspasa-2 en las células tratadas con el derivado **3g** a 12 y 24 horas, y en las tratadas con el derivado **3n** a 24 horas. En el resto de las caspasas no se ha observado activación de caspasas a ninguno de los tiempos de incubación.

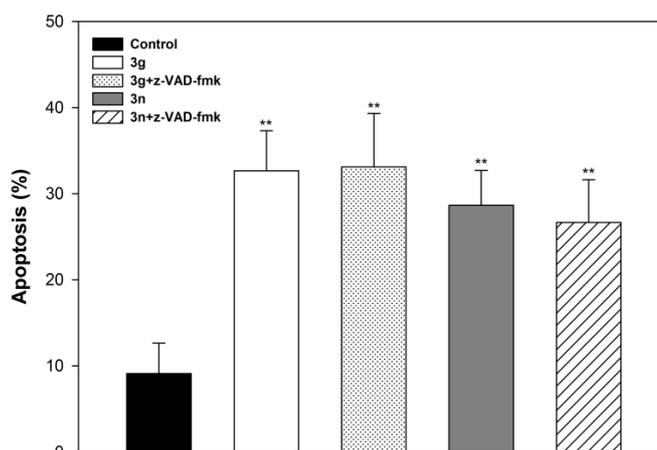


**Figura 31.** Efecto de los derivados BSC, **3g** y **3n**, en la expresión de las caspasas -2, -3, -8 y -9. Las células MCF-7 han sido incubadas en ausencia (control) o en presencia de compuesto (25  $\mu$ M) durante 4, 12 y 24 horas. Tras la incubación, se ha determinado la actividad de las distintas caspasas mediante el *kit Apoalert caspase assay plate*, descrito en el apartado de material y métodos. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (Tabla 6, Anexo). \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) respecto al control en todos los casos.

### 3.5 Efecto de z-VAD-fmk en el proceso de muerte celular inducido por los BSC

Los experimentos realizados con las diferentes caspasas han demostrado que durante el proceso de muerte celular inducido por los derivados **3g** y **3n** tiene lugar la activación de la caspasa-2. Para determinar si la activación de dicha caspasa es necesaria para que se produzca el efecto citotóxico de los derivados, se disponen ensayos de apoptosis en presencia del inhibidor z-VAD-fmk. Por ello, se han cultivado muestras de células MCF-7 en presencia o en ausencia del inhibidor z-VAD-fmk (50  $\mu$ M) durante una hora, y a continuación, se han añadido los compuestos, **3g** y **3n** (25  $\mu$ M) y se han medido por citometría de flujo los porcentajes de células apoptóticas en el cultivo, siguiendo el protocolo del kit Apo-Direct™.

Como se muestra en la figura 32, la preincubación de las células con el inhibidor de caspasas, z-VAD-fmk no suprime el efecto apoptótico inducido por los derivados **3g** y **3n** tras 24 horas de tratamiento. Estos resultados parecen indicar que los derivados BSC, **3g** y **3n**, son capaces de inducir apoptosis mediante mecanismos independientes de caspasas.

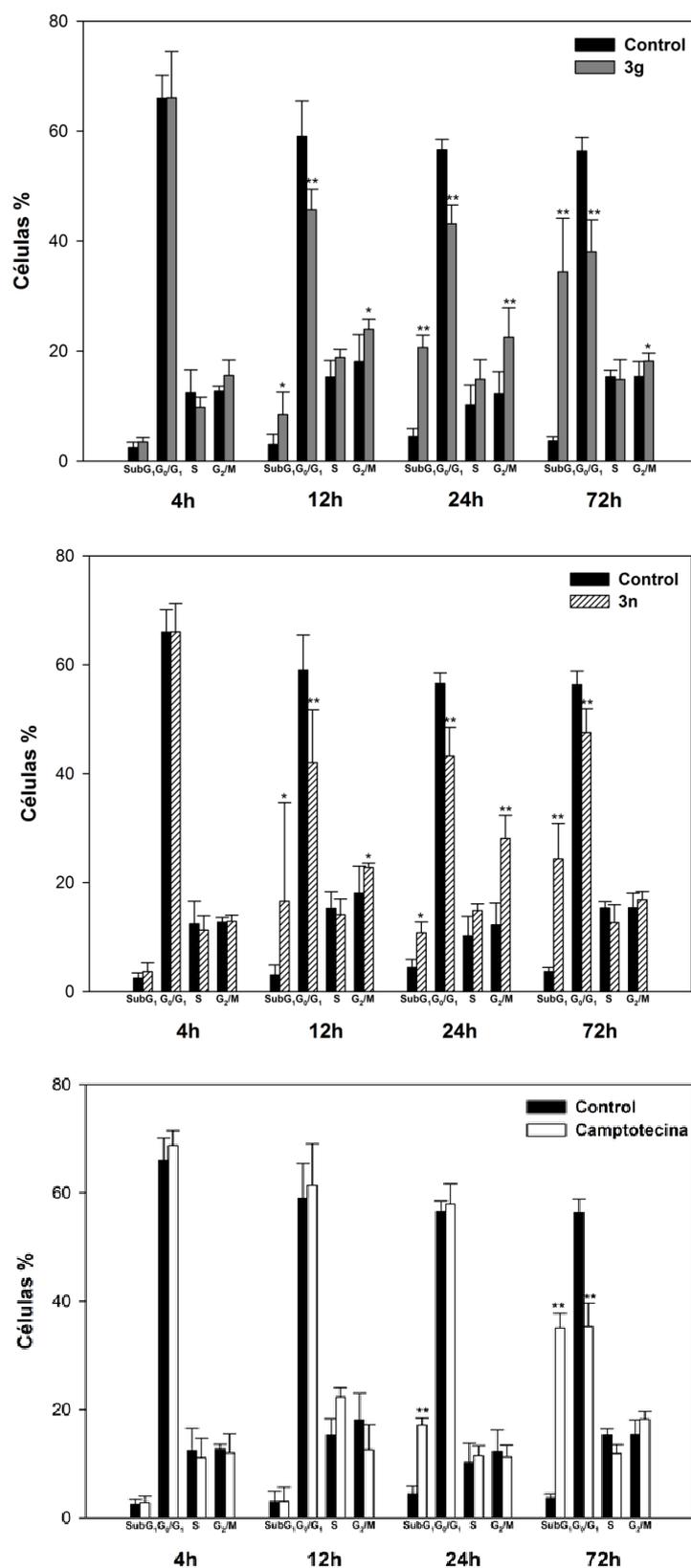


**Figura 32.** Efecto del inhibidor general z-VAD-fmk en las células MCF-7 tratadas con los derivados BSC **3g** y **3n**. Las células han sido incubadas en ausencia o en presencia del inhibidor (50  $\mu$ M) durante 1 hora, y a continuación se cultivaron en presencia o ausencia de los derivados **3g** y **3n** (25  $\mu$ M) durante 24 horas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (Tabla 7, Anexo). \*\* (p<0,01), \* (p<0,05) respecto al control en todos los casos.

#### 4. LOS BSC INDUCEN ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR

El ciclo celular es una secuencia complicada de eventos que permite a las células crecer y replicarse (Foster, I., 2008). Numerosos fármacos antitumorales inducen alteraciones en la distribución de las células en el ciclo celular. Para comprobar si los derivados **3g** y **3n** inducen algún efecto sobre el ciclo celular, se ha analizado la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo en cultivos de células MCF-7 en presencia o ausencia de estos compuestos. Con este fin, las células han sido fijadas y permeabilizadas con etanol y teñidas con yoduro de propidio, analizándose a continuación, la distribución del ciclo celular por citometría de flujo. El yoduro de propidio penetra en todas las células y se une de manera estequiométrica al DNA, con lo que nos permite determinar la concentración de DNA en cada célula individual, y conocer el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular en una población determinada.

Para la determinación de la afectación del ciclo celular por los derivados BSC se han incubado las células MCF-7 en presencia o ausencia de los compuestos **3g** y **3n** durante 4, 12, 24 y 72 horas. En todos los experimentos se ha utilizado como control positivo una muestra de células incubadas con camptotecina (25  $\mu$ M) (Figura 33). Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 35 a 37, y se recogen numéricamente en la Tabla 1, Anexo. La figura 34 muestra el resultado de un experimento representativo.



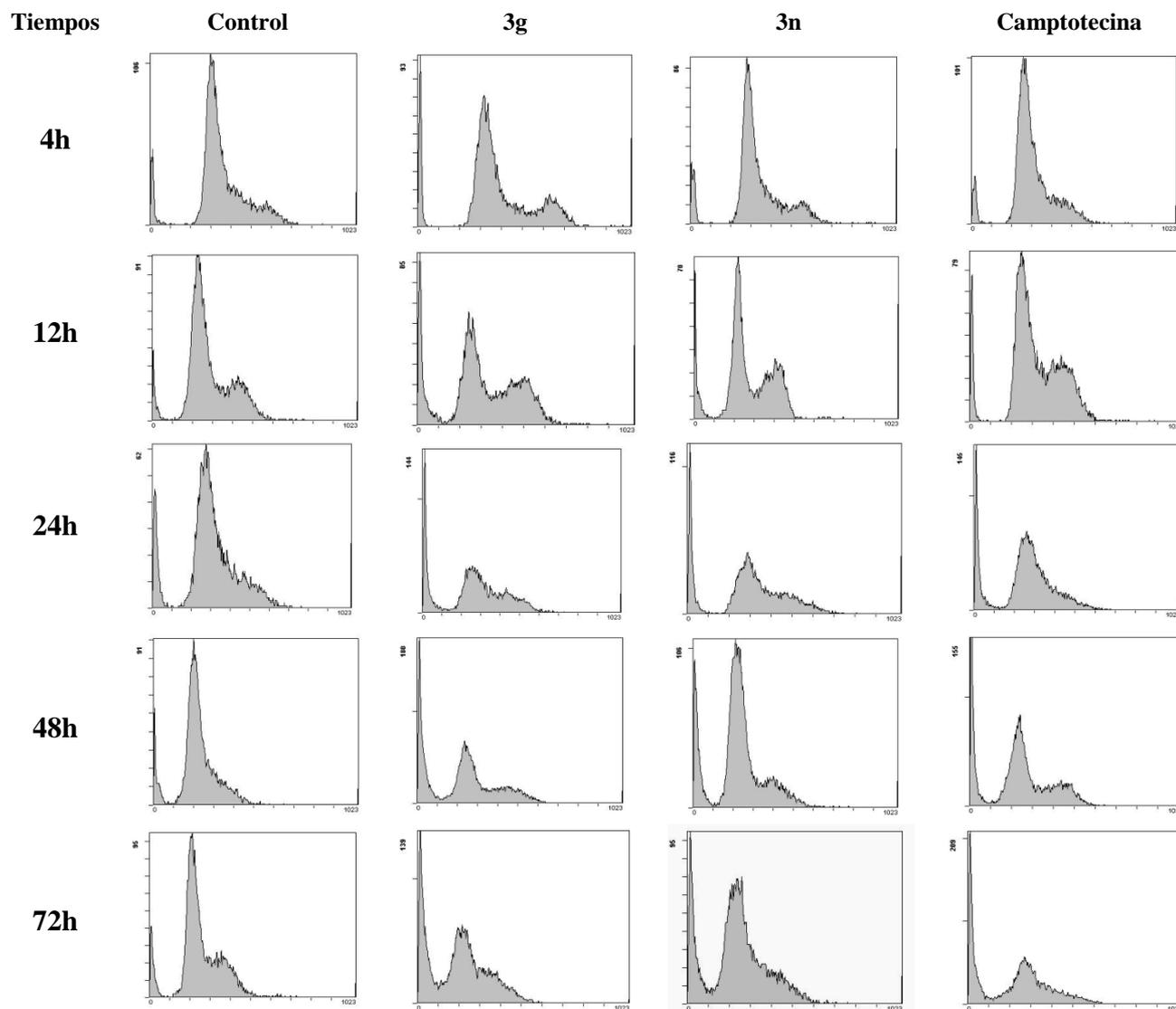
**Figura 33. Efecto de los derivados BSC 3g y 3n en la progresión del ciclo celular.** Las células MCF-7 han sido tratadas con o sin compuesto a una concentración de 25  $\mu$ M durante 4, 12, 24 y 72 horas y analizadas por citometría de flujo mediante tinción con IP. El % de células en cada fase del ciclo celular ha sido analizado mediante EXPO 32 ADC Analysis System. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado (Tabla 8, Anexo). La camptotecina (25  $\mu$ M) ha sido empleada como control positivo. \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) respecto al control en todos los casos.

Como muestra la figura 33, en las células tratadas con el compuesto **3g** durante 4 horas, no se han observado modificaciones con respecto al control en el porcentaje de células en ninguna de las fases del ciclo celular. Sin embargo, el tratamiento de las células MCF-7 durante 12 horas provoca un aumento significativo de las células en la fase SubG<sub>1</sub> (8,44% respecto a 3,02%), que se va acentuando conforme se dan tiempos más prolongados de incubación. Estas células corresponden a células apoptóticas que han perdido parte del DNA genómico como consecuencia de la actuación de enzimas que poseen actividad endonucleasa. El incremento de la población celular en la fase subG<sub>1</sub> se correlaciona con la apoptosis inducida por dicho derivado. Este aumento del porcentaje de las células en la fase SubG<sub>1</sub> va acompañado de una disminución del número de células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (45,69% respecto a 59,03%) y un aumento celular significativo en la fase G<sub>2</sub>/M (23,95% respecto a 18,10%), consecuencia de la parada del ciclo en esta fase. Esta parada se puede dar por la interferencia de dichos derivados en la maquinaria celular de la mitosis como se ha detectado en tratamientos con compuestos antitumorales como vincristina, taxol u otras moléculas con actividad sobre los microtúbulos. La prolongación de exposición de las células al compuesto, 24 y 72 horas, hace que los cambios significativos se acentúen aún más.

En el caso del compuesto **3n** (Figura 33), se han observado alteraciones similares a las descritas con el compuesto **3g**. Así, en las células tratadas con el derivado **3n** durante 4 horas no se ha observado ningún cambio. Sin embargo, tras 12 horas de incubación se ha detectado un aumento significativo en las fases SubG<sub>1</sub> (16,56% respecto a 3,02%) y G<sub>2</sub>/M (22,77% respecto a 18,10%) y una disminución muy significativa en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (42,03% respecto a 59,03%). A 24 horas se observan las mismas alteraciones que a 12 horas, con un aumento en las fases SubG<sub>1</sub> (10,79% respecto a 4,43%) y G<sub>2</sub>/M (28,09% respecto a 12,25%) y una disminución en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (43,26% respecto a 56,6%). A 72 horas, se da un incremento muy significativo del número de células en la fase SubG<sub>1</sub> (24,33% respecto a 3,64%) y un descenso muy significativo en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (47,56% respecto a 56,38%), pero ya no se observa ninguna alteración en la fase G<sub>2</sub>/M respecto al control. Esto puede ser debido a que la mayoría de las células ya están apoptóticas a causa del efecto del compuesto.

En resumen, los derivados **3g** y **3n** inducen un acúmulo de la población celular en las fases SubG<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>/M y una disminución del porcentaje de células que se encuentran en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Estos efectos van aumentando conforme aumenta el tiempo de incubación. Estas alteraciones sugieren que el tratamiento de las células MCF-7 con los derivados **3g** y **3n** induce a una parada en la fase tardía G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.

A continuación, en la figura 34 se muestra un ejemplo representativo del análisis de las diferentes fases del ciclo celular, obtenido por citometría de flujo con los compuestos **3g** y **3n** a diferentes tiempos de incubación.



**Figura 34. Análisis mediante citometría de flujo del efecto de los derivados 3g y 3n en la distribución del ciclo celular.** Los histogramas n° de células/IP (cantidad de DNA), indican el porcentaje de células MCF-7 en fase SubG<sub>1</sub>, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M del ciclo celular. El % de células en cada fase del ciclo celular ha sido analizado mediante EXPO 32 ADC Analysis System. La figura corresponde a un experimento representativo.

## 5. EFECTOS DE LOS BSC EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA REGULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR Y CICLO CELULAR

El ciclo celular es controlado por numerosos mecanismos que aseguran una correcta división celular (Vermeulen, K., 2003). La progresión de la célula a través de las distintas fases del ciclo celular está regulada por diversas proteínas quinasas (Cdks) cuya actividad depende de ciclinas. La actividad de las Cdks es controlada por proteínas inhibidoras del ciclo celular, los inhibidores Cdk (Cki). Estos Cki se dividen en dos familias, ink4 (formada por p15, p16, p18 y p19, que inhiben a Cdk4 y Cdk6) y Cip/Kip (formada por p21, p27 y p57, que inhiben los complejos ciclina-Cdks) (Foster, I., 2008).

En células humanas cada fase está regulada específicamente por complejos ciclina-Cdks concretos. Dado que los compuestos **3g** y **3n** inducen un bloqueo del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M, se procede a estudiar si estos compuestos provocan alguna alteración en la expresión de las proteínas que controlan el paso a través de la fase G<sub>2</sub>/M. Con este fin, se cuantifican los niveles de expresión de las ciclinas A y B<sub>1</sub> y de Cdk1 y Cdk2. La expresión de dichas proteínas se ha analizado en ensayos de western-blot e inmunofluorescencia, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos.

Además, se pretende analizar si alguno de los derivados BSC, **3g** o **3n**, producen una alteración en la expresión de la proteína p21<sup>CIP1</sup>, miembro de la familia Cip/Kip, capaz de inhibir los complejos ciclina-Cdk.

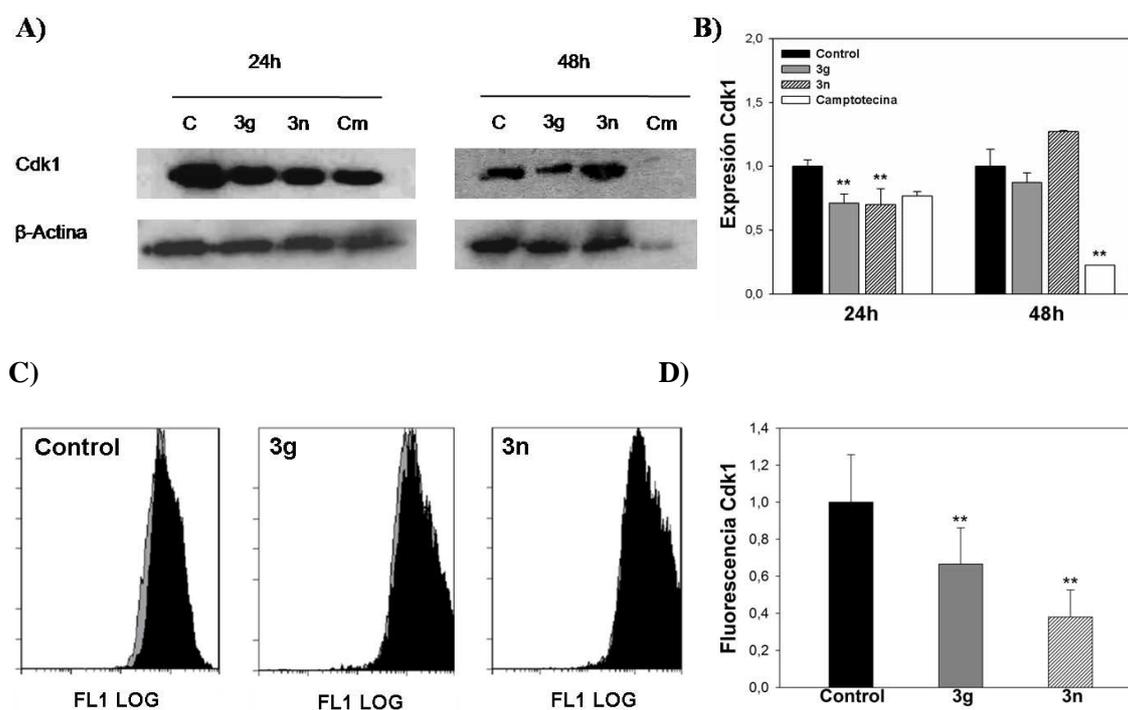
### 5.1 Los compuestos BSC disminuyen la expresión de las Cdk1 y Cdk2

Teóricamente, el complejo Cdk1-ciclina A es responsable de la transición en la fase G<sub>2</sub>/M, requerida para la iniciación de la profase (Furuno, N., 1999; Satyanarayana, A., 2009). Además, el complejo activado Cdk1-ciclina B participa en completar la mitosis (Riabowol, K., 1989; Satyanarayana, A., 2009). Esta proteína induce la fosforilación de sus proteínas sustrato, que controlan la condensación de los cromosomas, la rotura de la membrana nuclear y otros eventos que ocurren en el comienzo de la mitosis.

