



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO **POSGRADO**

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

*MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DE  
LA CUMARINA (A/AA) EN UNA LÍNEA  
CELULAR DE CÁNCER CÉRVICO-UTERINO  
(HeLa)*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

BIÓL. CAROLINA ÁLVAREZ DELGADO

TUTOR: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES



2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

*Sin algún orden particular y honrando al caos, quisiera agradecer a los siguientes personajes, cuya ayuda, de alguna manera, está inmersa en los caracteres escondidos de este trabajo.*

Mi mamá, por llevarme de la mano y soltarme cuando fue necesario... por estar siempre cerca. Mi papá, por ser el científico *honoris causa* que me enseñó a cuestionarme todo.

A mi hermano, por la música de los primeros años.

A mi familia, por las estancias agradables.

Al equipo *c* (w, m, n, t, l, p y d +a). A todos, particularmente a *p*, porque tu música siempre fue un buen soundtrack; pero particularmente a *d*, por hablar al mismo tiempo que yo. Por hablar de mitocondrias cuando no debíamos...

A mis amigas de lejos, Amanda y Lucrecia.

Y a mis amigos de lejos que vinieron cerca, jpk y ale, por traerse el mar entre los pies. A ingrito, -c- y moño, por las piyamas perpetuas.

Al Dr. Mauricio, M.C. José, Tania, Noemí, Nacho, Gaby y *los alumnitos*. A los *químicos teóricos*, por el café, los aventones y las moléculas en tercera dimensión.

Al complejo Natty-Luciano, por hacer del laboratorio un lugar agradable, por reírse conmigo. Por su humor absurdo y las discusiones interminables sin sentido, por las algarabías y las historietas. Y, claro, por la ciencia, ¡viva la ciencia!

A Luciano, por la música de fondo en el labo. Por cuestionarme todo. Y por los miles de etcéteras que faltan, gracias de nuevo. To.

De manera especial quisiera agradecer al Dr. Marco Cerbón, por permitirme trabajar en su laboratorio y adoptarme cuando lo necesitaba. A la Dra. Adriana Mendoza, por sus sugerencias y observaciones técnicas. Por su paciente ayuda al editar mi artículo.

A los revisores de esta tesis: Dr. García-Carrancá, Dra. Lizano, Dr. Zenteno, Dr. Hernández y Dra. Ibarra, por tomarse el tiempo de hacerme correcciones y observaciones pertinentes.

A la Dra. Quintero, por aceptarme como su alumna y dirigir la primera parte de esta tesis. A la Dra. Elizabet Estrada, por sus consejos y observaciones.

# ÍNDICE

Resumen	1
I. Antecedentes	2-28
1. Cáncer	
1.1 Definición y clasificación del cáncer	2-3
1.2 Impacto y estimaciones del cáncer a nivel mundial	3-4
1.3 Tratamientos antitumorales	4-6
1.4 Fármacos antitumorales y mecanismo de acción	6-8
1.5 Cáncer y ciclo celular	8-13
1.6 Cáncer y muerte celular	13-23
1.7 Cumarinas	23-28
II. Justificación	29
III. Hipótesis	29
IV. Objetivos	30
V. Material y métodos	31-40
5.1 Cultivo celular y líneas celulares	31-32
5.2 Ensayos de citotoxicidad (IC <sub>50</sub> )	32-33
5.3 Determinación de la fragmentación del ADN	33-35
5.4 Evaluación de la morfología celular	35
5.5 Análisis de la distribución del ciclo celular	36
5.6 Análisis de la expresión de proteínas	37-38
5.7 Fraccionamiento subcelular	38-40
5.8 Análisis estadístico	40
VI. Resultados	41-53
6.1 Actividad citotóxica de la cumarina A/AA	41-42
6.2 Efecto de la cumarina A/AA en linfocitos normales	43
6.3 Efecto de la cumarina A/AA en la morfología celular	44-45
6.4 Efecto sobre la fragmentación del ADN	46-47
6.5 Efecto sobre la distribución del ciclo celular	48-50
6.6 Efecto en la expresión de proteínas	51-53
VII. Discusión	54-60
VIII. Conclusión	61
IX. Perspectivas	62
X. Referencias	63-72
ANEXOS	73-75

## Resumen

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. La búsqueda de nuevos compuestos antitumorales con mayor actividad citotóxica y selectividad es una de las principales aproximaciones para su tratamiento. Actualmente se conocen varios compuestos naturales con propiedades antineoplásicas. Entre éstos se encuentran las cumarinas, que son metabolitos secundarios de plantas superiores. Anteriormente se ha comprobado que las cumarinas tienen actividad citotóxica en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Esta última propiedad se ha comenzado a aprovechar en modelos de tratamiento antitumoral, ya que también se ha demostrado que algunos derivados de las cumarinas son selectivamente citotóxicos y tienen menor actividad en células normales. Más recientemente se ha descubierto que ciertas cumarinas inducen muerte celular programada y que ésta característica se puede explotar en el tratamiento del cáncer.