La proteína reguladora del ciclo celular Cdk2, es la quinasa activadora de la replicación del DNA y, por lo tanto, responsable de la progresión de la célula a través de la fase S. Esta Cdk está asociada con la ciclina A en la fase S temprana. La inhibición de la expresión de Cdk2, llevaría a parada celular (Foster, I., 2008).

La expresión de las proteínas, Cdk1 y Cdk2, se ha estudiado mediante técnicas de western-blot e inmunofluorescencia. Para el análisis, las células MCF-7 se han incubado en ausencia (control) o presencia de los derivados BSC a una concentración de 25  $\mu$ M durante 24 o 48 horas.

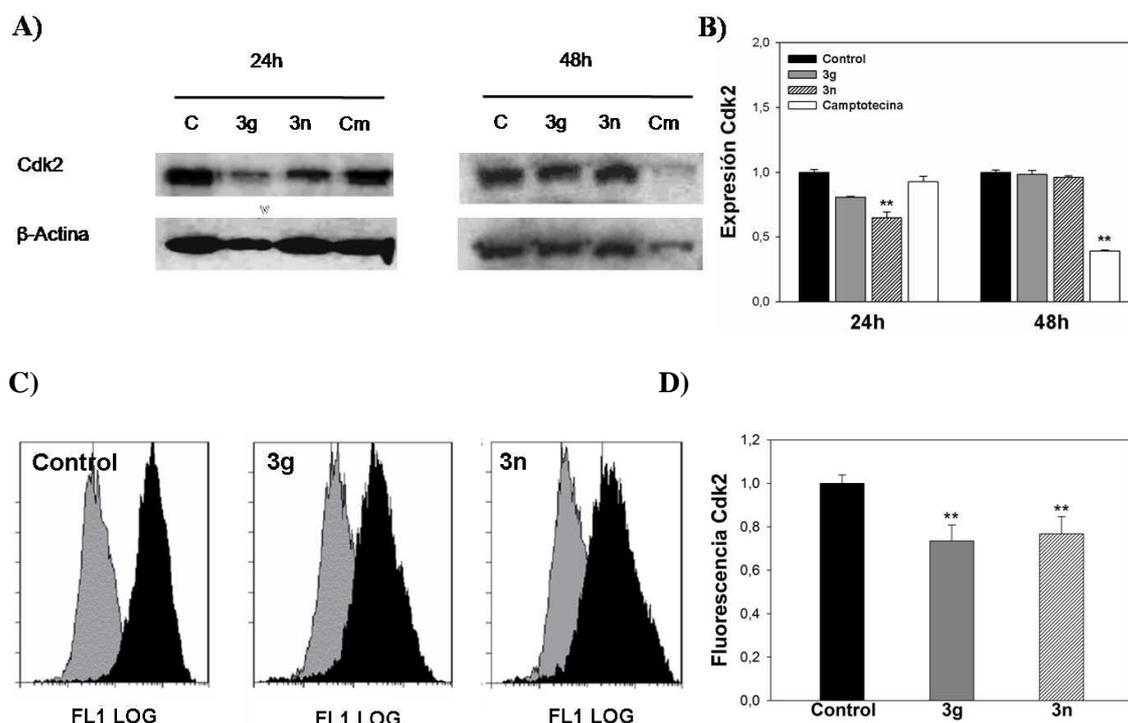
En la figura 35 se muestran los resultados obtenidos con Cdk1 en los análisis realizados por western-blot (Figura 35A-B) e inmunofluorescencia indirecta (Figura 35C-D). Como puede observarse, con ambas técnicas se detecta una disminución muy significativa en la expresión de Cdk1 en las células tratadas con ambos compuestos tras 24 horas. En cambio, en las células tratadas durante 48 horas mediante la técnica de Western-blot (Figura 35A-B) no se detectan alteraciones significativas en los niveles de expresión de Cdk1.



**Figura 35. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de Cdk1.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. **(A)** Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. **(B)** Histograma representativo de los niveles de Cdk1 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). Camptotecina (2 $\mu$ M) empleada como control positivo. **(C)** Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de Cdk1 en células cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n (25 $\mu$ M) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a Cdk1 (fondo negro). **(D)** Histograma representativo de los niveles de Cdk1 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo). \*\* (p<0,01) respecto al control en todos los casos.

La disminución observada en la expresión de Cdk1 a 24 horas tanto por Western-blot como por inmunofluorescencia, es consistente con el bloqueo del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M, previamente descrito.

En el caso de la expresión de Cdk2, mediante las técnicas de western-blot e inmunofluorescencia indirecta (Figura 36) también se ha observado una disminución en su expresión en el tratamiento con el derivado **3g** (25µM) tras 24 horas. En cambio, en el caso de las células tratadas con el derivado **3n** (25µM) sólo en el análisis mediante inmunofluorescencia indirecta (Figura 36C-D) se detecta una disminución significativa a 24 horas, no descrita en los ensayos de Western-blot (Figura 36A-B). Esto puede deberse a que la técnica de inmunofluorescencia indirecta es cuantitativamente más sensible. Tras 48 horas de tratamiento con BSC, los resultados obtenidos muestran una ausencia de alteración en los niveles de expresión de Cdk2 (Figura 36A-B).



**Figura 36. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de Cdk2.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. **(A)** Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. **(B)** Histograma representativo de los niveles de Cdk2 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25µM) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). Camptotecina (2µM) empleada como control positivo. **(C)** Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de Cdk2 en células cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n (25µM) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a Cdk2 (fondo negro). **(D)** Histograma representativo de los niveles de Cdk2 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25µM) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo). \*\* (p<0,01) respecto al control en todos los casos.

## 5.2 Los compuestos BSC no alteran la expresión de las ciclinas A y B1

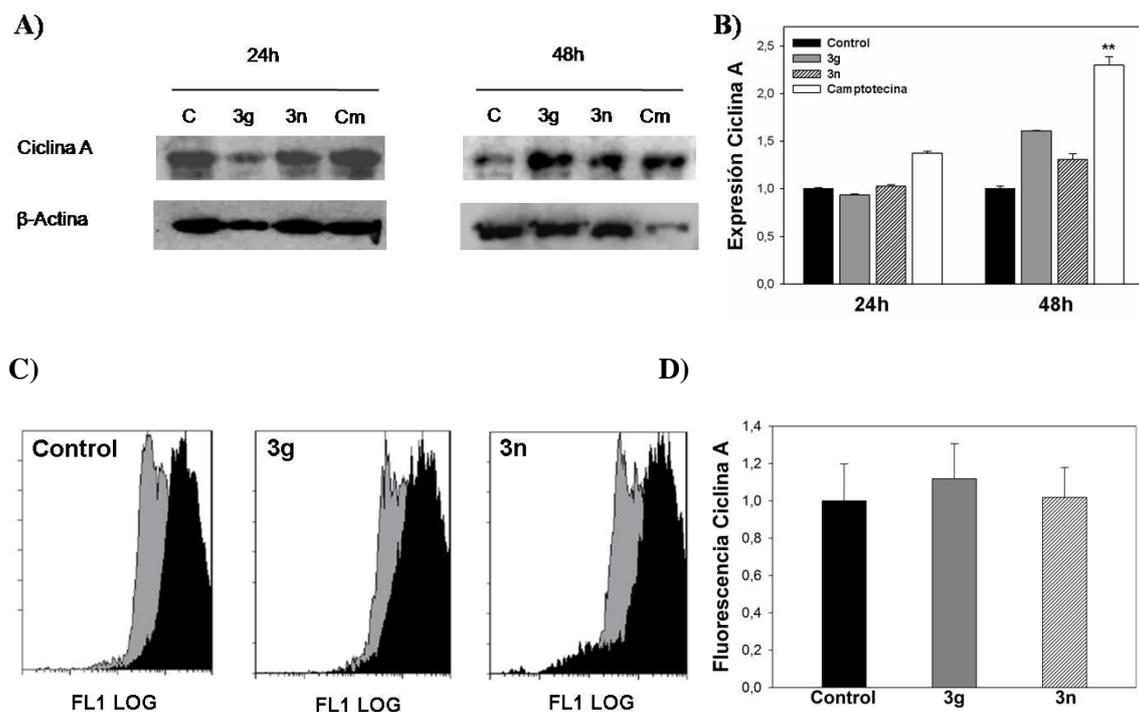
Las ciclinas son unas proteínas clave en el control de elementos en el ciclo celular de eucariotas (Nugent, J.H., 1991; Stamatakos, M., 2010). En células de mamíferos, las ciclinas se unen a ciclinas dependientes de quinasas (Cdks) y forman complejos que están implicados en la regulación de diferentes transiciones en el ciclo celular (Stamatakos, M., 2010). Son unos elementos indispensables del ciclo celular y la alteración de su función puede llevar a la formación de cáncer (Stamatakos, M., 2010).

Las ciclinas tipo A son sintetizadas al comienzo de la fase S y mediante la formación de complejos con Cdk2 fosforilan proteínas implicadas en la replicación del DNA (Satyanarayana A., 2009). Durante la transición de la fase G<sub>2</sub>/M, la actividad del complejo Cdk1-ciclina A es necesaria para la iniciación de la profase (Furuno, N., 1999; Satyanarayana A., 2009).

Las ciclinas tipo B son componentes esenciales en la mitosis. En mamíferos se identifican tres tipos de ciclinas tipo B: B1, B2 y B3 (Pines, J., 1989; Chapman, D.L., 1992; Gallant, P., 1992; Lozano, J.C., 2002; Nguyen, T.B., 2002; Satyanarayana, A., 2009). La actividad del complejo Cdk1-ciclina B participa y completa la mitosis (Ribomol, 1989; Satyanarayana, A., 2009).

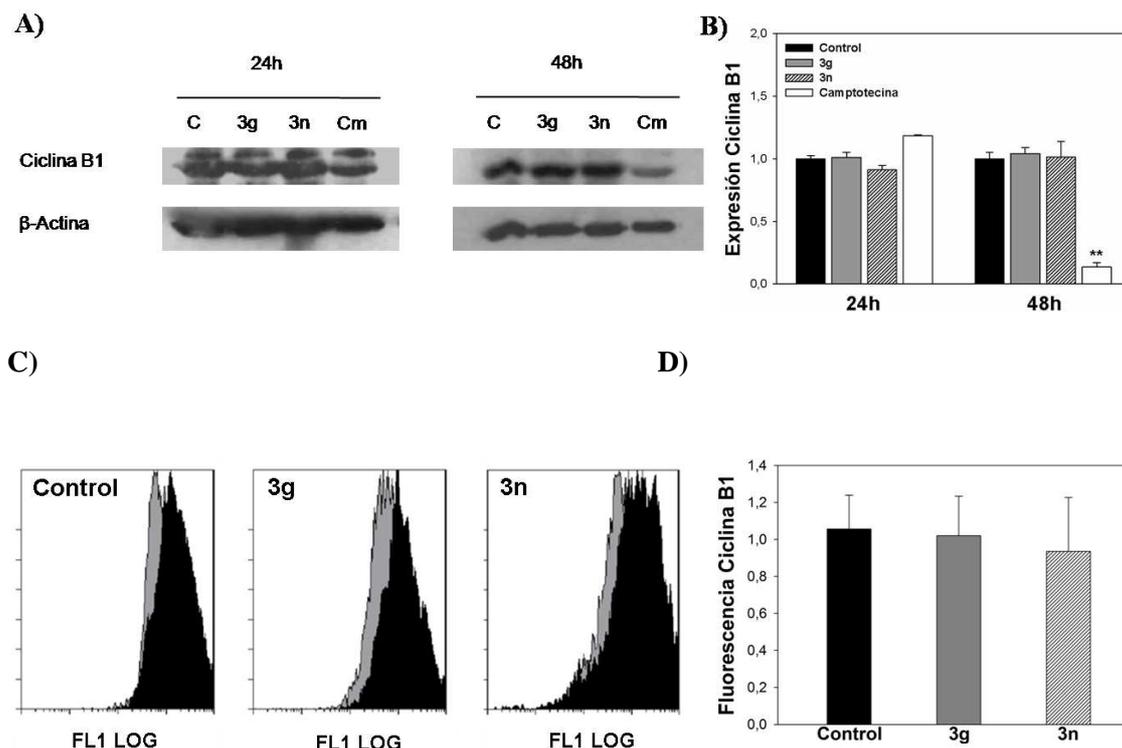
La expresión de ciclina A y ciclina B1 se ha estudiado mediante western-blot e inmunofluorescencia indirecta, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. Las células se han incubado en ausencia (control) o presencia de los compuestos BSC a una concentración de 25  $\mu$ M durante 24 o 48 horas.

En la figura 37 se muestra los resultados obtenidos con el análisis de la ciclina A por western-blot (Figura 37A-B) e inmunofluorescencia indirecta (Figura 37C-D). En ambas técnicas, puede observarse que la expresión de dicha proteína tanto en las células tratadas con **3g** como en las tratadas con **3n** a 24 y 48 horas no varía.



**Figura 37. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de ciclina A.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. (A) Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. (B) Histograma representativo de los niveles de ciclina A en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). Camptotecina (2 $\mu$ M) empleada como control positivo. (C) Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de ciclina A en células cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n (25 $\mu$ M) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a ciclina A (fondo negro). (D) Histograma representativo de los niveles de ciclina A en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo). \*\* (p<0,01) respecto al control en todos los casos.

Con respecto a la ciclina B1, en la figura 38A-B se observa que no hay ninguna variación significativa en su expresión en las células tratadas con ambos derivados BSC a 24 y 48 horas, mediante la técnica de western-blot. El estudio de la expresión de ciclina B1 mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Figura 38C-D) confirma los resultados anteriores.



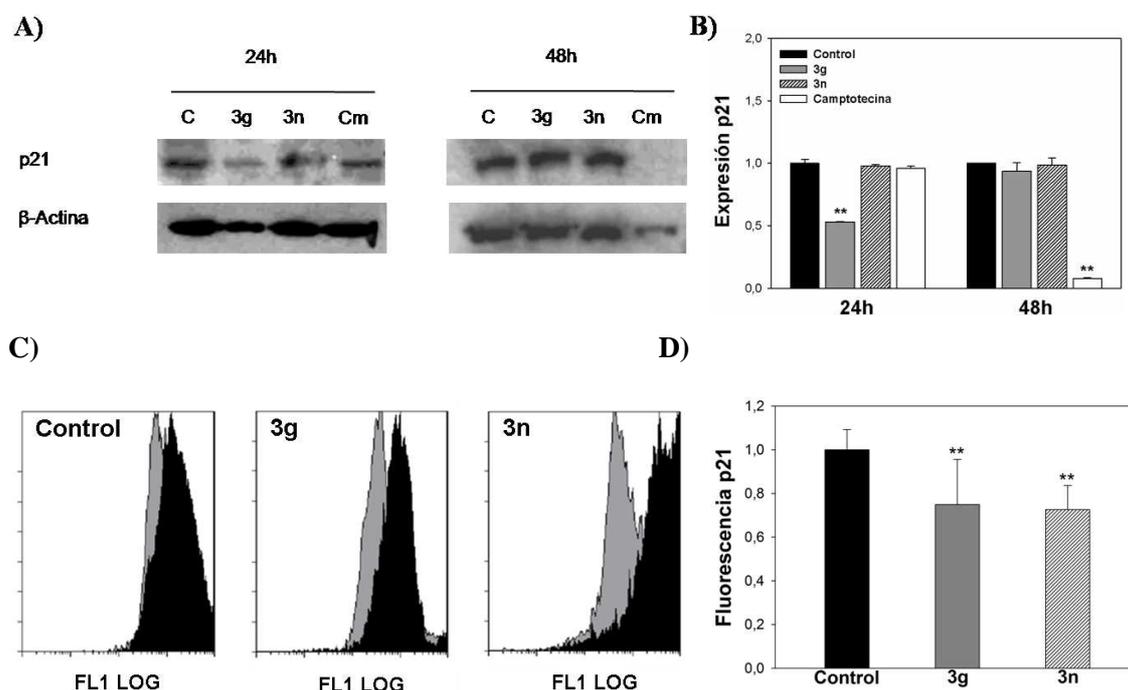
**Figura 38. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de ciclina B1.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia. (A) Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. (B) Histograma representativo de los niveles de ciclina A en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). (C) Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de ciclina B<sub>1</sub> en células cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n (25 $\mu$ M) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a ciclina B<sub>1</sub> (fondo negro). (D) Histograma representativo de los niveles de ciclina B<sub>1</sub> en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo). \*\* ( $p < 0,01$ ) respecto al control en todos los casos.

### 5.3 Los compuestos BSC inducen alteraciones en la expresión de la proteína p21<sup>CIP</sup>

La proteína p21<sup>CIP</sup> es un inhibidor de Cdks importante en la respuesta de las células ante un estrés genotóxico y una importante diana transcripcional de la proteína p53. p21<sup>CIP</sup> ejecuta varias funciones en la célula. En el núcleo, p21<sup>CIP</sup> se une e inhibe la actividad de las Cdk1 y Cdk2, y bloquea la transición de la fase G<sub>1</sub> a la S o de la fase G<sub>2</sub> a la M después de dañarse el DNA. Esto permite la reparación del DNA dañado. En el citoplasma, p21<sup>CIP</sup> tiene efecto anti-apoptótico. En el caso de que los niveles de DNA dañado sean bajos, la expresión de p21<sup>CIP</sup> aumenta, induciendo parada en el ciclo y presentando actividades antiapoptóticas. Sin embargo, si el daño en el DNA es abundante, disminuye la cantidad de la proteína p21<sup>CIP</sup> y las células entran en apoptosis. La doble función de p21<sup>CIP</sup> se ha observado en la carcinogénesis. Por un lado, p21<sup>CIP</sup> actúa como un supresor de tumores, y por otro lado, impide la apoptosis y actúa como un oncogen (Cmielová, J., 2011).

En este trabajo se ha analizado el efecto de los derivados **3g** y **3n** en la expresión de la proteína p21<sup>CIP</sup>. Para ello, las células MCF-7 han sido incubadas en ausencia (control) o presencia de los compuestos **3g** y **3n** (25µM) durante 24 o 48 horas. Posteriormente se han determinado los niveles de la proteína mediante western-blot e inmunofluorescencia indirecta, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos por ambas técnicas (figura 39) muestran que el nivel de expresión de p21<sup>CIP</sup> se encuentra significativamente disminuido en las células tratadas con **3g** y **3n** tras 24 horas, siendo transitorio ya que a 48 horas no se ha detectado diferencias significativas en los niveles de p21<sup>CIP</sup> entre las células tratadas y las células control.



**Figura 39. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de p21<sup>CIP</sup>.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. **(A)** Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. **(B)** Histograma representativo de los niveles de p21<sup>CIP</sup> en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25µM) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media ± SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). **(C)** Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de p21<sup>CIP</sup> en células cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n (25µM) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a p21<sup>CIP</sup> (fondo negro). **(D)** Histograma representativo de los niveles de p21<sup>CIP</sup> en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25µM) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Los resultados son expresados como la media ± SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo).\*\* (p<0,01) respecto al control en todos los casos.