En este estudio se analizó el efecto citotóxico de una cumarina natural (cumarina A/AA) extraída de las cáscaras del fruto del árbol *Mammea americana*. El estudio de esta cumarina es importante ya que no existen reportes previos en los que se describa su mecanismo antitumoral.

Utilizando la técnica de MTT se comprobó que la cumarina A/AA es citotóxica en dos líneas de cáncer cérvico-uterino (HeLa y Calo) y dos líneas de cáncer colorectal (SW-480 y SW-620). Se realizaron experimentos posteriores en la línea celular HeLa. Mediante citometría de flujo se encontró que la cumarina A/AA activa un programa de muerte celular programada que no implica arrestos en el ciclo celular. Esta misma técnica reveló que había un aumento en la fase subdiploide (ADN fragmentado) de las células HeLa tratadas con la cumarina A/AA. Este resultado fue validado por la técnica de TUNEL con la cual se obtuvieron resultados que apoyan al anterior. Adicionalmente se llevaron a cabo experimentos de Western Blot para estudiar los cambios de expresión de proteínas que participan en los programas de muerte celular (Bax, Bcl-2, caspasa-3, AIF, entre otras). Con esto se comprobó que AIF, una proteína proapoptótica del espacio intermembranal de la mitocondria, es liberada al citoplasma de células HeLa tratadas con cumarina A/AA. En este modelo, AIF actúa de manera caspasa-independiente y funciona como un efector temprano de muerte celular.

## I. Antecedentes

### 1. Cáncer.

#### 1.1. Definición y clasificación

El cáncer se puede definir como un conjunto de enfermedades en las que la división celular es anormal y procede en condiciones no ideales. La característica principal del cáncer es que se pierde la armonía entre la proliferación y la muerte celular. El cáncer se origina en un *sitio primario* y desde éste puede invadir otros tejidos por medio de la sangre o la linfa a través de un proceso llamado *metástasis* (Holland, *et al.* 2003). Cuando la invasión es vía linfática las células tumorales permanecen en los nódulos linfáticos, usualmente aquéllos que se encuentran cerca del sitio primario. Cuando la metástasis es vía sanguínea el cáncer tiene un mayor alcance y pueden originarse tumores *secundarios* o de metástasis en cualquier parte del cuerpo. El cáncer se nombra por el sitio de origen primario y se continúa llamando igual aún cuando ha formado metástasis

Dependiendo de dónde se origine, el cáncer puede ser clasificado como:

- a) *Carcinoma*, si se deriva de tejido epitelial.
- b) *Sarcoma*, si se origina en tejidos conectivos o de soporte (hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, nervios). Los sarcomas se dividen a su vez en *sarcoma de tejido blando* (liposarcoma, fibrosarcoma, dermatofibrosarcoma protuberante, histiocitoma fibroso maligno, tumores sinoviales o tendo-sinoviales, sarcoma epiteloide, rabdomiosarcoma, leiomiosarcoma) y *sarcoma óseo* (osteosarcoma, condrosarcoma).
- c) *Mieloma*, si comienza en células del plasma.
- d) *Linfoma*, si se origina en células del sistema inmune. Se subdivide en *linfoma de Hodgkin* y *linfoma no-Hodgkin*, por la presencia o ausencia de un tipo de células (células de Reed-Sternberg).
- e) *Leucemia*, si se origina en tejidos hematopoyéticos como la médula ósea.

Dentro de estos tipos de cáncer se subclasifican muchas otras formas de la enfermedad dependiendo específicamente del órgano donde se origina y el tipo de células involucradas.

## **1.2 Impacto y estimaciones del cáncer a nivel mundial.**

El cáncer es una enfermedad que a nivel mundial causa casi 6 millones de muertes anuales. Las estimaciones de incidencia, mortalidad y prevalencia del cáncer para el año 2002 cambiaron poco desde el año 2000, sin embargo éstas siguen aumentando para varios países, sobre todo para los aquéllos subdesarrollados, a diferencia de naciones desarrolladas como Estados Unidos donde se ha reportado un decremento del 0.5% en la incidencia general del cáncer de 1991 a 2001 y un decremento de 1.1% en la mortalidad de 1993 a 2001 (Reporte Anual a la Nación de la Sociedad Americana del Cáncer en el Centro para la Prevención y Control de enfermedades del Instituto Nacional de Cáncer, EE.UU.).

A nivel mundial, se han reportado 10.9 millones de casos de cáncer nuevos, 6.7 millones de muertes y 24.6 millones de personas viviendo con la enfermedad hasta el año 2002. De éstos, el cáncer de pulmón representa 1.35 millones (12.4%) de todos los diagnósticos efectuados y 1.18 (17.6%) millones de las muertes totales a nivel mundial por esta enfermedad, seguido por el cáncer de estómago e hígado (Parkin, D., *et al.* 2002).

En los países en vías de desarrollo los cánceres más comunes son el de hígado, esófago y estómago. En países desarrollados los cánceres más comunes son los de colon, recto, mama y próstata, que se pueden detectar fácilmente en etapas tempranas. Además, en países desarrollados la supervivencia es mayor que en países en vías de desarrollo por el acceso a la prognosis y tratamiento oportunos. Respecto a la distribución por sexos, la tasa de mortalidad para hombres es 15 veces más alta que para mujeres debido a que los cánceres más letales (hígado, pulmón, estómago y esófago) son más comunes en hombres (Parkin., *et al.*, 2002).



En México, uno de los cánceres más letales es el de cáncer cérvico-uterino. De hecho, este cáncer constituye la primera causa de muerte en mujeres mexicanas (Lizano, M *et al.* 1997).

### **1.3 Tratamientos antitumorales**

Entre los métodos utilizados para tratar el cáncer se encuentran la cirugía, quimioterapia, radiación, inhibición de la angiogénesis, terapia génica, radioterapia, el trasplante de médula ósea y la terapia biológica.

#### **1.3.1. Cirugía**

La cirugía fue el primer tipo de tratamiento utilizado para combatir el cáncer y hasta la fecha sigue siendo la opción más utilizada para remover tumores sólidos de la cabeza, cuello, pecho et. al.on. Generalmente se utiliza para tratar el cáncer que no ha formado metástasis pero también se puede aplicar para eliminar el cáncer que ha pasado a otras partes del cuerpo. Al remover el tumor también se eliminan partes del tejido circundante, como nódulos linfáticos y vasos sanguíneos, para asegurar que todo el tejido afectado ha sido extraído.

#### **1.3.2. Terapia biológica o inmunoterapia**

El sistema inmune es responsable de eliminar antígenos y puede determinar la diferencia entre células normales y malignas además de eliminar a éstas últimas. La terapia biológica se utiliza para estimular al sistema inmune directa o indirectamente por medio de varios métodos. Algunos de estos métodos se basan en hacer a las células tumorales más accesibles para el sistema inmune, aumentando su susceptibilidad; aumentar la capacidad de las células del sistema inmune; cambiar el patrón característico de crecimiento de las células tumorales haciéndolas más parecidas a las células normales; detener el proceso por el cual una célula normal se transforma y prevenir la metástasis.

### **1.3.3. Radiación**

La radiación utiliza ciertas longitudes de onda para eliminar las células malignas. Esta técnica se puede utilizar a varios niveles para destruir a las células transformadas o para prevenir que las células normales o malignas proliferen y formen tumores.

a)

### **1.3.4. Terapia génica**

La terapia génica se basa en la corrección de los defectos moleculares en las células tumorales. Este tipo de terapia se caracteriza por un alto valor terapéutico y baja toxicidad ya que está dirigida a blancos moleculares específicos sólo en células malignas. El tratamiento se basa en la inserción de ciertos genes dirigidos a los sitios afectados del genoma utilizando vectores virales. Los genes insertados pueden expresar algún tipo de proteína que pueda ser detectada por fármacos antivirales muy funcionales, de esta forma las células tumorales quedan marcadas y son destruidas por los fármacos correspondientes. Los blancos más comunes son p53 y E2F-1 (inductores de apoptosis), p16 y Rb (inhibidores de la progresión del ciclo celular) (Holland y Frei, 2003).

### **1.3.5. Quimioterapia.**

Los estudios de quimioterapia datan desde la década de 1940. Sin embargo, a pesar de casi 60 años de investigación dirigida a este tipo de terapia, la elucidación del mecanismo molecular de los fármacos antitumorales, sus alcances y repercusiones, siguen siendo ampliamente investigados dado el alcance y potencial terapéutico que representan.