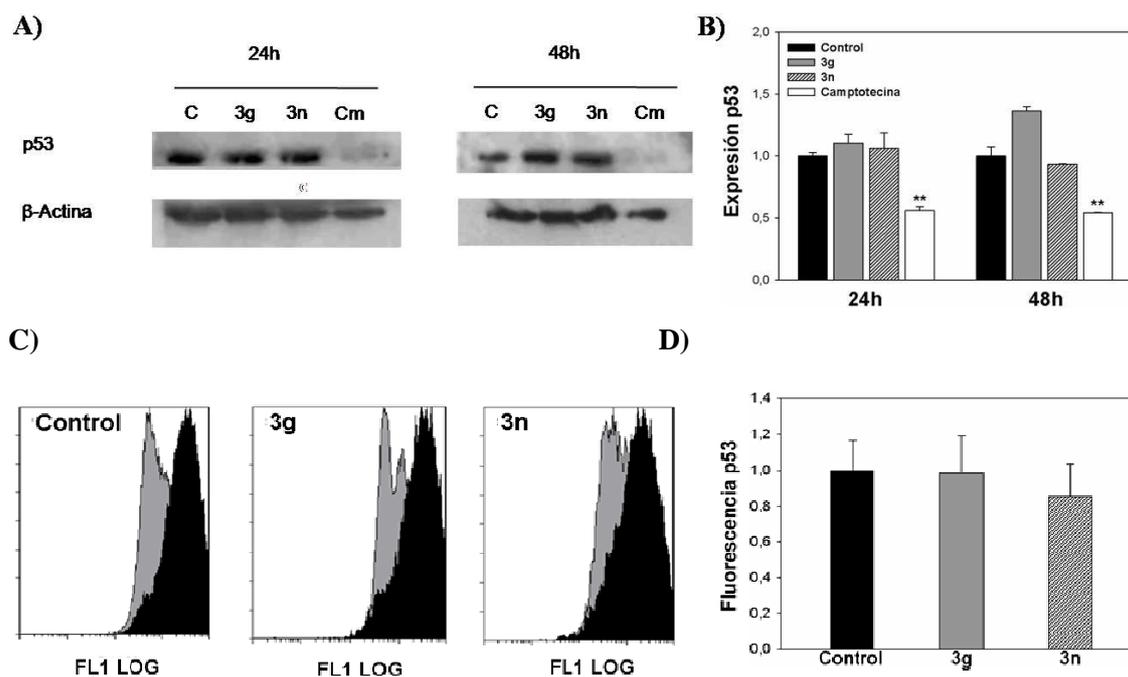
#### 5.4 Los compuestos BSC no alteran la expresión de p53

El gen p53 es uno de los genes más comúnmente mutados en tumores humanos; más de la mitad de los tumores humanos contienen mutaciones que inactivan p53 (Hollstein, M., 1994; Wang, W., 2003). Se ha demostrado el papel de p53 como inductor de apoptosis tanto en *in vitro* como en *in vivo*. Numerosos agentes quimioterápicos causan daño en el DNA y activan la vía p53 induciendo parada del ciclo celular y apoptosis. Sin embargo, la función de p53 es a menudo inactivada o suprimida en cánceres humanos (Jiang, J., 2010). El gen p53 es un factor de transcripción que aumenta en respuesta a diversos estímulos de estrés celular provocando entre otras respuestas, el bloqueo del ciclo celular en las fases G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub> y apoptosis. Dado que los compuestos BSC inducen en las células MCF-7 un bloqueo del ciclo celular y apoptosis, se propuso comprobar si la proteína p53 está implicada en este efecto.

Para comprobar si los derivados BSC alteran los niveles de expresión de p53, se realizan ensayos de western-blot e inmunofluorescencia indirecta, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos. Las células se han incubado en ausencia (control) o presencia de los compuestos BSC a una concentración de 25 µM durante 24 o 48 horas.

En los resultados obtenidos mediante las técnicas de western-blot (Figura 40A-B) e inmunofluorescencia indirecta (Figura 40C-D) se ha observado que tras una incubación de 24 y 48 horas con los derivados BSC **3g** y **3n** no se detecta ninguna alteración en la expresión de p53.

Estos resultados parecen indicar que el bloqueo del ciclo celular y la apoptosis inducida por los derivados BSC no están mediados por un aumento en los niveles de p53.



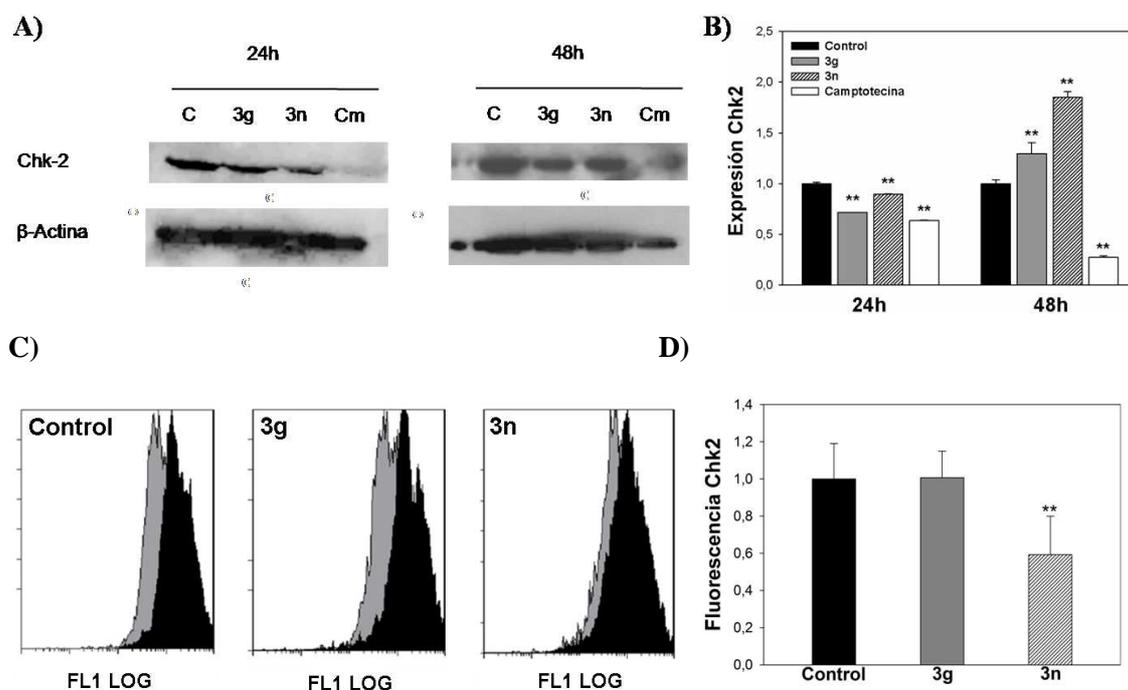
**Figura 40. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de p53.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. (A) Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. (B) Histograma representativo de los niveles de p53 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). (C) Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de p53 en células cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n (25 $\mu$ M) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a p53 (fondo negro). (D) Histograma representativo de los niveles de p53 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo). \*\* (p<0,01) respecto al control.

### 5.5 Los compuestos BSC inducen una disminución de la expresión de Chk2

La quinasa Chk2 (Checkpoint Kinase 2) es un mediador clave de las diversas respuestas celulares al estrés genotóxico, protegiendo la integridad del genoma totalmente en la evolución eucariótica. Estudios recientes han demostrado el papel fundamental de Chk2 en las vías de vigilancia del genoma que coordinan la progresión del ciclo celular con la reparación del DNA y la supervivencia o muerte celular. Defectos en Chk2 llevan al desarrollo tanto de cáncer humano hereditario como esporádico (Bartek, J., 2001).

Se ha querido comprobar el efecto de los derivados BSC, **3g** y **3n**, en la expresión de la proteína Chk2. Para ello, las células MCF-7 han sido incubadas en ausencia (control) o presencia de los compuestos **3g** y **3n** (25 $\mu$ M) durante 24 o 48 horas. Posteriormente se determinaron los niveles de la proteína mediante western-blot e inmunofluorescencia indirecta, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

En la figura 41 se muestran los resultados obtenidos para Chk2. Como puede observarse, en las células tratadas con los compuestos **3g** y **3n** tras 24 horas disminuye los niveles de expresión de esta proteína. También se observa que esta disminución es transitoria ya que los niveles de Chk2 aumentan significativamente en los tratamientos con ambos compuestos a 48 horas.



**Figura 41. Efecto de los compuestos 3g y 3n en la expresión de Chk-2.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. (A) Imágenes correspondientes a dos western-blot representativos a 24 y 48 horas, respectivamente. (B) Histograma representativo de los niveles de Chk-2 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 y 48 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (Tabla 9A, Anexo). (C) Imágenes representativas de un análisis mediante citometría de flujo de los niveles intracelulares de Chk2 en células cultivadas en ausencia (control) y presencia de los compuestos 3g y 3n (25 $\mu$ M) respectivamente durante 24 horas. En cada caso se representa la curva correspondiente al control negativo (fondo gris) y a Chk2 (fondo negro). (D) Histograma representativo de los niveles de Chk2 en células MCF-7 en ausencia (control) o presencia de 3g y 3n (25 $\mu$ M) durante 24 horas. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado (Tabla 9B, Anexo). \*\* (p<0,01) respecto al control en todos los casos.



# DISCUSIÓN



## 1. CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR BSCM

En este trabajo se ha caracterizado el proceso de muerte celular inducido por una serie de moléculas sintetizadas como posibles candidatos a drogas antineoplásicas que en su conjunto se denominan derivados bisacilimidosenocarbamato (BSC). Como se explica en el apartado de material y métodos, los derivados BSC han sido diseñados y sintetizados a partir de estudios estructura-actividad en el Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Navarra.

La caracterización del efecto citotóxico inducido por los derivados BSC se ha estudiado sobre diferentes líneas celulares tumorales como CCRF-CEM, HTB-54, HT-29 y MCF-7. Los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (Tabla 2) muestran que la mayoría de los compuestos BSC son capaces de inhibir el crecimiento de las diversas líneas celulares tumorales *in vitro*, siendo la línea de adenocarcinoma de mama, MCF-7, una de las más sensibles a dichos compuestos. Las  $GI_{50}$  obtenidas en dichos ensayos presentan valores menores de 10  $\mu$ M, lo que los hace ser prometedores como agentes quimioterápicos.

Como se puede observar, entre los análogos de azufre/selenio (**3a-3b** y **3c-3d**), los compuestos **3b** y **3d** son significativamente más citotóxicos que **3a** y **3c**, indicando que la sustitución del selenio por azufre no se tolera bien a pesar de que muestren ciertas similitudes en su bioquímica. Estos cambios dados confirman los buenos resultados obtenidos previamente en cáncer de próstata PC-3. Además, se observa que la actividad citotóxica es dependiente de la naturaleza de la cadena lateral, de la posición de selenio, y de la presencia del grupo metil el cual es un factor significativo de la actividad. De hecho, cuando este grupo era un isopropil o etil, la actividad citotóxica disminuía (**3d-3e-3f**, **3g-3h**, **3j-3k**) en la mayoría de las líneas celulares, siendo este cambio más acentuado en MCF-7. Ésto puede ser debido al metabolismo del selenio del intermediario monometilado, metilselenol, el cual es supuestamente necesario para la expresión de la actividad anticancerosa. El metilselenol ( $CH_3SeH$ ) es altamente reactivo y difícil de formular. Los derivados metil de moléculas selenadas estables son buenos precursores de este metabolito y de la obtención de la actividad anticancerosa ya que pueden convertirse endógenamente en metilselenol. Sin embargo, la actividad citostática se comporta de manera más independiente de esta parte, ya que en células CCRF-CEM, **3j** y **3k** tienen valores de TGI de 8,51 y 8,82  $\mu$ M respectivamente, mientras que en MCF-7, **3g** y **3h** tienen valores de 5,10 y 4,15  $\mu$ M. Para analizar su selectividad frente a células tumorales, los compuestos también se ensayaron por toxicidad en una línea celular no tumoral, 184B5. Entre los BSC, el compuesto **3g** presenta una marcada selectividad en la línea celular tumoral, MCF-7, frente a la

línea no tumoral, 184B5, con un índice de selectividad de 8,3 (184B5/MCF-7 LD<sub>50</sub> ratio). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

En la profundización del mecanismo molecular de muerte celular inducida por BSC, por deslocalización de la fosfatidilserina (Figura 20-A) se ha mostrado que el tratamiento con BSC induce un proceso apoptótico en las células de CCRF-CEM. Además, por detección de la fragmentación del DNA en adenocarcinoma de mama, MCF-7, (Figura 20-B) se ha confirmado que la muerte celular inducida por los BSC es dependiente de la concentración y tiempo de exposición al compuesto. Tanto en el tratamiento de las CCRF-CEM como en MCF-7, se ha observado que el compuesto [metil *N,N'*-bis(3,5-dimetoxibenzoil)imidoseleocarbamato], **3g**, es el derivado que mayor porcentaje de apoptosis induce.

### 1.1 Efecto de los derivados BSC en la mitocondria

Gran variedad de fármacos contra el cáncer actúan sobre el DNA genómico de las células cancerosas mediante la generación de daño en el DNA y la inducción de apoptosis (Lomonaco, S.L., 2009). La apoptosis es esencial para el organismo y desempeña un importante papel en gran variedad de eventos fisiológicos. Los diversos mecanismos celulares y bioquímicos implicados en la apoptosis no están del todo claros. Pero sí se conoce la existencia de dos vías principales de inducción de apoptosis, la vía extrínseca (vía apoptótica mediada por receptores) y la vía intrínseca (vía apoptótica mediada por la mitocondria) (Chowdhury, I., 2006).

La vía extrínseca puede producirse mediante la activación de la caspasa-8 por receptores de muerte, llevando a la activación de Bid que forma tBid, la cual se transloca y produce la liberación de citocromo *c*, dando la activación de las caspasas -9 y -3 (Ola, M.S., 2011). La vía mitocondrial de apoptosis se da cuando las moléculas localizadas entre las membranas interna y externa mitocondrial son liberadas al citosol por la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) (Chipuk, J.E., 2008; Ola, M.S., 2011), seguida de una activación de caspasas, encargadas de fragmentar las proteínas celulares clave (Fan, T.J., 2005; Li, J., 2008; Ola, M.S., 2011). Este proceso es controlado por los miembros de la familia Bcl-2, formado por proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas (Chipuk, J.E., 2008). Antes, durante y después de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, se da frecuentemente una disipación de  $\Delta\Psi_m$ . La coordinación de MOMP y la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  pueden dar una idea del mecanismo de acción implicado (Green, D.R., 2004).

En este estudio se muestra que el tratamiento de las células MCF-7 con los derivados BSC (Figura 27) induce una disipación reversible de  $\Delta\Psi_m$  que se observa a 4 horas, pero no a tiempos más largos, y una disminución de los niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Figura 29) y la proteína proapoptótica Bid a 24 horas (Figura 30).

La proteína Bcl-2, uno de los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, se considera un potente supresor de apoptosis (Jang, J.H., 2003). La proteína Bcl-2 aparece sobreexpresada en numerosos tumores (Kaufmann, S.H., 2003), y por otro lado, se ha observado disminuida en numerosas situaciones de inducción de apoptosis (Shinwari, Z., 2008; Laane, E., 2007). Su mecanismo de acción no está del todo aclarado. Una de sus funciones es el dificultar la liberación de proteínas mitocondriales mediante el bloqueo de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) inducido por las proteínas proapoptóticas (Leber, B., 2007; Youle, R.J., 2008).

La proteína Bid es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2. Bid actúa como sensor de la señalización de receptores de muerte. Posee sólo un dominio BH3 el cual es necesario para que pueda interactuar con proteínas antiapoptóticas que estén unidas a proteínas proapoptóticas, como Bax y Bak, promoviendo así la liberación de éstas. Una vez liberadas Bax y Bak, promueven la inducción de MOMP y la cascada apoptótica (Willis, S.N., 2007). Se ha descrito que Bid es capaz de unirse directamente a Bax y Bak induciendo oligomerización y la activación de su función permeabilizante (Kuwana, T., 2005; Kim, H., 2006).

La disipación de  $\Delta\Psi_m$  por Bcl-2 se ha demostrado en numerosas formas de cáncer de mama (Shim, H.Y., 2007). La disminución de la expresión de Bcl-2 podría facilitar la apertura del poro mitocondrial llevando a la liberación de proteínas mitocondriales, la activación de la caspasa-9 y la fragmentación de una serie de componentes celulares causando transformaciones morfológicas características de la muerte celular por apoptosis. Por otro lado, la disminución de la expresión de Bid podría dificultar la apertura del mismo. La reducción de los niveles de ambas proteínas podría explicar por qué la disipación de  $\Delta\Psi_m$  inducida por los derivados BSC es reversible.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel esencial como mediadores en el proceso de apoptosis. La sobreproducción de ROS da lugar a estrés oxidativo, un proceso perjudicial que puede ser un mediador en el daño de estructuras celulares, incluyendo lípidos y membranas, proteínas y DNA (Valko, M., 2007). La sobreproducción de ROS está implicada en el desarrollo de numerosas patologías como enfermedades cardiovasculares, cáncer, desórdenes neurológicos, diabetes, isquemia, etc. El tratamiento de células tumorales con fármacos antineoplásicos puede provocar un aumento de los niveles de producción de ROS (Gao, N.,

2005; Morales, M.C., 2007). Se ha descrito su acción sobre proteínas implicadas en estas vías, por lo que ROS es un factor regulador clave en las vías moleculares relacionadas con el desarrollo y diseminación de tumores (Valko, M., 2007).

La mitocondria es la mayor fuente de generación de ROS intracelular y se ha demostrado que los ROS pueden regular la iniciación de la señalización de apoptosis (Orrenius, S., 2007; Li, Z.Y., 2011). El aumento en la producción de ROS reprime la expresión de Bcl-2 (Li, D., 2004; Kim, H., 2006), Bcl-XL (Cantara, S., 2004) y cIAPs (Kim, M.H., 2008), aumenta los niveles de expresión de Bax, provoca cambios conformacionales en Bax y Bak (Morales, M.C., 2007) y activa las caspasas -2, -3 y -9 (Takahashi, A., 2004; Kim, M.H., 2008).

Los datos obtenidos en el análisis de los niveles de producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) realizado en las células MCF-7 expuestas a los compuestos **3g** y **3n** (Figura 28), indican que se produce un aumento muy significativo en los niveles intracelulares de ROS tras 24 horas tratamiento. Sin embargo, se ha observado que la muerte celular inducida por los BSC en las células MCF-7 se produce ya a las 12 horas (figura 23). Esto significa que se ha producido un cambio en las condiciones redox de las células, pero el hecho de que la muerte celular preceda al aumento de los niveles de la producción de ROS, indica que estos no son un mediador clave en la muerte celular inducida por dichos derivados sino, más bien, una consecuencia de la misma.

En células de mamíferos, el control de la vía mitocondrial se da por liberación de numerosos mediadores apoptogénicos al espacio intermembrana, llevando a una activación de la cascada de caspasas, proteasas que fragmentan las proteínas celulares que participan en la regulación del ciclo celular y del proceso de apoptosis. Las caspasas juegan un papel clave en la ejecución de la apoptosis (Chowdhury, I., 2006). No están solo implicadas en el proceso de apoptosis, sino que también son requeridas en el desarrollo y maduración de citoquinas que llevan al crecimiento y diferenciación celular (Ola, S.M., 2011).