La quimioterapia consiste en el tratamiento de las células malignas con fármacos que pueden frenar su proliferación o destruirlas. Esta aproximación al tratamiento del cáncer ha sido utilizada por muchos años y es una de las alternativas más usadas, no sólo como tratamiento único, sino en combinación con la terapia biológica, la radiación o la

cirugía. Los tratamientos quimioterapéuticos se pueden administrar de forma oral, inyectada, tópicamente o directamente en una cavidad del cuerpo. La forma más utilizada es la vía intravenosa.

Los fármacos antitumorales actúan sobre las células con alta tasa de división mediante la inhibición del crecimiento y la proliferación celular. Cabe mencionar que no sólo actúan sobre células tumorales sino también sobre células normales y su efecto es aún más notorio en células con alta tasa de división (por ejemplo, células del folículo piloso, médula ósea, tracto gastrointestinal y sistema reproductor) lo que provoca efectos secundarios y puede comprometer aún más la salud del paciente. Estos efectos van desde la náusea, el vómito y la diarrea leve hasta daño al riñón y corazón, descensos en el número de leucocitos y problemas de fertilidad, dependiendo del fármaco utilizado.

Dado que la quimioterapia representa una de las opciones más comunes para el tratamiento del cáncer, es de gran importancia el estudio del mecanismo de acción antitumoral mediante el cual actúan los fármacos.

#### **1.4 Fármacos antitumorales y mecanismo de acción.**

Durante los últimos años se han identificado más de 40 fármacos activos contra el cáncer que tienen diferentes blancos y repercusiones a nivel celular (*Tabla 1*). Algunos de los fármacos comúnmente utilizados para quimioterapia son el carboplatino, cisplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido, fluoroacil, gemcitabina, irinotecan, metotrexato, paclitaxel, topotecán, vincristina y vinblastina.

Tabla 1. Niveles de acción de los fármacos antitumorales. Adaptada de Holland y Frei, *Cáncer Medicine* 6.

<b>Blanco (macromolécula)</b>	<b>Repercusión celular</b>
Cinasas dependientes de ciclinas, ciclinas, inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas.	Ciclo celular
Receptores esteroides nucleares de la vitamina D y retinoides	Diferenciación celular
Bcl-2, p53, TRAIL, Fas, etc.	Apoptosis
VEGFR, integrinas endoteliales	Angiogénesis
Receptor del factor de crecimiento tipo insulina (IGF), receptores de la familia ErbB, C-kit	Receptores de señalización de la superficie celular
Metaloproteinasas de la matriz y receptores de quimiocina	Metástasis
BCR-ABL, ras, raf, MAPK, cinasa P13, m-TOR, Scr, proteína cinasa C, proteínas STAT, FAK, ALK, cinasas JNK	Elementos de señalización intracelular
Hormona esteroide No. 4	Factores de transcripción nuclear
CD20	Antígenos de superficie

Los fármacos antitumorales se han dividido por su nivel y blanco de acción en:

- 1) Agentes que tienen efecto sobre los ácidos nucleicos.
- 2) Modificadores de enzimas metabólicas o de señalización celular.
- 3) Fármacos que ejercen su acción sobre los microtúbulos.

Algunos de los mecanismos por los cuales los fármacos antitumorales actúan sus blancos son: acuación, hidrólisis, poliglutamilación, fosforilación, fosforibosilación, oxidación y reducción microsomal, demetilación, alquilación y acetilación (Holland y Frei, 2003). A continuación se describen algunos de los mecanismos comunes en fármacos anticáncerígenos.

- a) Acuación. Se refiere a la reacción en la que se incorporan moléculas integrales de agua en otra molécula, en este caso el fármaco anticáncerígeno. La reacción de acuación puede o no implicar el desplazamiento de uno o más átomos de cualquiera de los dos reactantes. Los fármacos que actúan mediante este mecanismo tienen una esfera de coordinación de platino (Pt) en su estructura. Ejemplos de fármacos que ejercen su efecto citotóxico mediante acuación son el

- cisplatino y el carboplatino en los que la reacción con el agua es necesaria para la interacción posterior con el ADN.
- b) Fosforilación. Las fosforilaciones son modificaciones covalentes importantes en la regulación de muchas vías metabólicas, incluyendo aquéllas involucradas en la progresión del ciclo celular. La fosforilación o defosforilación de una enzima puede determinar su activación o desactivación. Algunos fármacos anticáncer actúan a nivel de fosforilación para interactuar con sus proteínas blanco y modificarlas, alterando así procesos celulares que pueden resultar en citotoxicidad.
  - c) Acetilación y metilación. Muchos fármacos ejercen su efecto antitumoral mediante la inducción de daños al ADN por metilaciones, acetilaciones y fosforilaciones. Estas modificaciones afectan directamente la disponibilidad de los promotores a sus respectivos complejos de transcripción y como consecuencia tienen un efecto en la expresión de ciertas proteínas que pueden estar involucradas en el ciclo celular. Las metilaciones también juegan un papel importante en la regulación cíclica de la célula modificando a proteínas reguladoras.
  - d) Alquilación. Esta forma de interacción también es un tipo de modificación covalente y es el mecanismo de acción mejor conocido mediante el cual un fármaco puede dañar al ADN. La mayoría de los agentes alquilantes tienen dos entidades capaces de generar una especie cargada de carbono que se une covalentemente a las regiones de carga negativa del ADN, por ejemplo, los sitios O<sup>6</sup> y N<sup>7</sup> de la guanina. La interacción covalente no permite que el ADN esté disponible para la transcripción y, por lo tanto, se detiene el ciclo celular y la célula no prolifera.

## **1.5 Cáncer y ciclo celular**

### **1.5.1. Características celulares del cáncer**

Las células tumorales han perdido la inhibición por contacto, la armonía del ciclo celular y, comúnmente, la capacidad de regular la muerte celular programada (MCP), por lo que se pueden dividir indefinidamente y formar metástasis. La proliferación

descontrolada de las células tumorales es resultado de la acumulación de mutaciones en *loci* importantes en la regulación del ciclo, como aquéllos que contienen genes encargados de la proliferación y muerte celular.

La pérdida de inhibición por contacto (inhibición dependiente de la densidad) es una de las características distintivas de las células tumorales. Las células normales son reguladas en parte por la disponibilidad de nutrientes y quedan arrestadas en la fase  $G_0$  del ciclo celular cuando no hay suficientes nutrientes. En cambio las células tumorales continúan dividiéndose aún cuando los elementos esenciales son escasos.

La metástasis resulta de la disminución de la expresión de proteínas de adhesión, como la E-cadherina, y de la pérdida en la regulación célula-célula o matriz extracelular-célula. Otras dos particularidades de las células malignas son que secretan proteasas que digieren medio extracelular lo que les permite invadir con mayor facilidad otros tejidos y que secretan factores de crecimiento que promueven la angiogénesis. Las células tumorales presentan varias características que les permiten crecer en cultivo (*in vitro*) y que también se pueden encontrar en tumores (*in vivo*) (Tabla 2).

Tabla 2. *Características de las células tumorales in vitro e in vivo*. Adaptada de Holland y Frei, 2003.

Alteraciones <i>in vitro</i>	Alteraciones <i>in vivo</i>
Aumento en: la basofilia citoplasmática, número y tamaño de núcleos, proporción núcleo:citoplasma; formación de <i>cordones</i> y <i>racimos</i> de células.	Mayor expresión de proteínas oncogénicas.
Alteración en las características de crecimiento: inmortalidad en cultivo, disminución en los requerimientos de suero, pérdida de la dependencia al crecimiento por anclaje y adquisición de la capacidad de crecer en agar líquido; pérdida del control del ciclo celular y resistencia a la muerte celular programada.	Pérdida de la expresión de proteínas supresoras de tumores por delección o mutación.
Pérdida de inhibición por contacto	Alteraciones en los patrones de metilación del ADN.
Cambios en la estructura y función de la membrana celular y pérdida de las interacciones célula-célula y célula-matriz.	Sobreproducción de sustancias asociadas al crecimiento.
Resistencia ante agentes inductores de la diferenciación celular.	Aumento en la producción o producción descontrolada de factores de crecimiento, de angiogénesis o de crecimiento hematopoyético.
Alteraciones en los mecanismos de señalización: cascadas de fosforilación y mecanismos de defosforilación.	Pérdida progresiva de la proliferación celular regulada, incremento en la capacidad de invasión y en la capacidad de formar metástasis.
Capacidad de producir tumores en animales experimentales.	Alteración en los patrones enzimáticos (se sobreproducen enzimas involucradas en la síntesis de ADN y enzimas líticas)
	Producción de genes relacionados con el desarrollo embrionario.
	Capacidad de evadir la respuesta inmune antitumoral del huésped.

### 1.5.2. Ciclo celular

La regulación precisa del ciclo celular es esencial para que una célula genere progenie con un genoma intacto y funcional. El crecimiento celular y la replicación del

ADN deben estar cuidadosamente coordinados para que el ciclo progrese de manera armoniosa.