En este trabajo se ha analizado en células MCF-7 tratadas con BSC la actividad de diferentes caspasas evaluadas por capacidad de hidrolizar los tetrapéptidos VDAD-AMC (caspasa-2), DEVD-AMC (caspasa-3 y -7), IETD-AMC (caspasa-8) y LEHD-AMC (caspasa-9). Es sabido que las células de adenocarcinoma de mama, MCF-7, carecen de actividad de caspasa-3 (Janicke, R.U., 1998). A pesar de esto, las células MCF-7 deficientes de caspasa-3 expresan caspasa-7 y pueden sufrir una apoptosis dependiente de caspasa-7 tras su activación estimulada por la acción de las caspasas -2 y -6 (Hu, C.C., 2001). Nuestros resultados muestran que el tratamiento de células MCF-7 con BSC no modifica la actividad de caspasa-7 en estas células (Figura 31). Tampoco se ha observado modificación en la actividad de las caspasas -8 y -9, lo que descarta la posibilidad de que los compuestos **3g** y **3n** induzcan la vía extrínseca

mediada por caspasa-8 a través de receptores de muerte que activan la proteína Bid formando tBid conectando de esta manera con la vía mitocondrial activada por la caspasa-9.

El análisis de caspasas muestra, sin embargo, un aumento en la activación de la caspasa-2 (Figura 31) detectable en las células tratadas con el compuesto **3g** a partir de las 12 horas de tratamiento, mientras que en las células expuestas al compuesto **3n** este aumento se hace presente a partir de las 24 horas de tratamiento. La caspasa-2 ha sido reconocida como una de las proteínas más importantes en la regulación de la apoptosis (Vakifahmetoglu-Norberg, H., 2010), y es única entre todos los miembros de su familia, ya que muestra rasgos tanto de las caspasas iniciadoras como de las efectoras (Zhvotovskiy, B., 2005; rumschnabel, G., 2009; Vakifahmetoglu-Norberg, H., 2010).

La caspasa-2 juega un papel clave en la apoptosis inducida por estrés genotóxico por vía mitocondrial (Lassus, P., 2002; Shin, S., 2005). El daño en el DNA inducido por quimioterápicos como etopósido en células Jurkat conduce a una serie de eventos intracelulares característicos de apoptosis como la liberación del citocromo *c* de la mitocondria mediante la acción de la caspasa-2 (Robertson, J.D., 2002). Estudios recientes han demostrado que la caspasa-2 es un componente esencial en los mecanismos de respuesta al daño en el DNA, la regulación del ciclo celular y en la supresión tumoral (Kumar, S., 2009). La activación de la caspasa-2 en las células tratadas con los BSC puede sugerir que la vía de muerte celular provocada por dichos compuestos es dependiente de caspasas. De hecho, su activación en el núcleo podría indicar que la señal de apoptosis, ejercida por el efecto de BSC, se origina en éste orgánulo, a causa del daño causado en el DNA. Sin embargo, la implicación de la vía dependiente de caspasas en el proceso de muerte celular inducido tanto por **3g** como **3n** se ha descartado ya que la muerte celular no se puede prevenir con el pretratamiento de las células con el inhibidor universal de caspasas, z-VAD-fmk (Figura 32). Todos estos resultados sugieren que ni la vía extrínseca ni la vía mitocondrial juegan un papel decisivo en el proceso de muerte celular inducido por los derivados BSC.

## 1.2 Efecto de los derivados BSC en el ciclo celular

Numerosos fármacos antineoplásicos producen alteraciones en el transcurso del ciclo celular y/o poseen cierta especificidad por células que se encuentran en una determinada fase del ciclo celular (Huschtscha, L.I., 1996; Okada, H., 2004; Trejo-Solís, C., 2005). El tratamiento de las células MCF-7 con los derivados BSC muestra que estos compuestos producen alteraciones en la distribución de la población celular entre las diferentes fases del ciclo celular. Las figuras 35-37 muestran que el tratamiento de las células MCF-7 con BSC induce un

acúmulo en el porcentaje de las células subdiploides (células apoptóticas, fase SubG<sub>1</sub>). Al mismo tiempo se observa una disminución de la población celular en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. También, se observa un aumento del número de células en la fase G<sub>2</sub>/M, lo que sugiere un bloqueo del ciclo celular en esta fase como consecuencia de la presencia de células dotadas de un daño en el DNA. El satraplatino (Kalimutho, M., 2011), el taxol (Snyder, J.P., 2001; Samadi, N., 2011) o la vincristina (Morre, D.J., 1991) son algunos de los numerosos fármacos antineoplásicos descritos con capacidad para inducir un bloqueo del ciclo celular en G<sub>2</sub>/M en diferentes tipos de cáncer.

### **1.3 El tratamiento con BSC no altera la expresión de p53**

La proteína p53 representa una diana ideal para el diseño de fármacos antineoplásicos, porque p53 está mutada en más de la mitad de los tumores humanos (Hollstein, M., 1994; Wang, W., 2003). La proteína supresora de tumores p53 sigue siendo uno de los genes más estudiados en la biología y terapia del cáncer (Levine, A.J., 1997; El-Deiry, W.S., 1998; Asker, C., 1999; Vogelstein, B., 2000; Balint, E.E., 2001; Wang, W., 2003). En un principio, se consideraba un oncogen (Vogelstein, B., 2000; Wang, W., 2003) hasta que estudios posteriores revelaron que p53 es un supresor de tumores, que se une específicamente a elementos de respuesta en el DNA y activa genes diana llevando a la parada del ciclo celular y/o apoptosis (Wang, W., 2003).

Las funciones principales de p53 están relacionadas con su actividad como factor de transcripción ya que activa o inhibe un numeroso grupo de genes diana, algunos de los cuales están implicados en las tres principales respuestas ante el daño en el DNA: reparación del DNA dañado, parada del ciclo celular y apoptosis (Clarke, A.R., 1993; Polyak, K., 1997; Vogelstein, B., 2000; Zhao, R., 2000; Jiang, L., 2010). La proteína p53 es una de las más importantes proteínas supresoras de tumores en la célula ya que previene la transferencia del DNA dañado (Das, S., 2008). La función de p53 está ligada a otros procesos celulares como la senescencia, el metabolismo y la autofagia. Además de su función sobre la transcripción también interactúa físicamente con importantes proteínas celulares que median los efectos independientes de la transcripción (Moll, U.M., 2005; Schuler, M., 2005; Jiang, L., 2010). Por ejemplo, en respuesta a un daño en el DNA, p53 induce apoptosis por sus acciones en el núcleo sobre la transcripción de proteínas proapoptóticas como PUMA, Bax y otras, pero al mismo tiempo también contribuye a nivel citoplasmático con la activación directa de Bid en el que induce un cambio conformacional, o indirecto al retener Bcl-XL y liberar Bid de su control inhibitorio (Vousden, K.H., 2005; Jiang, L., 2010).

En este trabajo, no se ha podido detectar cambios en el nivel de expresión de p53 a las células tratadas con los derivados BSC (Figura 40). Estos resultados sugieren que p53 no está implicada directamente en el efecto desencadenado por los derivados **3g** y **3n** en la línea celular de adenocarcinoma de mama (MCF-7), aunque este hecho debería confirmarse con análisis posteriores de fosforilación y/o de acilación de p53.

La proteína p53 es un factor clave en el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular ya que regula las transiciones G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M. Se ha descrito que la activación de p53 en respuesta al DNA dañado, reprime la expresión de la caspasa-2 y provoca la parada del ciclo celular. La parada depende de si p53 activa o inhibe genes como p21<sup>CIP</sup> u otros (Baptiste-Okoh, N., 2008). La proteína p21<sup>CIP</sup> es un regulador fundamental tanto del ciclo celular como de la reparación del DNA, la senescencia, el envejecimiento y la muerte celular (Jung, Y.S., 2010). La proteína p21<sup>CIP</sup> es un miembro de la familia CIP/KIP de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas, que se unen e inhiben la actividad de los complejos ciclina-Cdk, bloqueando así la progresión del ciclo celular. La expresión de p21<sup>CIP</sup> está relacionada con el bloqueo del ciclo en las fases G<sub>1</sub>/S o G<sub>2</sub>/M. Su capacidad de bloquear el ciclo le asigna un papel principal en el freno del crecimiento tras el daño en el DNA, por lo que se considera un mediador clave de la función de p53 (Xia, M., 2011). En este trabajo se ha detectado un bloqueo del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M en células MCF-7 tras 12 o 24 horas de tratamiento con BSC. Sin embargo, p21<sup>CIP</sup> no puede estar implicado en este bloqueo ya que sus niveles en estas células se detectan disminuidos tras los tratamientos (Figura 39).

#### **1.4 Efecto de los BSC en las proteínas reguladoras en el proceso del ciclo celular**

El tratamiento del cáncer con fármacos genotóxicos habitualmente lleva a una acumulación de la proteína supresora de tumores, p53, que se considera necesaria para que sean efectivos estos tratamientos ya que esta acumulación provocaría una activación de la vía intrínseca de apoptosis. Sin embargo, el bloqueo del ciclo en G<sub>2</sub>/M sin alteraciones en la expresión de p53 sugiere que este bloqueo y la muerte celular inducida por BSC en las células MCF-7 no esté mediado directamente por una vía dependiente de p53.

La progresión a través del ciclo celular es regulada por los miembros de una familia con actividad proteínquinasa. Éstos forman unos complejos que constan de una proteína catalítica, Cdk, y su correspondiente proteína activadora, una ciclina (Vermeulen, K., 2003). Los diferentes complejos de Cdks desempeñan diversas funciones en las diferentes fases (Wang, Q., 2011). Cualquier alteración en su función produce una desregulación del ciclo, lo que afecta al

transcurso de las células a través de las diferentes fases y es un componente esencial en la evolución del cáncer (Payton, M., 2006).

La actividad de la proteinquinasa Cdk1 en combinación con la ciclina A y B1 es clave para la transición de la fase G<sub>2</sub>/M (Iwabuchi, M., 2002). El complejo ciclina A-Cdk1 promueve la entrada en mitosis. La mitosis es regulada por el complejo ciclina B-Cdk1 (Vermeulen, K., 2003). Se ha descrito que la pérdida de la actividad de Cdk1 o la expresión aberrante de Cdk1 implica una parada del ciclo en fase G<sub>2</sub> (Wang, Q., 2011). La actividad de la Cdk2 se da en el límite entre las fases G<sub>1</sub>/S después de unirse a la ciclina E o a la ciclina A (Hanse, E.A., 2009). En este estudio se ha comprobado que las células MCF-7 tratadas con los derivados BSC presentan una disminución en los niveles de expresión de Cdk1 y Cdk2 sin variaciones en la expresión de las ciclinas A y B1. Estos datos son coherentes con la acumulación de las células en la fase G<sub>2</sub>/M y la interrupción de su paso a la mitosis.

La integridad de la progresión por la fase M es llevada a cabo por tres principales puntos de control: uno que detecta el DNA dañado (paro en la fase G<sub>2</sub>/M), otro que detecta las malformaciones en el huso mitótico y otra que detecta la posición incorrecta del huso. La regulación mitótica es llevada a cabo por genes como PLK1, Aurora-A y -B y BUBR. En respuesta a estrés genotóxico, las proteinquinasas ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y ATR (*ATM-Related*) se activan. La proteinquinasa ATM o ATR pueden detectar el DNA dañado y fosforilar un número de proteínas diana, las cuales participan en la parada del ciclo de las células con DNA dañado. Su activación, va seguida de la activación de Chk2 y Chk1. Estas quinasas fosforilan e inactivan a la fosfatasa CDC25, llevando a una inactivación de Cdk1 y la parada del ciclo en la fase G<sub>2</sub> (Okada, H., 2004). De esta manera, el complejo ciclina A-B/Cdk1 permanece inactivo, sin posibilidad de fosforilar diversos sustratos necesarios para la entrada de las células en mitosis.

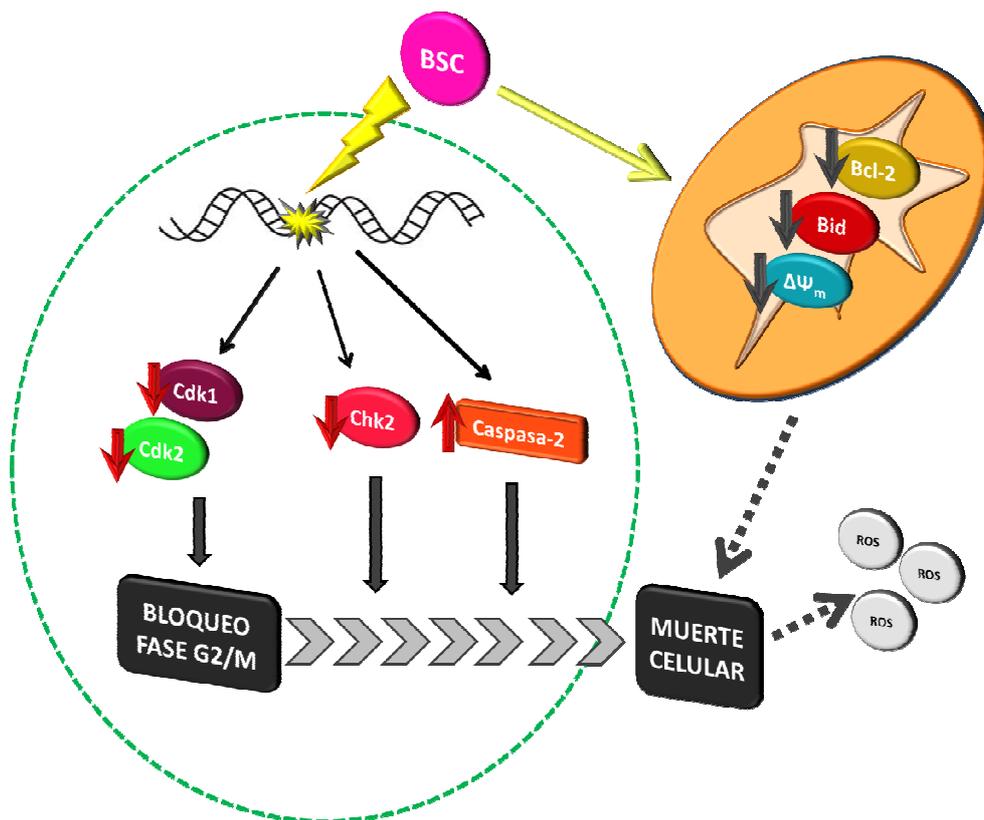
En los resultados obtenidos del tratamiento de las células con BSC se muestra una disminución de la expresión de Chk2 (Figura 41). La inhibición de Chk2 en las células con el DNA dañado podría permitir la entrada prematura en mitosis. Así, se ha demostrado que la inhibición de Chk2 estimula la apoptosis en células HeLa y también que el silenciamiento en estas células de la caspasa-2 con siRNA las convierte en resistentes a este estímulo apoptótico (Castedo, M., 2004). Chk2 es también capaz de fosforilar a p53 que como ya se ha demostrado es factor clave en el equilibrio entre la supervivencia y la muerte celular por vía de la regulación de las transiciones G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M. La activación de p53 en respuesta al DNA dañado da como resultado la represión de la caspasa-2 y parada del ciclo celular (Baptiste-Okoh, N., 2008). La parada en la transición G<sub>1</sub>/S depende de la habilidad de p53 para inducir p21<sup>CIP</sup>. La parada en G<sub>2</sub>/M implica la represión de la transcripción de Cdk1 y de la ciclina B1 por p21<sup>CIP</sup> (Flatt, P.M., 2000).

La actividad de las Cdks en el ciclo celular es controlada por dos familias de inhibidores Cdks (ink4 y CIP/KIP). La familia de los ink4 (p15, p16, p19) inhibe la actividad de las Cdk4 y 6; la familia CIP/KIP (p21, p27, p57) inhibe la actividad de los complejos ciclina-Cdk. La proteína p21<sup>CIP</sup> tiene como función prevenir la entrada de las células dañadas en la fase G<sub>2</sub>/M, mediante la inhibición de las Cdks (Foster, I., 2007). Los datos obtenidos muestran una reducción en la expresión de p21<sup>CIP</sup> y Cdk1 con el tratamiento con BSC (Figura 39). La disminución de p21<sup>CIP</sup> podría explicar que se suprime el bloqueo en fase G<sub>1</sub>/S a pesar de darse una reducción en la expresión de Cdk2 (Figura 36), mientras que la disminución de la expresión de la proteína Cdk1 (Figura 35) concuerda con la parada en fase G<sub>2</sub>/M. La inhibición de p21<sup>CIP</sup> sugiere que las células tumorales experimentan una apoptosis mediada por p53 en respuesta al DNA dañado (Chen, Y., 2011). Sin embargo, la ausencia de variaciones en los niveles de expresión de la proteína p53 (Figura 40) pueden indicar que la muerte celular inducida por BSC no está directamente mediada por p53. Además de su función en la progresión del ciclo celular, Cdk2 también activa los puntos de control de la fase G<sub>2</sub>/M independientemente de p53 (Chung, J.H., 2010). Como consecuencia, la ausencia de variación en la expresión de p53 y la disminución de los niveles de Cdk2, Chk2 y p21<sup>CIP</sup> sugiere que las células con daño en el DNA pueden entrar prematuramente en mitosis, lo que podría llevar tanto a la supervivencia y proliferación de las células mutadas como a la muerte celular. Por ello, aunque se requieren experimentos adicionales para aclarar los mecanismos moleculares exactos implicados en la muerte celular inducida por los derivados BSC, el análisis de proteínas de puntos de control del ciclo celular y de las proteínas implicadas en la regulación de muerte celular sugiere que las células tratadas con BSC podrían morir por catástrofe mitótica.

El término de catástrofe mitótica no está del todo aceptado, pero se refiere a una mitosis aberrante que lleva a la muerte celular (la cual se da por necrosis o apoptosis) (Eom, Y.W., 2005), caracterizada por una micronucleación múltiple y una condensación de la cromatina (Swanson, 1995; Ianzini, 1997; Roninson, 2001). En células cancerosas, el mecanismo de la catástrofe mitótica se desencadena por acción de agentes antineoplásicos que dañan el DNA (Nitta, 2004; Eom, Y.W., 2005). La acción de dichos fármacos provoca fallos en los puntos de control del ciclo celular, que lleva al bloqueo del ciclo celular antes y durante la mitosis, en la que se produce una segregación aberrante de cromosomas que culmina en la activación de una vía apoptótica y finalmente, muerte celular. La muerte celular se da durante la transición metafase/anafase y se caracteriza por la activación de la caspasa-2, la cual es activada por daño en el DNA, y/o la permeabilidad de la membrana mitocondrial mediante la liberación de efectores de muerte como factores apoptogénicos y del citocromo *c*, activador de las caspasas -9 y -3. Las células ejecutan un programa apoptótico en respuesta a un fallo mitótico. Esto implica que el programa apoptótico desencadenado se produzca por catástrofe mitótica (Castedo, M.,

2004) lo que previene la aneuploidización, participante en la oncogénesis. Este proceso está regulado por numerosas moléculas (complejo ciclina B1-Cdk1, Aurora, etc.), proteínas reguladoras del ciclo celular, p53, caspasas, miembros de la familia Bcl-2 (Castedo, M., 2004).