El ciclo celular es controlado en gran parte por las cinasas. En eucariotes estas proteínas están reguladas por los factores de crecimiento que gobiernan la proliferación celular. En eucariotes este ciclo es mucho más complejo que en bacterias y tiene 4 pasos discretos, pero en general se les puede agrupar en dos: mitosis e interfase. La mitosis es la división del material genético y el citoplasma de una célula en dos. La interfase corresponde al 95% de la duración del ciclo y es durante ésta que el ADN se replica y se expresan las proteínas necesarias para la división.

Se describirán brevemente los pasos del ciclo celular eucariote normal con la finalidad de enfatizar el contraste entre los ciclos normales y los ciclos de las células transformadas.

#### A) Interfase

- a)  $G_1$ : durante este periodo la célula es metabólicamente activa, crece, pero no replica su material genético. La sucesión de  $G_1$  a S es controlada por puntos de regulación que determinan si el ciclo procede o no.
- b)  $G_0$ : este periodo es un lapso de tiempo alternativo al que la célula puede recurrir si no está lista para dividirse. Es una fase no cíclica pero metabólicamente activa en la que la célula no puede entrar directamente a la fase S. Algunos tipos de células pueden dejar el arresto en  $G_0$  y continuar con el ciclo pero sólo mediante estímulos extracelulares rígidamente controlados.
- c) S: durante esta fase el ADN se replica.
- d)  $G_2$ : la célula sigue creciendo y se sintetizan proteínas que se necesitan para la división.

#### B) Mitosis

La fase M del ciclo celular corresponde a la división del material genético y el citoplasma para dar origen a una célula idéntica a la original.



### 1.5.3. Control del ciclo celular en células normales.

Para que el ciclo celular progrese exitosamente los eventos sucesivos desde  $G_1$  hasta la mitosis deben darse de forma ordenada. No se puede pasar de una fase a la otra cuando no se han sintetizado los elementos necesarios para la siguiente etapa ni sin que la célula tenga el tamaño adecuado para llevar a cabo la citocinesis. Existen puntos decisivos de control entre las cuatro etapas del ciclo celular. Estos puntos son sensibles a circuitos de regulación intrínsecos (propios de la célula) o extrínsecos (estímulos ambientales). Ambos circuitos regulatorios pueden activar o inactivar los puntos decisivos de control (*checkpoints*) y afectar directamente al ciclo celular.

La transición entre estos puntos de control depende, a su vez, de una familia de enzimas que está constituida por *cinasas dependientes de ciclinas* (Cdks). Estas enzimas son altamente conservadas en todos los eucariotes, desde levaduras hasta mamíferos, dado su papel tan importante en la regulación del ciclo celular. La holoenzima activa de la Cdk consiste en una subunidad catalítica y una subunidad de regulación dependiente de una ciclina particular. Cada ciclina se sintetiza en diferentes puntos del ciclo: las ciclinas  $D_1$ ,  $D_2$  y  $D_3$ , llamadas ciclina D en conjunto, se expresan durante  $G_1$  mientras haya mitógenos presentes; la ciclina E se expresa durante la fase  $G_1$  y la fase S temprana; la ciclina A durante la fase S y  $G_2$  y la ciclina B en  $G_2$  y M. La activación de la unidad catalítica de la Cdk sólo es posible si se ha sintetizado la ciclina correspondiente (Alberts, B., *et al.* 2002). Además de la síntesis de las ciclinas, la activación de las Cdks necesita de la fosforilación de un residuo de Thr para que se forme el complejo activo cinasa-ciclina. Esta fosforilación es catalizada por otra cinasa llamada cinasa activadora de Cdks (CAK).

Las Cdks también son reguladas negativamente por inactivación dependiente de otra cinasa que la fosforila en su sitio de unión al ATP. Esta inactivación puede revertirse por una fosfatasa específica.

Otras proteínas importantes en la regulación son las inhibidoras de las Cdks. Estos inhibidores pueden actuar sobre varias Cdks (p21C1P1, p27K1p1, p57K1P2) o específicamente sobre el complejo ciclina D/CDK4 o -6 (p161NK4, p151NK4B, p181NK4C, p191NK4D). La síntesis y degradación de estos inhibidores es resultado de señales anti o promitóticas (Alberts, B., *et al.* 2002).

#### **1.5.4. Alteraciones en el ciclo de las células tumorales.**

Una de las características más notables de las células tumorales es el descontrol en la progresión del ciclo celular, lo que resulta en la división de células con errores o que no deberían dividirse más. Al inducirse un daño en el ADN las células normales responden mediante la activación de sus puntos de control por medio de las Cdks, de la maquinaria de muerte celular programada y también de la transcripción de genes de reparación de ADN.

El arresto en una u otra etapa del ciclo celular en respuesta a un estímulo depende de genes supresores tumorales como *p53*, *rb*, *atm* y *pten*, por nombrar algunos. Las células tumorales normalmente tienen mutaciones en estos genes por lo que no detectan correctamente el daño al ADN y siguen dividiéndose en condiciones no ideales.

De manera general, las células tumorales pueden seguir dividiéndose aún en ausencia de los estímulos proliferativos adecuados debido a la activación incorrecta de las Cdks, a la expresión de oncogenes y a la delección o mutación de supresores tumorales (Holland y Frei, 2002).

#### **1.6 Cáncer y muerte celular.**

La muerte celular programada (MCP) es un proceso activo, normal y fundamental en la embriogénesis, la metamorfosis y la homeostasis de los tejidos durante la vida adulta (Joza, N., *et al.* 2001). Además de las alteraciones en el ciclo celular, el cáncer se

caracteriza por un desbalance entre la MCP y la proliferación celular por lo que estudiar los tipos de MCP es esencial en la búsqueda de alternativas para su tratamiento.

La MCP se ha clasificado dependiendo de sus características morfológicas nucleares o de los organelos que están involucrados (Leist y Jäättelä, 2001).

Por la morfología nuclear, la MCP puede ser:

- a) *Apoptosis clásica*: caracterizada por cromatina altamente condensada (condensación de etapa II) y formación de cuerpos de cromatina compactos y geométricos. Este tipo de MCP casi siempre es dependiente de caspasas (cisteín-proteasas específicas que participan como iniciadores o efectores del desmantelamiento celular durante la MCP).
- b) *MCP tipo-apoptosis*: caracterizada por cromatina menos compacta que forma estructuras no-geométricas, pero en la que sí se observa un grado de “aglomeración” de la cromatina (condensación de etapa I). La mayoría de las MCPs independientes de caspasas caen dentro de esta categoría, pero se han reportado casos en los que la MCP es dependiente de caspasas y la morfología nuclear encaja dentro de la MCP tipo-apoptosis (Leist y Jäättelä, 2001).
- c) *MCP tipo-necrosis*: ocurre sin aparición de cuerpos compactos de cromatina. En ocasiones se observan “motas” de cromatina, pero el grado de compactación no es como el de la apoptosis clásica. Adicionalmente, se pueden o no presentar cambios morfológicos de muerte tipo-apoptosis. Cabe mencionar que la MCP tipo-necrosis sigue siendo un componente de la contraparte a la *necrosis*, que no es un tipo de muerte programado o activo y se acompaña con inflamación.

A pesar de la utilidad de esta caracterización de la MCP, la clasificación de la muerte celular por la apariencia nuclear es inexacta ya que varios tipos de MCP pueden converger y tener características compartidas y ser o no dependientes de caspasas. Es por esto que es más preciso el enfoque de la clasificación por organelos que participan durante la MCP. Al caracterizar de manera exacta quiénes participan durante la

iniciación, progresión y ejecución de la MCP se puede manipular de forma más atinada el ciclo celular de las células tumorales y lograr un acercamiento terapéutico útil.

Los compartimentos celulares que pueden participar durante la MCP son:

- a) mitocondria
- b) lisosomas
- c) membrana plasmática
- d) núcleo
- e) citoesqueleto
- f) retículo endoplásmico

El hecho de que estén involucrados varios organelos, en ocasiones simultáneamente, le da a la célula un *seguro de muerte* con el que se garantiza, hasta cierto punto, la homeostasis de los tejidos. Se han descrito dos vías que pueden ser activadas después del daño. La mejor conocida es la *ruta mitocondrial*, en la que la mitocondria integra las señales de muerte que vienen de los organelos sensores y funciona como ejecutor final, liberando varias proteínas proapoptóticas. La otra vía es la *ruta de receptores de muerte*. Ésta se activa por medio de proteínas de membrana que, al unirse con adaptadores intracelulares, activan a proteasas específicas que llevan al desmantelamiento de la célula (Hengartner, M. 2000).

Ante la activación del programa de muerte se expresan genes que son clave en la regulación del ciclo celular. Durante los procesos patológicos también se rompe la coordinación entre las señales de muerte que vienen de los diferentes organelos y las células pierden la capacidad de morir ante el daño o mueren de forma descontrolada.

La MCP mejor descrita es la apoptosis dependiente de caspasas. Sin embargo, se sabe que varios tipos de MCP no involucran a estas proteasas clásicas de la apoptosis. De hecho, la MCP puede ocurrir en la ausencia total de caspasas (Jäättelä, M., *et al.*, 2004) o por vías independientes de la mitocondria y provocar cambios morfológicos típicos de la apoptosis, como la zeiosis y la fragmentación del ADN. Se ha sugerido que estas MCPs

independientes de caspasas funcionan como una segunda línea de defensa ante el daño cuando las caspasas son inhibidas en condiciones experimentales, normales o patológicas.