En resumen, el tratamiento de las células MCF-7 con los compuestos **3g** y **3n** induce un daño en el DNA que provoca un bloqueo en el transcurso del ciclo celular y una muerte por apoptosis con sobreproducción de ROS (Figura 42). El bloqueo del ciclo celular se produce en la fase G<sub>2</sub>/M como consecuencia de la alteración de la expresión de algunas de las proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular. En este caso, la disminución observada en los niveles de expresión de Cdk1 podría ser una de las causas de dicha parada. A continuación, las células dañadas ejecutarían un proceso de muerte celular por apoptosis, probablemente debido a un fallo en la mitosis. Dicho fallo puede ser consecuencia de la disminución en los niveles de expresión de proteínas como Chk2, Cdk2 y p21<sup>CIP</sup> que conducirían a una entrada prematura en mitosis. La mitosis aberrante activaría una vía de muerte por la cual las células dañadas serían eliminadas. La alteración en la integridad de la mitocondria, que se manifiesta con una disipación reversible de  $\Delta\Psi_m$  y el descenso de los niveles de las proteínas reguladoras del proceso apoptótico, Bcl-2 y Bid, lleva a suponer que también la mitocondria podría haber influido en el desencadenamiento del proceso de apoptosis. Sin embargo, puesto que este hecho provocaría la liberación de factores apoptogénicos que producen la activación de caspasas, implicaría un proceso de muerte inhibible por el empleo del inhibidor de caspasas universal, z-VAD-fmk. Debido a que esto ha sido descartado, los datos obtenidos llevan a la hipótesis de una muerte celular durante la transición metafase/anafase, un fenómeno caracterizado por el bloqueo del ciclo y la activación de la caspasa-2 (Castedo, M., 2004).



**Figura 42.** Mecanismo de acción de los derivados BSC, 3g y 3n en células MCF-7. Hipótesis del bloqueo del ciclo celular y del proceso de apoptosis inducido por BSC.



# **CONCLUSIONES**



Las principales conclusiones que se obtienen de este trabajo son las siguientes:

1. De los 17 derivados BSC sintetizados, 16, en una u otra línea celular tumoral han presentado valores de  $GI_{50}$  menores de  $10 \mu\text{M}$ .
2. Los BSC más activos son aquellos que contienen un grupo metilseleno (**3b**, **3g**, **3n** y **3p**). Las líneas celulares MCF-7 (Adenocarcinoma de mama) y CCRF-CEM (Leucemia T-linfoblástica), han sido las más sensibles a la acción citotóxica y antiproliferativa de los compuestos, dentro de las líneas ensayadas.
3. El compuesto **3g** presenta selectividad en las células tumorales frente a las células no tumorales de mama ( $LD_{50}184B5/ LD_{50}MCF-7= 81,58/9,85=8,3$ ).
4. Cabe destacar el compuesto **3g** como el más activo de los BSC en el conjunto de las líneas analizadas, con parámetros de toxicidad menores de  $10 \mu\text{M}$ , en todas ellas, y el compuesto **3n** como el de mayor toxicidad en la línea celular de adenocarcinoma de mama ( $GI_{50} = 2\text{nM}$ ,  $TGI = 270\text{nM}$  y  $LD_{50} = 7,83\mu\text{M}$ ).
5. Los compuestos **3g** y **3n** inducen un proceso de muerte celular apoptótico en células CCRF-CEM y MCF-7. Este proceso es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al compuesto.
6. Los derivados BSC, **3g** y **3n** inducen una disipación reversible de  $\Delta\Psi_m$  que se acompaña de un descenso en los niveles de expresión de las proteínas anti-apoptótica Bcl-2 y pro-apoptótica Bid responsables de la apertura del poro mitocondrial.
7. En las células MCF-7, los derivados BSC provocan una sobreproducción de ROS. Sin embargo, este aumento en la producción de ROS no es un mediador en el proceso de muerte celular inducido por los BSC.
8. Tras el tratamiento de células MCF-7 con los derivados **3g** y **3n** se puede detectar una activación de la caspasa-2. A pesar de ello, la muerte celular inducida por estos compuestos no se puede prevenir mediante el pretratamiento de las células con el inhibidor universal de caspasas, z-VAD-fmk, lo que indica que el proceso de muerte es independiente de la activación de caspasas efectoras.

9. En células MCF-7, los compuestos **3g** y **3n** bloquean el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M. Este hecho se manifiesta con el descenso de las kinasas dependientes de ciclinas Cdk1 y Cdk2.
  
10. Los compuestos **3g** y **3n** disminuyen los niveles de expresión de Chk2 y p21<sup>CIP</sup> sin afectar a los de p53 en las células MCF-7. Este resultado sugiere que las células dañadas podrían iniciar la mitosis de forma prematura y, por tanto, morir por catástrofe mitótica.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Ameisen, J.C. The Origin of programmed cell death. *Science*, **1996**; 272: 278-279.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **1998**; 281:1305-1308.
- Asker, C., Wiman, K.G., Selivanova, G. p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **1999**; 265:1-6.
- Balint, E.E., Vousden, K.H. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer*, **2001**; 85:1813-1823.
- Bao, Q., Shi, Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ.*, **2007**; 14:56–65.
- Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A. M., Prives, C. Caspase 2 is both required for p53-mediated apoptosis and downregulated by p53 in a p21-dependent manner. *Cell Cycle* 7, **2008**; 1133-1138.
- Bártek, J., Bártková, J., Vojtěšek, B., Stasková, Z., Rejthar, A., Kovarik, J., Lane, D.P. Patterns of expression of the p53 tumour suppressor in human breast tissues and tumours in situ and in vitro. *Int J Cancer.*, **1990**; 46(5):839-844.
- Bártek, J., Falck, J., Lukas, J. CHK2 kinase—a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **2001**; 2(12):877-886.
- Beckerman, R., Prives, C. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2010**; 2, a000935.
- Belizário, J.E., Alves, J., Occhiucci, J.M., Garay-Malpartida, M., Sesso, A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res*. **2007**; 40(8):1011-1024.
- Blagosklonny, M.V. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia*, **2000**; 14(8):1502-1508.
- Borner, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol. Immunol.*, **2003**; 39 (11) 615–647.
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A., Giaccone, G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*. **2005**; 11(9):3155-3162.
- Brozmanová, J., Mániková, D., Vlčková, V., Chovanec, M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. *Arch Toxicol*, **2010**; 84:919–938.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer C., Waldman, T., Zhou, S., Bown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **1998**; 282: 1497-1501.

- Burdon, R.H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, **1995**; 18, 775-794.
- Cadwell, C., Zambetti, G.P. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*, **2001**; 277: 15-30.
- Cantara, S., Donnini, S., Giachetti, A., Thorpe, P.E., Ziche, M. Exogenous BH4/Bcl-2 peptide reverts coronary endothelial cell apoptosis induced by oxidative stress. *J Vasc Res.*, **2004**; 41(2): 202-207.
- Carnero, A., Hannon, G.J. The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **1998**; 227, 43.
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Valent, A., Raslova, K., Yakushijin, K., Horne, D., Feunteun, J., Lenoir, G., Medema, R., Vainchenker, W., Kroenmer, G. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene*, **2004**; 24, 4362-4370.
- Ceung, E., Wadhera, P., Dorff, T., Pinski, J. Diet and prostate cancer risk reduction. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **2008**; 8, 43-50.
- Chapman, D.L., Wolgemuth, D.J. Identification of a mouse B-type cyclin which exhibits developmentally regulated expression in the germ line. *Mol Reprod Dev.*, **1992**; 33: 259-269.
- Chen, T., Wong, Y.S. Selenocysteine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed. Pharmacotherapy*, **2009**; 105-113.
- Chen, Y., Zhang, L., and Jones, K. A. SKIP counteracts p53-mediated apoptosis via selective regulation of p21Cip1 mRNA splicing. *Genes Dev* 25, **2011**; 701-716.
- Chipuk, J.E., Fisher, J.C., Dillon, C.P., Kriwacki, R.W., Kuwana, T., Green, D.R. Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2008**; 105(51):20327-20332.
- Chipuk, J.E., Green, D.R. How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol.*, **2008**; 18(4):157-164.
- Chowdhury, I., Tharakan, G.K., Bath, G.K. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett.*, **2006**; 11(4):506-525.
- Chung, J. H., and Bunz, F. Cdk2 is required for p53-independent G2/M checkpoint control. *PLoS Genet* 6, **2010**; e1000863.

- Clark, L.C., Combs, G.F. Jr., Turnbull, B.W., Slate, E.H., Chalker, D.K., Chow, J., Davis, L.S., Glover, R.A., Graham, G.F., Gross, E.G., Krongrad, A., Lesher, J.L. Jr., Park, H.K., Sanders, B.B. Jr., Smith, C.L., Taylor, J.R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional prevention of cancer study group. *JAMA*, **1996**; 276:1957–1963.
- Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., Wyllie, A.H. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, **1993**; 362(6423):849-852.
- Cmielová, J., Rezáčová, M. p21(Cip1/Waf1) protein and its function based on a subcellular localization. *J Cell Biochem.*, **2011**; doi: 10.1002/jcb.23296. [Epub ahead of print].
- Cohen, J.J. Apoptosis. *Immunol Today*, **1993**; 14:126-130.
- Cohen, J.J., Duke, R.C., Fadok, V.A., Sellins, K.S. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* , **1992**; 10:267-293.
- Combs, G.F. Jr., Gray, W.P. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther*, **1998**; 79:179–192.
- Cotter, T.G., Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat. Rev. Cancer*, **2009**; 9, 501–507.
- Das, S., Boswell, S.A., Aaronson, S.A., Lee, S.W. P53 promoter selection: choosing between life and death. *Cell Cycle.*, **2008**; 7(2):154-157.
- Debatin, K.M., Fulda, S., *Apoptosis and Cancer Therapy*. **2006**, Vol. 1.
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. A decade of caspases. *Oncogene*, **2003**; 22:8543-8567.
- El-Deiry, W.S. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*, **1998**; 8:345-357.
- Eom, Y.W., Kim, M.A., Park, S.S., Goo, M.J., Kwon, H.J., Sohn, S., Kim, W.H., Yoon, G., Choi, K.S. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and death cell through mitotic catastrophe. *Oncogene.*, **2005**; 24(30):4765-4777.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).*, **2005**;37(11):719-727.
- Fang, J.; Seki, T.; Maeda, H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Advanced drug delivery reviews*, **2009**; 28;61(4):290-302.
- Festjens, N., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. Necrosis a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascade important mediators and concomitant immune. *Biochim Biophys Acta.*, **2006**; 1757(9-10):1371-1387.

- Finley, J.W., Penland, J.G. Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: Clinical and psychological findings. *The journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, **1998**; 11, (1), 11-27.
- Fischer B., Coelho, D., Dufour, P., Bergerat, J.P., Denis, J.M., Gueulette J., Bischoff, P. Caspase-8 mediated cleavage of the pro-apoptotic BCL-2 family member BID in p53-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res.*, **2003**; 306(2):516-522.
- Flatt, P.M., Pietenpol, J.A. Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the crossroads of carcinogenesis and drug discovery. *Drug Metab Rev.*, **2000**; 32(3-4):283-305.
- Flórez, J. Quimioterapia antineoplásica I. Bases fundamentales. Antimetabolitos, fijadores a la tubulina, inhibidores de topoisomerasas. *Farmacología Humana 3º Ed.*, **2008**.
- Foster, I. Cancer: a cell cycle defect. *Radiography*, **2008**; 14, 144-149.
- Freinbichler, W., Colivicchi, M.A., Stefanini, C., Bianchi, L., Ballini, C., Misini, B., Weinberger, P., Linert, W., Varešlija, D., Tipton, K.F., Della Corte, L., Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cellular and molecular life sciences*, **2011**.
- Furuno, N., den Elzen, N., Pines, J. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol.*, **1999**; 147: 295–306.
- Gallant, P., Nigg, E.A. Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol.*, **1992**; 117: 213–224.
- Galluzzi, L., Maiuri, M.C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.*, **2007**; 14(7):1237-1243.
- Gao, N., Rahmani, M., Dent, P. & Grant, S. 2-Methoxyestradiol-induced apoptosis in human leukemia cells proceeds through a reactive oxygen species and Akt-dependent process. *Oncogene*, **2005**; 24, 3797-3809.
- Goel, A., Fuerst, F., Hotchkiss, E., and Boland, C. R. Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Biol Ther* 5, **2006**; 529-535.
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., Green, D.R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biol.*, **2000**; 2, 156-162.

- Green, D.R., J.C. Reed. Mitochondria and apoptosis. *Science*, **1998**; 281(5381):1309-1312.
- Green, D.R., Kroemer, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, **2004**; 305(5684):626-629.
- Gregory, C.D. CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to immune system. *Curr Opin Immunol*, **2000**; 12:27-34.
- Gurusamy, K. Trace element concentration in primary liver cancers—a systematic review. *Biol. Trace Elem. Res*, **2007**; 118, 191-206.
- Hanse, E.A., Nelsen, C.J., Goggin, M.M., Anttila, C.K., Mullany, L.K., Berthet, C., Kaldis, P., Crary, G.S., Kuriyama, R., Albrecht, J.H. Cdk2 plays a critical role in hepatocyte cell cycle progression and survival in the setting of cyclin D1 expression in vivo. *Cell Cycle.*, **2009**; 8(17):2802-2809.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell, C.L., Swindell, E. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol. Biol. Cell* , **1995**; 6, 387.
- Hengartner, M.O. The Biochemistry of apoptosis. *Nature*, **2000**; 407: 770-776.
- Hengst, L., Reed, S.I. Inhibitors of the Cip /Kip family. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**; 227, 25.
- Higuchi, M., Honda, T., Proske, R.J. & Yeh, E.T. Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene*, **1998**; 17, 2753-2760.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M., Kroemer, G. The apoptosisnecrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, **1997**; 15:1573-1581.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., Harris, C.C. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, **1994**; 22:3551-3555.
- Hu, C. C., Tang, C. H., and Wang, J. J. Caspase activation in response to cytotoxic *Rana catesbeiana* ribonuclease in MCF-7 cells. *FEBS Lett.*, **2001**; 503, 65-68.
- Hurst, R.; Fairweather-Tait, S. Selenium and vitamin E supplementation for cancer prevention. *JAMA*, **2009**; 301:1876–1877.

- Huschtscha, L.I., Bartier, W.A., Ross, C.E., Tattersall, M.H. Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs in vitro. *Br J Cancer*, **1996**; 73(1): p. 54-60.
- Ianzini, F., Mackey, M.A. Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. *Int J Radiat Biol.*, **1997**; 72(4):409-421.
- Ip, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *J Nutr.*, **1998**; 128:1845–1854.
- Ip, C., Thompson, H.J., Zhu, Z., Ganther, H.E. In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer Res.*, **2000**; 60:2882–2886.
- Ip, C., Dong, Y., and Ganther, H. E. New concepts in selenium chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.*, **2002**; 21, 281-289.
- Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T.M., Kishimoto, T. Coordinated regulation of M phase exit and S phase entry by the Cdc2 activity level in the early embryonic cell cycle. *Dev Biol.*, **2002**; 243(1):34-43.
- Jäätellä, M., Tschopp, J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol.*, **2003**; 4:416-423.
- Jang, J.H. and Y.J. Surh, Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol.*, **2003**; 66(8):1371-1379.
- Jang, T.H., Bae, J.Y., Park, O.K., Kim, J.H., Cho, K.H., Jeon, J.H., Park, H.H. Identification and analysis of dominant negative mutants of RAIDD and PIDD. *Biochim Biophys Acta.* **2010**; 1804:1557–1563.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem.*, **1998**; 273, 9357-9360.
- Janssens, S., Tinel, A., Lippens, S., Tschopp, J. PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell*, **2005**; 123(6):1079–1092.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.*, **2010**; 60(5):277-300.
- Jiang, L., Sheikh, M.S., Huang, Y. Decision Making by p53: life versus death. *Mol Cell Pharmacol.*, **2010**; 2(2):69-77.

- Juang SH, Lung CC, Hsu PC, Hsu KS, Li YC, Hong PC, Shiah HS, Kuo CC, Huang CW, Wang YC, Huang L, Chen TS, Chen SF, Fu KC, Hsu CL, Lin MJ, Chang CJ, Ashendel CL, Chan TC, Chou KM, Chang J. D-501036, a novel selenophene-based triheterocycle derivative, exhibits potent in vitro and in vivo antitumoral activity which involves DNA damage and ataxia telangiectasia-mutated nuclear protein kinase activation. *Mol Cancer Ther.*, **2007**; 6(1):193-202.
- Kalimutho, M., Minutolo, A., Grelli, S., Federici, G., Bernardini, S. Platinum-(IV)-derivative satraplatin induced G(2)/M cell cycle perturbation via p53-p21(waf1/cip1)-independent pathway in human colorectal cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.*, **2011** Sep 19. doi: 10.1038/aps.2011.107. [Epub ahead of print].
- Kantari, C., Walczak, H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.*, **2011**;1813(4):558-563.
- Kaufmann, S.H., Vaux, D.L. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*, **2003**; 22(47): 7414-7430.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **1972**, 26, 239–257.
- Kim, P.K., Mahidhara, R., Seol, D. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat*, **2001**; 4, no. 6:695.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., Cheng, E.H. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol.*, **2006**; 8(12):1348-1358.
- Kim, H.J., Chakravarti, N., Oridate, N., Choe, C., Claret, F.X., Lotan, R. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis triggered by reactive oxygen species is mediated by activation of MAPKs in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*, **2006**; 4;25(19):2785-2794.
- Kim, I.R., Murakami, K., Chen, N.J., Saibil, S.D., Matysiak-Zablocki, E., Elford, A.R., Bonnard, M., Benchimol, S., Jurisicova, A., Yeh, W.C., Ohashi, P.S. DNA damage- and stress-induced apoptosis occurs independently of PIDD. *Apoptosis*, **2009**; 14:1039–1049
- Kim, M.H., Kim, M.O., Heo, J.S., Kim, J.S., Han, H.J. Acetylcholine inhibits long-term hypoxia-induced apoptosis by suppressing the oxidative stress-mediated MAPKs activation as well as regulation of Bcl-2, c-IAPs, and caspase-3 in mouse embryonic stem cells. *Apoptosis*, **2008**; 13(2):295-304.

- Kinningham, K.K., Oberley, T.D., Lin, S., Mattingly, C.A. & St Clair, D.K. Overexpression of manganese superoxide dismutase protects against mitochondrial-initiated poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death. *Faseb J*, **1999**; 13, 1601-1610.
- Klimes, D. et al., Phase Internet-based System for anti-tumor chemotherapy evaluation. *Computer methods and programs in biomedicine*, **2009**; 93: 292-296.
- Kroemer, G. et al. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, **1997**; 18: 44-51.
- Krumschnabel, G., Sohm, B., Bock, F., Manzl, C., Villunger, A. The enigma of caspase-2: the laymen view. *Cell Death Differ.*, **2009**; 16, 195–207.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., Newmeyer, D.D. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell.*, **2005**; 17, 525–535.
- Laane, E., Panaretakis, T., Pokrovskaja, K., Buentke, E., Corcoran, M., Söderhäll, S., Heyman, M., Mazur, J., Zhivotovsky, B., Porwit, A., Grandér, D. Dexamethasone-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia involves differential regulation of Bcl-2 family members. *Haematologica*, **2007**; 92(11): 1460-1469.
- Lane, D.P., Hupp, T.R. Drug discovery and p53. *Drug Discov Today*, **2003**; 8: 347-355.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., Lazebnik, Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*. **2002**; 297:1352–1354.
- Leber, B., J. Lin, and D.W. Andrews, *Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes*. *Apoptosis*, **2007**; 12(5): p. 897-911.
- Lee, M.H., Reynisdottir, I., Massague, J. Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*. **1995**; 9, 639.
- Leist, M., Jäättelä, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2001**; 2:589-598.
- Letavayova, L., Vlckova, V., Brozmanova, J. Selenium: from cancer prevention to DNA damage. *Toxicology* 227, **2006**; 1-14.
- Levine, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **1997**; 88:323-331.
- Levine, A.J., Finlay, C.A., Hinds, P.W. P53 is a tumor suppressor gene. *Cell*, **2004**; 116: S67-9.
- Li, D., Ueta, E., Kimura, T., Yamamoto, T., Osaki, T. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. *Cancer Sci.*, **2004**. 95(8): 644-650.

- Li, J. and Yuan, J., Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, **2008**; 27, 6194–6206.
- Li, Y.; Pan, J.; Li, J.L.; Lee, J.; Tunkey, C.; Saraf, K.; Garbe, J.; Whitley, M.; Jelinsky, S.; Stampfer, M; Haney, S., Transcriptional changes associated with breast cancer occur as normal human mammary epithelial cells overcome senescence barriers and become immortalized. *Molecular Cancer*, **2007**; 6, (1), 7.
- Li, Z.Y., Yang, Y., Ming, M., Liu, B. Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*, **2011** Sep 17. [Epub ahead of print].
- Lippman, S. M., Klein, E. A., Goodman, P. J., Lucia, M. S., Thompson, I. M., Ford, L.G., PRNAes, H. L., Minasian, L. M., Gaziano, J. M., Hartline, J. A., Parsons, J. K., Bearden, J. D., 3rd, Crawford, E. D., Goodman, G. E., Claudio, J., Winkquist, E., Cook, E. D., Karp, D. D., Walther, P., Lieber, M. M., Kristal, A. R., Darke, A. K., RNAold, K.B., Ganz, P. A., Santella, R. M., Albanes, D., Taylor, P. R., Probstfield, J. L., Jagpal, T. J., Crowley, J. J., Meyskens, F. L., Jr., Baker, L. H., and Coltman, C. A., Jr. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Jama* **301**, 2009; 39-5.
- Lomonaco, S.L., Xu, X.S., Wang, G. The role of Bcl-x(L) protein in nucleotide excision repair-facilitated cell protection against cisplatin-induced apoptosis. *DNA Cell Biol.*, **2009**; 28(6):285-294.
- Lozano, J.C., Perret, E., Schatt, P., RNAould, C., Peaucellier, G., Picard, A. Molecular cloning, gene localization, and structure of human cyclin B3. *Biochem Biophys Res Commun.*, **2002**; 291: 406–413.
- Maddike, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Zuse, A., Eshranghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., Los, M. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: Implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat.*, **2007**; 10(1-2):13-29.
- Manzl C, Krumschnabel G, Bock F, et al. Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *J Cell Biol.* **2009**; 185:291–303.
- Mehmet, H. Caspases find a new place to hide. *Nature*, **2000**; 403: 29-30.
- Meuillet, E., Stratton, S., Prasad, C.D., Goulet, A.C., Kagey, J., Porterfield, B., Nelson, M.A. Chemoprevention of prostate cancer with selenium: an update on current clinical trials and preclinical findings. *J Cell Biochem.*, **2004**; 91:443–458.

- Moll, U.M., Wolff, S., Speidel, D., Deppert, W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol.*, **2005**;17:631–636.
- Morales, M.C., Pérez-Yarza, G., Rementería, N.N., Boyano, M.D., Apraiz, A., Gómez-Muñoz, A., Pérez-Andrés, E., Asumendi, A. 4-HPR-mediated leukemia cell cytotoxicity is triggered by ceramide-induced mitochondrial oxidative stress and is regulated downstream by Bcl-2. *Free Radic Res.*, **2007**; 41(5): 591-601.
- Morre, D.J., Brightman, A.O. NADH oxidase of plasma membranes. *J Bioenerg Biomembr.*, **1991**; 23(3): p. 469-489.
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Method*, **1983**; 65, (1-2), 55-63.
- Nguyen, T.B., Manova, K., Capodiceci, P., Lindon, C., Bottega, S., Wang, X.Y., Refik-Rogers, J., Pines, J., Wolgemuth, D.J., Koff, A. Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin. *J Biol Chem.*, **2002**; 277: 41960–41969.
- Nitta, M., Kobayashi, O., Honda, S., Hirota, T., Kuninaka, S., Marumoto, T., Ushio, Y., Saya, H. Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene.*, 2004; 23(39):6548-6558.
- Nugent, J.H., Alfa, C.E., Young, T., Hyams, J.S. Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci.*, **1991**; 99:669–674.
- O'Reilly, L.A., Ekert, P., Harvey, N., Marsden, V., Cullen, L., Vaux, D.L., Hacker, G., Magnusson, C., Pakusch, M., Cecconi, F., Kuida, K., Strasser, A., Huang, D.C., Kumar, S. Caspase-2 is not required for thymocyte or neuronal apoptosis even though cleavage of caspase-2 is dependent on both Apaf-1 and caspase 9. *Cell Death Differ.*, **2002**; 9:832–841.
- Okada, H., Mak, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.*, **2004**; 4(8):592-603.
- Ola, M.S., Nawaz, M., Ahsan, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.*, **2011**; 351(1-2):41-58.
- Olsson M, Vakifahmetoglu H, Abruzzo PM, Hogstrand K, Grandien A, Zhivotovsky B. DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene.*, **2009**; 28:1949-1959.

- Oridate, N. et al. Rapid induction of apoptosis in human C33A cervical carcinoma cells by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437). *Int J Cancer*, **1997**; 70, 484-487.
- Oridate, N. et al. Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, **1997**; 89, 1191-1198.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., and Zhivotovsky, B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **2007**; 47, 143-183.
- Ozsoy, H.Z., Sivasubramanian, N., Wieder, E.D., Pedersen, S. & Mann, D.L. Oxidative stress promotes ligand-independent and enhanced ligand-dependent tumor necrosis factor receptor signaling. *J Biol Chem*, **2008**. 283(34): 23419-23428.
- Pan, Z.Q., Reardon, J.T., Li, L., Flores, R.H., Legerski, R., Sancar, A., Hurwitz, J. Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J. Biol. Chem.* **1995**; 270, 22008.
- Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., and Khanna, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* **9**, **2007**; 775-806.
- Park, H.H., Lo, Y.C., Lin, S.C., Wang, L., Yang, J.K., Wu, H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol.*, **2007**; 25:561-586.
- Park, H.H., Logette, E., Raunser, S., Cuenin, S., Wlaz, T., Tschoop, J., Wu, H. Death domain assembly mechanism revealed by crystal structure of the oligomeric PIDDosome core complex. *Cell.*, **2007**;128:533-546.
- Payton, M., Chung, G., Yakowec, P., Wong, A., Powers, D., Xiong, L., Zhang, N., Leal, J., Bush, T.L., Santora, V., Askew, B., Tasker, A., Radinsky, R., Kendall, R., Coats, S. Discovery and evaluation of dual CDK1 and CDK2 inhibitors. *Cancer Res.*, **2006**; 66(8):4299-4308.
- Philchenkov, A., Zavelevich, M., Khranovskaya, N., Surai, P. Comparative analysis of apoptosis induction by selenium compounds in human lymphoblastic leukemia MT-4 cells. *Exp Oncol*, **2007**; 29, 257-261.
- Pines, J., Hunter, T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell*, **1989**; 58: 833-846.

- Plano, D., Sanmartín, C., Moreno, E., Prior, C., Calvo, A., Palop, J.A. Novel potent organoselenium compounds as cytotoxic agents in prostate cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**; *17*, 6853-6859.
- Plano, D., Moreno, E., Font, M., Encio, I., Palop, J.A., Sanmartin, C. Synthesis and *in vitro* anticancer activities of some selenodiazole derivatives. *Arch Pharm (Weinheim)*, **2009**; *343*:680-691.
- Plati, J., Bucur, O. and Khosravi, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr. Biol.* **2011**; *3*, 279–296.
- Platt, N., Da Silva, R.P., Gordon, S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends. Cell Biol.* **1998**; *8*: 365-372.
- Platz, E.A.; Lippman, S.M. Selenium, genetic variation, and prostate cancer risk: epidemiology reflects back on selenium and vitamin E cancer prevention trial. *J Clin Oncol*, **2009**; *27*:3569–3572.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, **1997**; *389*, 300.
- Pozo-Guisado, E. et al. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB. *Int J Cancer*, **2005**; *115*, 74-84.
- Pucci, B., Kasten, M., Giordano, A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*, **2000**; *2*(4): p. 291-9.
- Rayman, M.P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc*, **2005**; *64*:527–542.
- Rayman, M.P. Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. *Biochim Biophys Acta*, **2009**; *1790*:1533–1540.
- Rebsch, C. M., Penna, F. J., 3rd, and Copeland, P. R. Selenoprotein expression is regulated at multiple levels in prostate cells. *Cell Res* *16*, **2006**; 940-948.
- Riabowol, K., Draetta, G., Brizuela, L., Vandre, D., Beach, D. The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. *Cell*, **1989**; *57*: 393–401.
- Rinn, J.L., Huarte, M. To repress or not to repress: This is the guardian's question. *Trends Cell Biol.* **2011**; *21*(6):344-53.
- Rizky Abdulah, Kaori Miyazaki, Minato Nakazawa, Hiroshi Koyama; *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Volume 19, Issues 2-3, 2 December, 2005*; 141-150.

- Robertson, J. D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem.*, **2002**; 277, 29803-29809.
- Rojo, M.I. Biología molecular del cancer. *Ed. Síntesis*, **1995**.
- Roninson, I.B., Broude, E.V., Chang, B.D. If not apoptosis then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist. Updat.*, **2001**; 4, 303–313.
- Rosenthal, S.A. et al., Phase III multinstitutional trial of adjuvent chemotherapy with Paclitaxel, Estramustine and oral etoposide combined with long-term androgen suppression plus radiotherapy along for high risk prostate cancer: preliminary toxicity analysis of RTOG 99-02. *Int. J. Radiation Oncology Biol.Phys.*, **2009**; 73: 672-678.
- Ruffolo, S.C., Shore, G.C. BCL-2 selctively interacts with the BID-induced open conformed of BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem.*, **2003**; 278 (27): 25039-25045.
- Samadi, N., Bekele, R.T., Goping, I.S., Schang, L.M., Brindley, D.N. Lysophosphatidate induces chemo-resistance by releasing breast cancer cells from taxol-induced mitotic arrest. *PLoS One.*, **2011**; 6(5):e20608.
- Sanmartin, C., Palno, D., Palop, J.A. Selenium compounds and apoptotic modulation: a new perspective in cancer therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2008**; 8.
- Sanmartin, C., Plano, D., Dominguez, E., Font, M., Calvo, A., Prior, C., Encio, I., Palop, J.A. Synthesis and pharmacological screening of several aroyl and heteroaroaryl selenylacetic acid derivatives as cytotoxic and antiproliferative agents. *Molecules*, **2009**; 14:3313-3338.
- Satyanarayana, A., Kaldis, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, **2009**; 28(33):2925-39.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., Haslett, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, **1993**; 14:131-136.
- Schrauzer, G.N. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr.*, **2000**; 130:1653–1656.
- Schuler, M., Green, D.R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transaction*, **2001**; Volume 29, part 6.
- Schuler, M., Green, D.R. Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet.*, **2005**; 21:182–187.

- Seitomer, E., Balar, B., He, D., Copeland, P.R., Kinzy, T.G. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* null allele strains identifies a larger role for DNA damage versus oxidative stress pathways in growth inhibition by selenium. *Mol Nutr Food Res.*, **2008**; 52:1305–1315.
- Shamberger, R.J., Frost, D.V. Possible protective effect of selenium against human cancer. , **1969**; 100:682.
- Sherr, C.J. Principles of Tumor Suppression. *Cell*, **2004**; 116:235-46.
- Shi Y. Caspase activation: revisiting the induced proximity model. *Cell*, **2004**; 117:855-858.
- Shim, H.Y., Park, J.H., Paik, H.D., Nah, S.Y., Kim, D.S., Han, Y.S. Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. *Mol Cells*, **2007**; 24:95-104.
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H., Kim, K. Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.*, **2005**; 24:3532–3542.
- Shinwari, Z., Manogaran, P.S., Alrokayan, S.A., Al-Hussein, K.A., Aboussekhra, A. Vincristine and lomustine induce apoptosis and p21(WAF1) up-regulation in medulloblastoma and normal human epithelial and fibroblast cells. *J Neurooncol.*, **2008**; 87(2):123-32.
- Snyder, J.P., Nettles, J.H., Cornett, B., Downing, K.H., Nogales, E. The binding conformation of taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2001**; 98(9):5312-5316.
- Spallholz, J.E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic Biol Med.* **1994**; 17(1):45-64.
- Spallholz, J.E., Palace, V.P., Reid, T.W. Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids. *Biochem Pharmacol.*, **2004**; 67:547–554.
- Stamatakis, M., Palla, V., Karaiskos, I., Xiromeritis, K., Alexiou, I., Pateras, I., Kontzoglou, K. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not? *World J Surg Oncol.*, **2010**; 22;8:111.
- Stein, G.S., Pardee, A.B. *Cell Cycle and Growth Control*, **2004**.
- Swanson, P.E., Carroll, S.B., Zhang, X.F., Mackey, M.A. Spontaneous premature chromosome condensation, micronucleus formation, and non-apoptotic cell death in heated HeLa S3 cells. Ultrastructural observations. *Am J Pathol.* **1995**; 146(4):963-971.

- Sullivan, A., Syed, N., Gasco, M., Bergamaschi, D., Trigiant, G., Attard, M., Hiller, L., Farrell, P.J., Smith, P., Lu, X., Crook, T. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene.*, **2004**; 23(19):3328-3337.
- Sun, W., Yang, J. Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J Cancer.*, **2010**;1:136-40.
- Suzuki, S., Higuchi, M., Proske, R.J., Oridate, N., Hong, W.K., Lotan, R. Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, **1999**; 18(46):6380-7.
- Suzuki, K.T., Kurasaki, K., Suzuki, N. Selenocysteine beta-lyase and methylselenol demethylase in the metabolism of Se-methylated selenocompounds into selenide. *Biochim Biophys Acta*, **2007**; 1770:1053–1061.
- Takahashi, A., Masuda, A., Sun, M., Centonze, V.E., Herman, B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull*, **2004**; 62(6): 497-504.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2008**, 9:231-241.
- Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **1995**; 267: 1456-1462.
- Thornberry, N.A., Lazabnik, Y. Caspases : Enemies within. *Science*, **1998**; 281: 1312-1316.
- Tinel, A., Tschopp, J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science.*, **2004**; 304: 843–846.
- Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S.T., Gracia-Mora, I., Marquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García, M.E., Cruz, A., Bravo-Gómez, M.E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enriquez, S., Sotelo, J. Cas Igly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia.*, **2005**; 7(6):563-574.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Zhivotovsky, B. The unpredictable The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell Biol.*, **2010**; 20(3):150-159.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, **2007**; 39(1):44-84.

- Vaux, D.L., Strasser, A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1996**; 93: 2239-2244.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.*, **2003**; 36, 131-149.
- Verrax, J., Beck, R., Dejeans, N., Glorieux, C., Sid, B., Pedrosa, R.C., Benites, J., Vásquez, D., Valderrama, J.A., Calderon, P.B. Redox-active quinones and ascorbate: an innovative cancer therapy that exploits the vulnerability of cancer cells to oxidative stress. *Anticancer Agents Med Chem.*, **2011**;11(2):213-221.
- Visvader, J.E. Cells of origin in cancer. *Nature*, **2011**; 469(7330):314-322.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature*, **2000**; 408:307-310.
- Vousden, K.H. Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science.*, **2005**; 309:1685–1686.
- Waga, S., Li, R., Stillman, B. p53-induced p21 controls DNA replication. *Leukemia*, **1997**; 11, 321.
- Wang, T.J., Huang, M.S., Hong, C.Y., Tse, V., Silverberg, G.D., Hsiao, M. Comparisons of tumor suppressor p53, p21, and p16 gene therapy effects on glioblastoma tumorigenicity in situ. *Biochem Biophys Res Commun*, **2001**; 287: 173-80.
- Wang, W., Rastinejad, F., El-Deiry, W.S. Restoring p53-dependent tumor suppression. *Cancer Biol Ther.*, **2003**; 2(4 Suppl 1):S55-63.
- Wang, W., El-Deiry, W.S. Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr Opin Oncol.*, **2008**; 20(1):90-96.
- Wang, Q., Su, L., Liu, N., Zhang, L., Xu, W., Fang, H. Cyclin dependent kinase 1 inhibitors: a review of recent progress. *Curr Med Chem.*, **2011**; 18(13):2025-2043.
- Wang, Z., Hu, H., Li, G., Lee, H. J., Jiang, C., Kim, S. H., and Lu, J. Methylseleninic acid inhibits microvascular endothelial G1 cell cycle progression and decreases tumor microvessel density. *Int J Cancer* **122**, **2008**; 15-24.
- Whanger, P.D. Selenium and its relationship to cancer: an update dagger. *Br J Nutr*, **2004**; 91:11–28.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R.M., Adams, J.M., Huang, D.C. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, **2007**; 315(5813): 856-859.

- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. Cell death : The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **1980**; 68: 251-307.
- Wyllie, A.H., Golstein, P. More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2001**; 98(1):11-13.
- [www.aecc.es](http://www.aecc.es)
- [www.celldeath.de](http://www.celldeath.de)
- [www.cancerquest.org](http://www.cancerquest.org)
- [www.who.int/es](http://www.who.int/es)
- Yao, Y. et al. Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry*, **1996**; 35, 2767-2787.
- Youle, R.J., Strasser, A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2008**; 9 (1) 47–59.
- Yuan, J. Divergence from a dedicated cellular suicide mechanism: exploring the evolution of cell death. *Mol. Cell.*, **2006**; 23(1): 1-12.
- Zampieri, S. et al. Oxidative stress in NPC1 deficient cells: Protective effect of allopregnanolone. *J Cell Mol Med* , **2008**.
- Zeng, H., Combs, G.F. Jr. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J Nutr Biochem*, **2008**; 19:1–7.
- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H., Levine, A.J. Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.*, **2000**; 14:981–993.
- Zhivotovsky, B., Orrenius, S. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**; 331, 859–867.
- Zinkel, S., Gross, A., Yang, E. Bcl-2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.*, **2006**; 13:1351-1359.
- Zong, W.X., Thompson, C.B. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.*, **2006**; 20: 1-15.

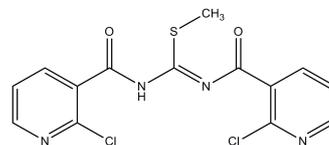
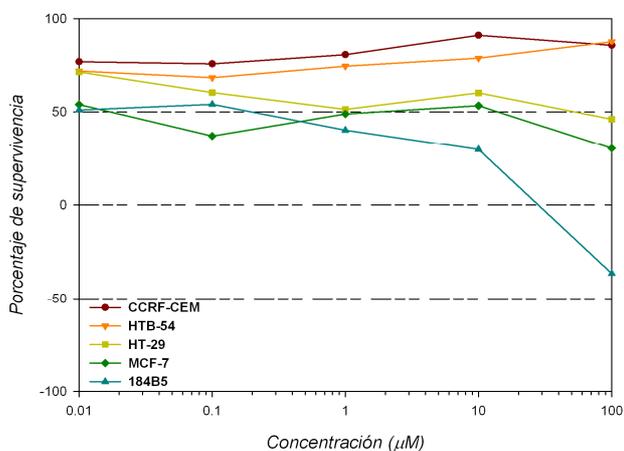


**ANEXO**



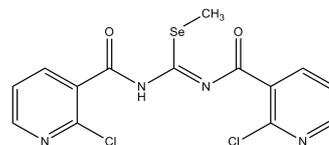
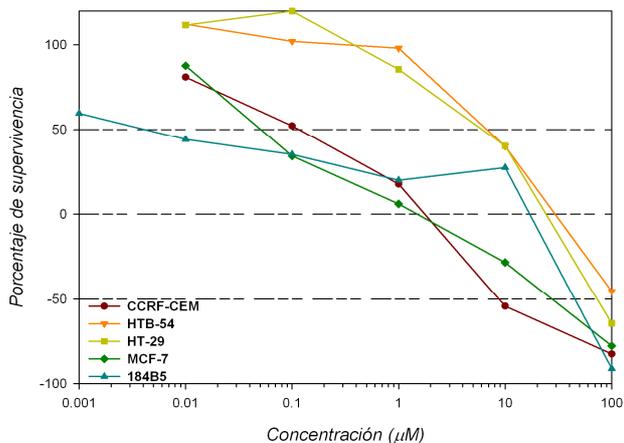
## CURVAS DOSIS-RESPUESTA

A continuación se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas para los derivados BSC (Figura 1 hasta Figura 12).



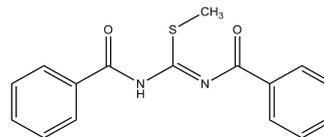
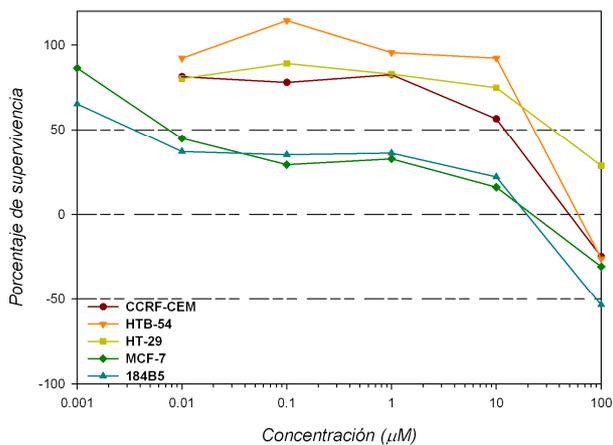
	LD <sub>50</sub> (μM)	TGI (μM)	GI <sub>50</sub> (μM)
CCRF-CEM	>100	>100	>100
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	>100	>100	75,30
MCF-7	>100	>100	23,29
184B5	>100	50,34	<b>0,37</b>

Figura 1. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3a.



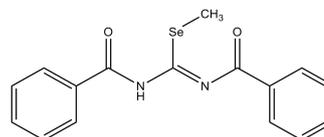
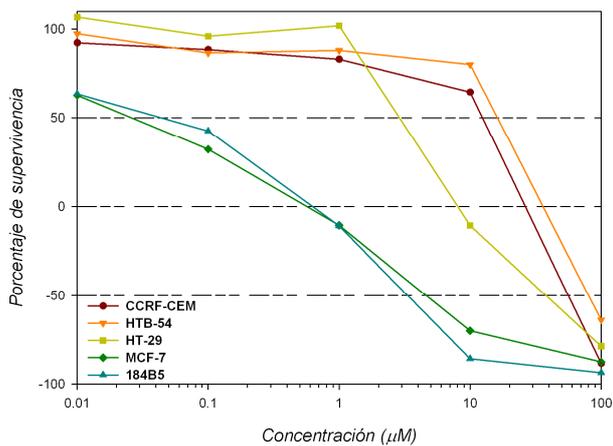
	LD <sub>50</sub> (μM)	TGI (μM)	GI <sub>50</sub> (μM)
CCRF-CEM	<b>9,47</b>	<b>3,22</b>	<b>0,16</b>
HTB-54	>100	45,22	<b>5,83</b>
HT-29	87,66	44,61	<b>8,06</b>
MCF-7	49,55	<b>2,59</b>	<b>0,07</b>
184B5	68,81	30,84	<b>0,007</b>

Figura 2. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3b.



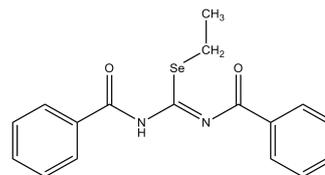
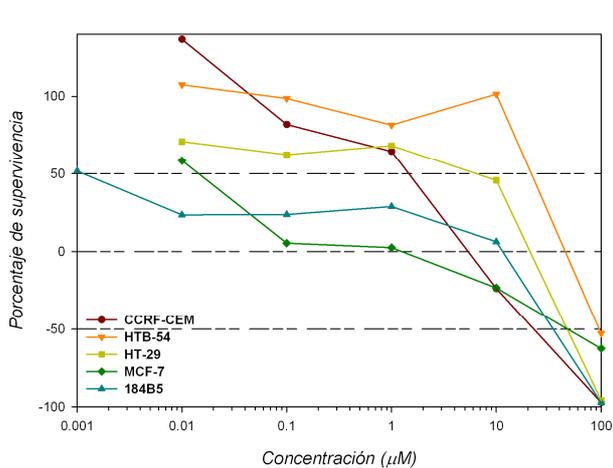
	LD <sub>50</sub> (μM)	TGI (μM)	GI <sub>50</sub> (μM)
CCRF-CEM	>100	72,60	17,14
HTB-54	>100	80,26	42,19
HT-29	>100	>100	58,35
MCF-7	>100	40,87	<b>0,009</b>
184B5	98,86	36,21	<b>0,006</b>

Figura 3. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3c.



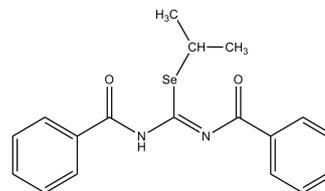
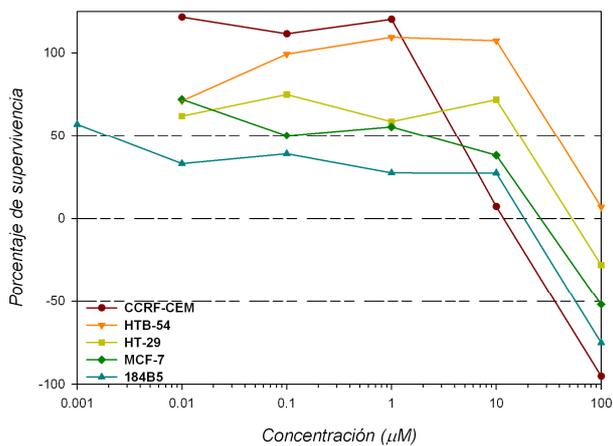
	LD <sub>50</sub> (μM)	TGI (μM)	GI <sub>50</sub> (μM)
CCRF-CEM	77,40	47,97	18,54
HTB-54	91,33	60,07	18,81
HT-29	62,03	<b>9,15</b>	<b>5,15</b>
MCF-7	<b>6,98</b>	<b>0,78</b>	<b>0,05</b>
184B5	<b>5,70</b>	<b>0,82</b>	<b>0,07</b>

Figura 4. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3d.



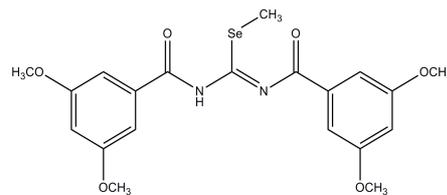
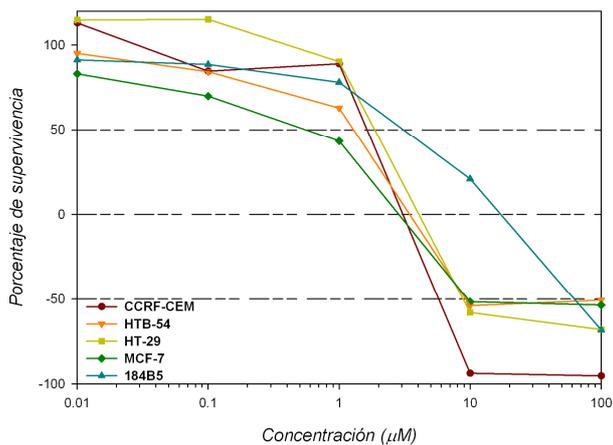
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	42,24	<b>7,59</b>	<b>2,48</b>
HTB-54	98,40	69,21	40,02
HT-29	70,81	30,03	<b>8,27</b>
MCF-7	71,34	<b>1,90</b>	<b>0,02</b>
184B5	58,84	15,47	<b>0,002</b>

Figura 5. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3e.



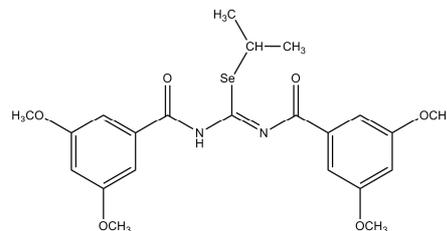
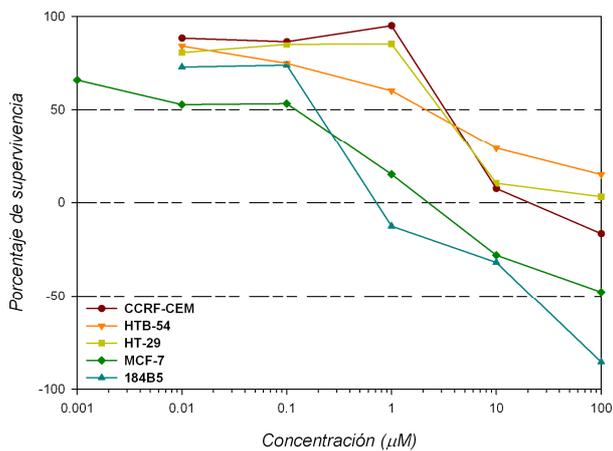
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	60,21	16,24	<b>0,37</b>
HTB-54	>100	>100	61,35
HT-29	>100	74,79	29,70
MCF-7	98,06	47,97	<b>3,77</b>
184B5	77,93	33,97	<b>0,004</b>

Figura 6. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3f.



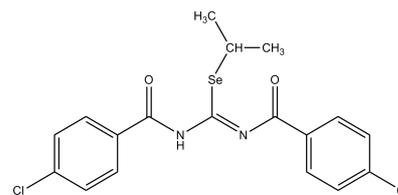
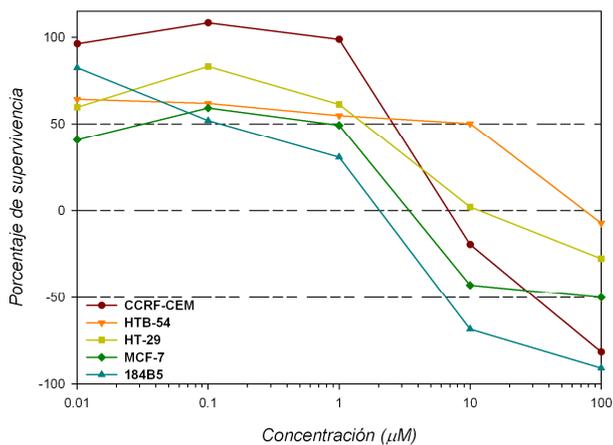
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	<b>7,85</b>	<b>5,38</b>	<b>2,92</b>
HTB-54	<b>9,70</b>	<b>5,85</b>	<b>1,99</b>
HT-29	<b>9,52</b>	<b>6,48</b>	<b>3,44</b>
MCF-7	<b>9,85</b>	<b>5,10</b>	<b>0,77</b>
184B5	81,58	<b>31,07</b>	<b>5,41</b>

Figura 7. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3g.



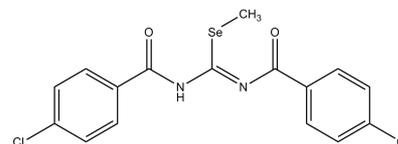
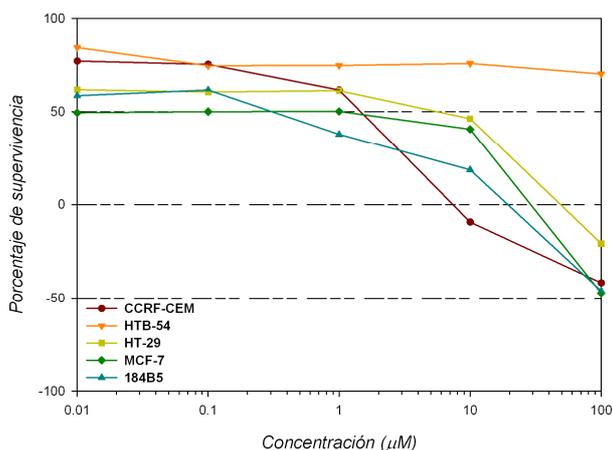
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	>100	38,12	<b>5,63</b>
HTB-54	>100	>100	<b>3,95</b>
HT-29	>100	>100	<b>5,24</b>
MCF-7	>100	<b>4,15</b>	<b>0,18</b>
184B5	40,43	<b>0,87</b>	<b>0,35</b>

Figura 8. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3h.



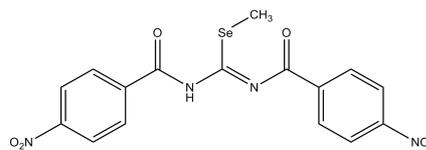
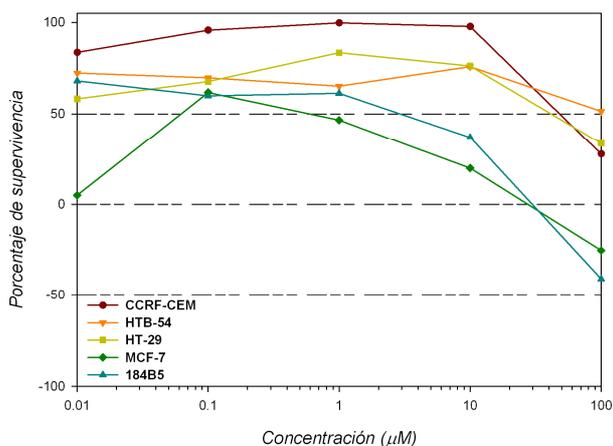
	LD <sub>50</sub> (μM)	TGI (μM)	GI <sub>50</sub> (μM)
CCRF-CEM	54,15	<b>8,51</b>	<b>4,71</b>
HTB-54	>100	88,62	10,26
HT-29	>100	16,71	<b>2,71</b>
MCF-7	99,31	<b>5,81</b>	<b>0,92</b>
184B5	<b>8,32</b>	<b>3,78</b>	<b>0,18</b>

Figura 9. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3j.



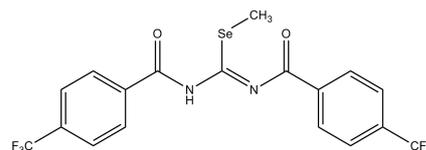
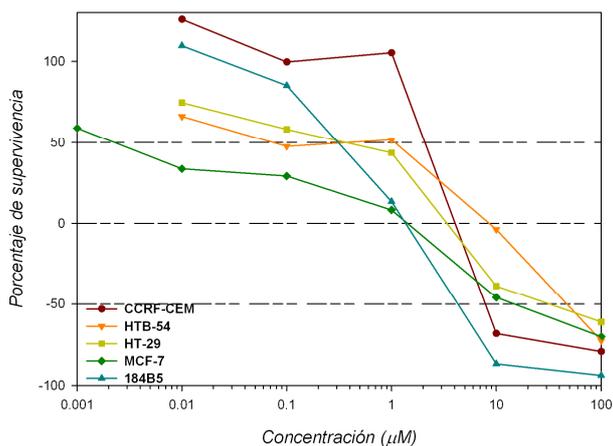
	LD <sub>50</sub> (μM)	TGI (μM)	GI <sub>50</sub> (μM)
CCRF-CEM	>100	<b>8,82</b>	<b>2,47</b>
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	>100	72,11	<b>7,72</b>
MCF-7	>100	51,61	<b>1,14</b>
184B5	>100	35,90	<b>0,54</b>

Figura 10. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3k.



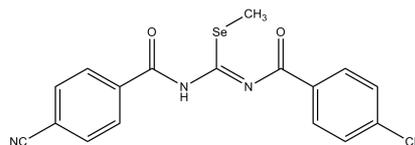
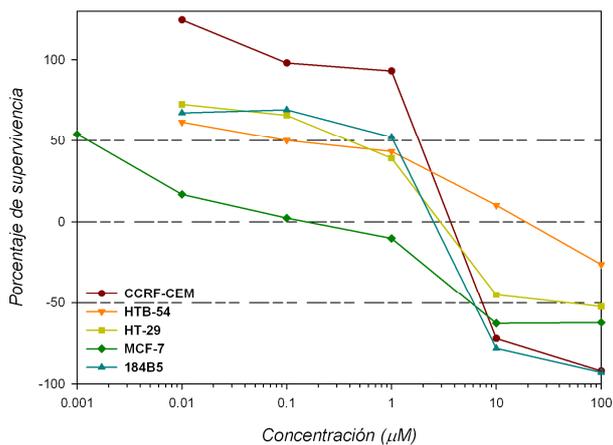
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	>100	>100	71,47
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	>100	>100	65,54
MCF-7	>100	49,70	<b>0,80</b>
184B5	>100	52,71	<b>5,19</b>

Figura 11. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3l.



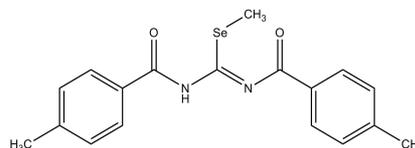
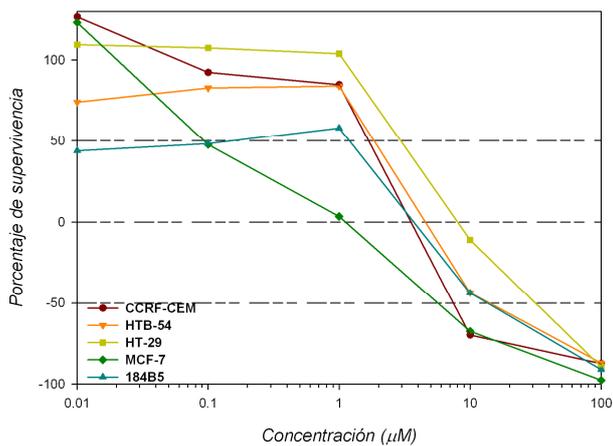
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	<b>9,06</b>	<b>6,46</b>	<b>3,87</b>
HTB-54	70,47	<b>9,39</b>	<b>1,29</b>
HT-29	55,40	<b>5,77</b>	<b>0,61</b>
MCF-7	25,26	<b>2,37</b>	<b>0,004</b>
184B5	<b>6,69</b>	<b>2,20</b>	<b>0,54</b>

Figura 12. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3m.



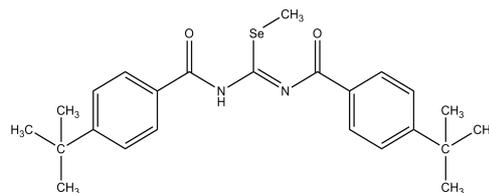
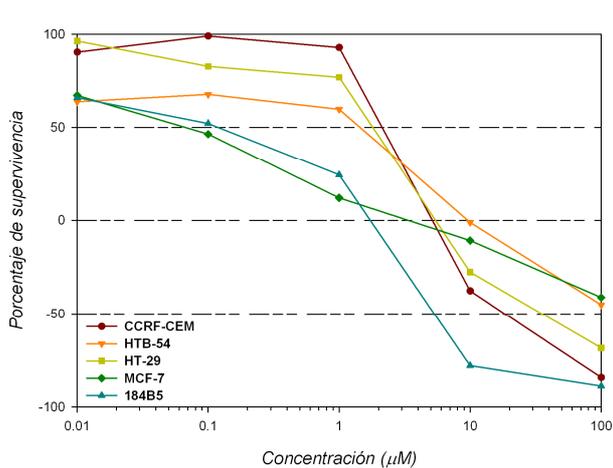
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	<b>8,80</b>	<b>6,07</b>	<b>3,35</b>
HTB-54	>100	64,40	<b>1,45</b>
HT-29	71,92	<b>5,18</b>	<b>0,63</b>
MCF-7	<b>7,83</b>	<b>0,27</b>	<b>0,002</b>
184B5	<b>8,06</b>	<b>4,60</b>	<b>1,15</b>

Figura 13. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3n.



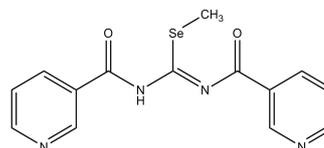
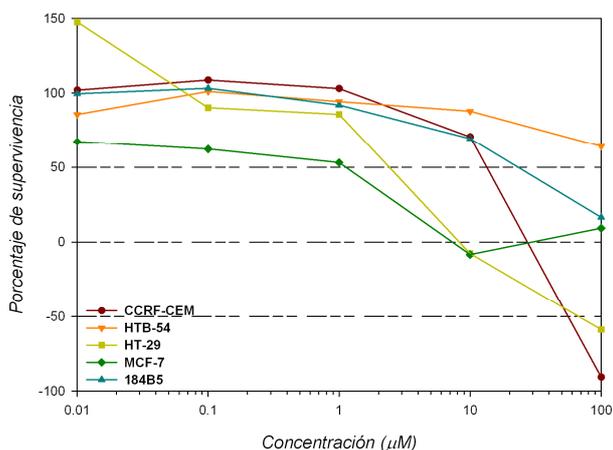
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	<b>8,85</b>	<b>5,94</b>	<b>3,03</b>
HTB-54	23,43	<b>6,93</b>	<b>3,40</b>
HT-29	54,82	<b>9,14</b>	<b>5,23</b>
MCF-7	<b>7,79</b>	<b>1,44</b>	<b>0,10</b>
184B5	21,99	<b>6,13</b>	<b>1,70</b>

Figura 14. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3p.



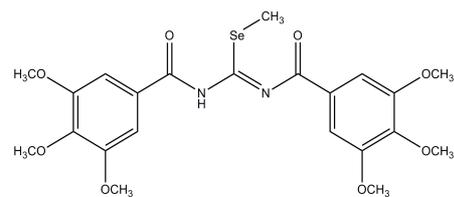
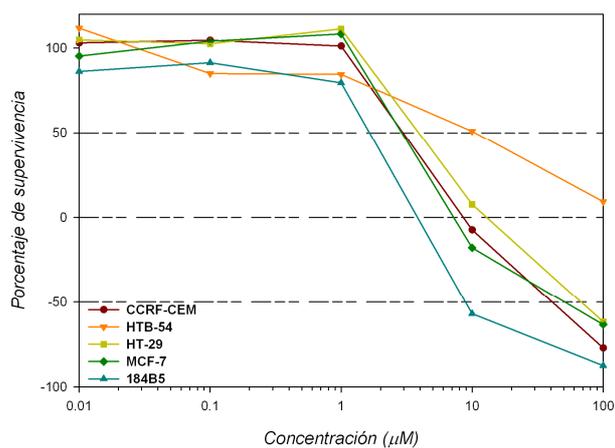
	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	10,86	<b>7,41</b>	<b>3,96</b>
HTB-54	>100	<b>9,84</b>	<b>2,44</b>
HT-29	59,51	<b>7,63</b>	<b>3,32</b>
MCF-7	>100	<b>5,76</b>	<b>0,08</b>
184B5	<b>7,54</b>	<b>3,14</b>	<b>0,17</b>

Figura 15. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3q.



	LD <sub>50</sub> (µM)	TGI (µM)	GI <sub>50</sub> (µM)
CCRF-CEM	77,27	49,34	21,40
HTB-54	>100	>100	>100
HT-29	84,54	<b>9,26</b>	<b>4,44</b>
MCF-7	>100	<b>8,79</b>	<b>1,45</b>
184B5	>100	>100	42,82

Figura 16. Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3r.



	<b>LD<sub>50</sub></b> <b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>TGI</b> <b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>GI<sub>50</sub></b> <b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>
<i>CCRF-CEM</i>	65,09	<b>9,40</b>	<b>5,25</b>
<i>HTB-54</i>	>100	>100	11,84
<i>HT-29</i>	84,97	20,01	<b>6,33</b>
<i>MCF-7</i>	24,92	<b>6,43</b>	<b>2,44</b>
<i>184B5</i>	<b>9,55</b>	<b>6,25</b>	<b>2,95</b>

**Figura 17.** Curvas dosis-respuesta para el compuesto 3s

**Tabla 1. Apoptosis inducida por los derivados BSC, 3b, 3g, 3n y 3p en CCRF-CEM y MCF-7.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos realizados por duplicado. Las células subdiploides se consideran apoptóticas. \*\* ( $p < 0,001$ ) respecto al control en todos los casos.

Concentración	CCRF-CEM	MCF-7
Control	6,36 $\pm$ 0,61	3,12 $\pm$ 2,17
Camptotecina	92,71** $\pm$ 4,06	53,3** $\pm$ 23,83
3b	27,20** $\pm$ 8,21	44,43** $\pm$ 4,91
3g	42,75** $\pm$ 9,24	54,19** $\pm$ 14,42
3n	26,85** $\pm$ 4,95	35,18** $\pm$ 14,08
3p	23,70** $\pm$ 5,28	35,83** $\pm$ 8,90

**Tabla 2. Porcentaje de células apoptóticas a diferentes tiempos a una concentración de 25 $\mu$ M.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) respecto al control en todos los casos. Se ha empleado la camptotecina como control positivo.

Tiempo	4h	12h	24h	72h
Control	7,11 $\pm$ 2,27	6,17 $\pm$ 1,36	6,01 $\pm$ 1,36	9,53 $\pm$ 2,12
Camptotecina	8,51 $\pm$ 2,02	9,39 $\pm$ 6,03	25,03** $\pm$ 19,36	68,61** $\pm$ 13,40
3g	12,28 $\pm$ 7,59	23,35** $\pm$ 9,27	35,71** $\pm$ 14,44	76,78** $\pm$ 8,09
3n	8,74 $\pm$ 1,20	22,53** $\pm$ 12,75	31,66** $\pm$ 12,43	61,06** $\pm$ 9,69

**Tabla 3. Porcentaje de células apoptóticas a diferentes concentraciones durante 24 horas.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* ( $p < 0,01$ ), \* ( $p < 0,05$ ) respecto al control en todos los casos. Se ha empleado la camptotecina como control positivo.

Concentración	3g	3n
Control	4,71 $\pm$ 2,68	4,71 $\pm$ 2,68
Camptotecina	25,03** $\pm$ 9,43	25,03** $\pm$ 9,43
5 $\mu$ M	6,09 $\pm$ 0,48	10,91* $\pm$ 1,01
15 $\mu$ M	17,56** $\pm$ 7,49	19,96** $\pm$ 5,88
25 $\mu$ M	35,71** $\pm$ 14,44	31,66** $\pm$ 12,43
35 $\mu$ M	25,15** $\pm$ 6,31	30,41** $\pm$ 10,95

**Tabla 4. Disipación de  $\Delta\Psi_m$  en células MCF-7 inducida por los derivados 3g y 3n.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* ( $p<0,01$ ), \* ( $p<0,05$ ) respecto al control en todos los casos. Se ha empleado la valinomicina como control positivo.

Tiempo	4h	12h	24h	72h
<b>Control</b>	0,564 $\pm$ 0,078	0,565 $\pm$ 0,082	0,528 $\pm$ 0,102	0,502 $\pm$ 0,142
<b>Valinomicina</b>	0,919** $\pm$ 0,175	0,820** $\pm$ 0,119	0,707* $\pm$ 0,163	0,836** $\pm$ 0,178
<b>3g</b>	0,822** $\pm$ 0,164	0,483 $\pm$ 0,076	0,477 $\pm$ 0,095	0,372 $\pm$ 0,045
<b>3n</b>	0,645 $\pm$ 0,133	0,472 $\pm$ 0,113	0,413 $\pm$ 0,138	0,382 $\pm$ 0,018

**Tabla 5. Resultados de los niveles de ROS en MCF-7.** Los resultados de fluorescencia debida al fluorocromo CM-H<sub>2</sub>DCFDA son expresados en tanto por 1 respecto al control. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* ( $p<0,01$ ), \* ( $p<0,05$ ) respecto al control en todos los casos.

Tiempo	4h	12h	24h	48h	72h
<b>Control</b>	1,000 $\pm$ 0,03	1,000 $\pm$ 0,10	1,000 $\pm$ 0,01	1,000 $\pm$ 0,02	1,000 $\pm$ 0,02
<b>3g</b>	0,968 $\pm$ 0,07	1,176 $\pm$ 0,14	1,749** $\pm$ 0,17	1,355* $\pm$ 0,45	1,399** $\pm$ 0,11
<b>3n</b>	0,861 $\pm$ 0,13	0,941 $\pm$ 0,31	1,510** $\pm$ 0,17	1,167** $\pm$ 0,37	1,210 $\pm$ 0,23

**Tabla 6. Efecto de los derivados BSC, 3g y 3n, en la expresión de las caspasas -2, -3, -8 y -9.** Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* ( $p<0,01$ ), \* ( $p<0,05$ ) respecto al control en todos los casos

Caspasas	4h			12h			24h		
	Control	3g	3n	Control	3g	3n	Control	3g	3n
<b>-2</b>	1,00 $\pm$ 0,09	1,08 $\pm$ 0,32	1,09 $\pm$ 0,18	1,00 $\pm$ 0,09	1,27* $\pm$ 0,16	1,16 $\pm$ 0,32	1,00 $\pm$ 0,07	1,61* $\pm$ 0,59	1,62* $\pm$ 0,28
<b>-3/-7</b>	1,00 $\pm$ 0,16	1,03 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,16	0,97 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,11	1,00 $\pm$ 0,11	1,03 $\pm$ 0,09	1,03 $\pm$ 0,07
<b>-8</b>	1,00 $\pm$ 0,03	0,99 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,05	1,00 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,09	1,13* $\pm$ 0,14
<b>-9</b>	1,00 $\pm$ 0,14	1,03 $\pm$ 0,22	1,12 $\pm$ 0,24	1,00 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,18	1,07 $\pm$ 0,12	1,00 $\pm$ 0,06	1,02 $\pm$ 0,18	1,13 $\pm$ 0,10

**Tabla 7. Efecto del inhibidor general z-VAD-fmk en las células MCF-7 tratadas con los derivados BSC 3g y 3n durante 24 horas.** Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. \*\* ( $p<0,01$ ), \* ( $p<0,05$ ) respecto al control en todos los casos.

Control	3g	3g+z-VAD-fmk	3n	3n+z-VAD-fmk
9,11 $\pm$ 3,53	32,66 $\pm$ 4,64	33,10 $\pm$ 6,23	28,65 $\pm$ 4,06	26,67 $\pm$ 4,95

**Tabla 8. Efecto de los derivados BSC 3g y 3n en la progresión del ciclo celular.** Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. La camptotecina (25  $\mu$ M) ha sido empleada como control positivo. \*\* (p<0,01), \*(p<0,05) respecto al control en todos los casos.

Fases del Ciclo Celular	4h		12h		24h		72h	
	Control	Camptotecina	Control	Camptotecina	Control	Camptotecina	Control	Camptotecina
SubG <sub>1</sub>	2,48 $\pm$ 0,95	2,86 $\pm$ 1,12	3,02 $\pm$ 1,85	3,03 $\pm$ 2,68	4,43 $\pm$ 1,47	17,15** $\pm$ 1,33	3,64 $\pm$ 0,78	35,10** $\pm$ 2,68
G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	65,99 $\pm$ 4,15	68,74 $\pm$ 2,79	59,03 $\pm$ 6,43	61,46 $\pm$ 7,59	56,6 $\pm$ 1,90	57,91 $\pm$ 3,77	56,38 $\pm$ 2,47	35,35** $\pm$ 4,30
S	12,44 $\pm$ 4,14	11,14 $\pm$ 3,54	15,28 $\pm$ 3,02	22,35 $\pm$ 1,71	10,22 $\pm$ 3,58	11,50 $\pm$ 1,80	15,33 $\pm$ 1,17	11,89 $\pm$ 1,64
G2/M	12,73 $\pm$ 0,88	12,01 $\pm$ 3,54	18,10 $\pm$ 4,91	12,58 $\pm$ 4,65	12,25 $\pm$ 4,00	11,28 $\pm$ 2,14	15,37 $\pm$ 2,73	18,23 $\pm$ 1,48

Fases del Ciclo Celular	4h		12h		24h		72h	
	Control	3g	Control	3g	Control	3g	Control	3g
SubG <sub>1</sub>	2,48 $\pm$ 0,95	3,49 $\pm$ 0,77	3,02 $\pm$ 1,85	8,44* $\pm$ 4,10	4,43 $\pm$ 1,47	20,66** $\pm$ 2,24	3,64 $\pm$ 0,78	34,41** $\pm$ 9,72
G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	65,99 $\pm$ 4,15	66,06 $\pm$ 8,42	59,03 $\pm$ 6,43	45,69** $\pm$ 3,72	56,6 $\pm$ 1,90	43,13** $\pm$ 3,45	56,38 $\pm$ 2,47	38,04** $\pm$ 5,82
S	12,44 $\pm$ 4,14	9,76 $\pm$ 1,85	15,28 $\pm$ 3,02	18,85 $\pm$ 1,47	10,22 $\pm$ 3,58	14,89 $\pm$ 3,57	15,33 $\pm$ 1,17	14,84 $\pm$ 3,63
G2/M	12,73 $\pm$ 0,88	15,54 $\pm$ 2,84	18,10 $\pm$ 4,91	23,95* $\pm$ 1,83	12,25 $\pm$ 4,00	22,50** $\pm$ 5,37	15,37 $\pm$ 2,73	18,18* $\pm$ 1,45

Fases del Ciclo Celular	4h		12h		24h		72h	
	Control	3n	Control	3n	Control	3n	Control	3n
SubG <sub>1</sub>	2,48 $\pm$ 0,95	3,65 $\pm$ 1,65	3,02 $\pm$ 1,85	16,56* $\pm$ 18,1	4,43 $\pm$ 1,47	10,79* $\pm$ 2,01	3,64 $\pm$ 0,78	24,33** $\pm$ 6,52
G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	65,99 $\pm$ 4,15	66,01 $\pm$ 5,25	59,03 $\pm$ 6,43	42,03** $\pm$ 9,70	56,6 $\pm$ 1,90	43,26** $\pm$ 5,22	56,38 $\pm$ 2,47	47,56** $\pm$ 4,34
S	12,44 $\pm$ 4,14	11,26 $\pm$ 2,67	15,28 $\pm$ 3,02	14,07 $\pm$ 2,92	10,22 $\pm$ 3,58	14,85 $\pm$ 1,24	15,33 $\pm$ 1,17	12,66 $\pm$ 3,27
G2/M	12,73 $\pm$ 0,88	12,88 $\pm$ 1,16	18,10 $\pm$ 4,91	22,77* $\pm$ 0,82	12,25 $\pm$ 4,00	28,09** $\pm$ 4,25	15,37 $\pm$ 2,73	16,86 $\pm$ 1,48

**Tabla 9. Efecto de los derivados BSC 3g y 3n sobre la expresión de las proteínas: Bcl-2, Bid, Cdk1, Cdk2, ciclina A, ciclina B1, p21<sup>CIP</sup>, p53 y Chk2.** Análisis por western-blot e inmunofluorescencia indirecta. **(A)** Los resultados obtenidos mediante la técnica Western-blot están expresados como el nivel de proteína respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. Los resultados están expresados como el nivel de proteína respecto al control. **(B)** Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes por triplicado. \*\* ( $p < 0,01$ ) respecto al control en todos los casos.

**(A)**

Bcl-2	24h	48h
control	1,000 $\pm$ 0,005	1,000 $\pm$ 0,007
3g	0,836 $\pm$ 0,009	0,812** $\pm$ 0,026
3n	0,985 $\pm$ 0,053	1,694** $\pm$ 0,007
camptotecina	0,237** $\pm$ 0,011	0,493** $\pm$ 0,037

**(B)**

Bcl-2	24h
control	1,000 $\pm$ 0,059
3g	0,812** $\pm$ 0,111
3n	0,712** $\pm$ 0,097
camptotecina	--

**(A)**

Bid	24h	48h
control	1,000 $\pm$ 0,027	1,000 $\pm$ 0,049
3g	0,743* $\pm$ 0,012	0,935 $\pm$ 0,011
3n	0,901 $\pm$ 0,042	1,108 $\pm$ 0,011
camptotecina	1,036 $\pm$ 0,053	0,935 $\pm$ 0,012

**(B)**

Bid	24h
control	1,000 $\pm$ 0,107
3g	0,578* $\pm$ 0,144
3n	0,406** $\pm$ 0,168
camptotecina	--

**(A)**

Cdk1	24h	48h
control	1,000 $\pm$ 0,052	1,000 $\pm$ 0,135
3g	0,713** $\pm$ 0,069	0,875 $\pm$ 0,073
3n	0,700** $\pm$ 0,125	1,272 $\pm$ 0,008
camptotecina	0,769 $\pm$ 0,031	0,226** $\pm$ 0,000

**(B)**

Cdk1	24h
control	1,000 $\pm$ 0,256
3g	0,666** $\pm$ 0,196
3n	0,380** $\pm$ 0,146
camptotecina	--

(A)

Cdk2	24h	48h
<b>control</b>	1,000±0,020	1,000±0,018
<b>3g</b>	0,808±0,006	0,984±0,031
<b>3n</b>	0,649**±0,044	0,963±0,009
<b>camptotecina</b>	0,926±0,041	0,391**±0,007

(B)

Cdk2	24h
<b>control</b>	1,000±0,039
<b>3g</b>	0,735**±0,073
<b>3n</b>	0,767**±0,080
<b>camptotecina</b>	--

(A)

Ciclina A	24h	48h
<b>control</b>	1,000±0,012	1,000±0,028
<b>3g</b>	0,936±0,011	1,608±0,005
<b>3n</b>	1,030±0,011	1,310±0,058
<b>camptotecina</b>	1,376±0,018	2,297**±0,092

(B)

Ciclina A	24h
<b>control</b>	1,000±0,190
<b>3g</b>	1,118±0,188
<b>3n</b>	1,018±0,160
<b>camptotecina</b>	--

(A)

Ciclina B1	24h	48h
<b>control</b>	1,000±0,025	1,000±0,053
<b>3g</b>	1,011±0,040	1,042±0,048
<b>3n</b>	0,914±0,034	1,014±0,125
<b>camptotecina</b>	1,185±0,008	0,136**±0,035

(B)

Ciclina B1	24h
<b>control</b>	1,000±0,197
<b>3g</b>	1,118±0,188
<b>3n</b>	1,018±0,160
<b>camptotecina</b>	--

(A)

P21	24h	48h
<b>control</b>	1,000±0,032	1,000±0,001
<b>3g</b>	0,532**±0,003	0,936±0,070
<b>3n</b>	0,980±0,010	0,987±0,058
<b>camptotecina</b>	0,960±0,019	0,077**±0,008

(B)

P21	24h
<b>control</b>	1,000±0,092
<b>3g</b>	0,749**±0,207
<b>3n</b>	0,726**±0,110
<b>camptotecina</b>	--

(A)

P53	24h	48h
<b>control</b>	1,000±0,030	1,000±0,073
<b>3g</b>	1,105±0,071	1,364±0,034
<b>3n</b>	1,063±0,122	0,934±0,003
<b>camptotecina</b>	0,559**±0,033	0,543**±0,001

(B)

P53	24h
<b>control</b>	1,000±0,165
<b>3g</b>	0,982±0,207
<b>3n</b>	0,855±0,181
<b>camptotecina</b>	--

(A)

Chk2	24h	48h
<b>control</b>	1,000±0,013	1,000±0,035
<b>3g</b>	0,719**±0,000	1,279**±0,108
<b>3n</b>	0,897*±0,005	1,853**±0,005
<b>camptotecina</b>	0,636**±0,007	0,272**±0,007

(B)

Chk2	24h
<b>control</b>	1,000±0,190
<b>3g</b>	0,983±0,130
<b>3n</b>	0,639**±1,181
<b>camptotecina</b>	--