Las caspasas pueden ser inhibidas por agentes farmacológicos en condiciones experimentales o *in vivo* por varios estímulos represores como proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), proteínas virales, estrés oxidativo o nitrosativo, otras proteasas y agotamiento de las reservas de ATP. Al ser inhibidas las caspasas, pueden activarse una o varias de las rutas alternas de MCP y provocar la externalización de la fosfatidil-serina, (en condiciones normales se encuentra en la cara interna de la membrana celular). Ésto marca a la célula para su posterior fagocitosis. Dado que esta importante señal de fagocitosis está desacoplada de la activación de las caspasas en varios modelos (Leist y Jäättelä, 2001) se puede pensar que en diferentes condiciones fisiológicas, normales o patológicas, es posible observar el mismo resultado como producto de varias vías o la combinación de éstas. Se pueden activar programas de muerte independientes de la mitocondria pero dependientes de caspasas y viceversa; ambos casos pueden provocar cambios morfológicos muy similares.

Al desencadenarse una vía de MCP independiente de caspasas también se procesa el contenido celular, razón por la cual se observan cambios morfológicos similares a la apoptosis clásica. Los cambios son mediados por factores alternativos que se activan por la vía de los receptores de muerte o la ruta mitocondrial.

Durante la activación por receptores de muerte membranales participan principalmente Fas (CD95, Apo-1) y TNFR1 (receptor para el factor de necrosis tumoral). Se ha sugerido que estas proteínas pueden llevar a la MCP por su participación en rutas como Fas-Daxx-ASK1-JNK1/2 o TNFR1-ROS-ASK1-JNK.

A partir de señales mitocondriales también se pueden encender rutas de MCP independientes de caspasas. La participación de la mitocondria en este caso está mediada por proteínas de la familia Bcl2-BH3 (Bax, Bak, Bad, Bim como promotores de la permeabilización de la membrana; Bcl-2 y Bcl-<sub>XL</sub>, como inhibidores de la apertura de los

poros mitocondriales) que se translocan a la membrana mitocondrial al iniciarse el programa de muerte. En la ejecución de la MCP independiente de caspasas también están involucradas proteínas del espacio intermembranal que se liberan al citosol ante la señal de muerte. Entre estas últimas destacan AIF (factor inductor de apoptosis), especies reactivas de oxígeno (ROS), HtrA2/Omi (serin-proteasas mitocondrial),  $Ca^{++}$  y la endonucleasa G (endoG).

El calcio es un catión que participa como mensajero en muchas rutas bioquímicas y puede ser parte de señales de muerte o de proliferación. Un ejemplo reciente de la participación del calcio en un programa de muerte independiente de la mitocondria, pero dependiente de caspasas, está en el del trabajo de Hu, Q., *et al.* 2005 . Este grupo reportó que, ante el daño provocado por una alta concentración de W-7, el calcio es liberado del retículo endoplásmico y actúa como mensajero de muerte en células HeLa. En este caso el calcio liberado hacia el citosol provoca la activación de las calpaínas que, a su vez, se translocan a la membrana del retículo endoplásmico y escinden a la pro-caspasa-12 (proteasa específica del retículo endoplásmico). La caspasa-12 puede activar a la pro-caspasa 8 y a la pro-caspasa 3 de forma citocromo c- y caspasa 9-independiente.

Existen otros efectores de muerte que trabajan independientemente de las proteínas típicas de MCP. Entre ellas, AIF, que es una flavoproteína mitocondrial conservada evolutivamente desde invertebrados hasta mamíferos. AIF se encuentra como una proteína soluble del espacio intermembranal de la mitocondria pero puede liberarse hacia el citosol y translocarse al núcleo ante la activación de ciertos programas de muerte celular. Además de su participación en programas de muerte celular se sabe que tiene actividad de óxidoreductasa por lo que también es importante en la tolerancia al estrés oxidativo (Cregan, S.P *et al.* 2004).

AIF fue descubierta originalmente en sobrenadantes derivados de mitocondrias en las que se había inducido la permeabilización de la membrana. En este modelo libre de células, AIF fue capaz de inducir la condensación de la cromatina y fragmentación

internucleosomal del ADN en núcleos aislados de células HeLa por lo que se comenzó a estudiar como una proteína potencialmente pro-apoptótica (Susin, S *et al.* 1996).

AIF es una molécula esencial durante la primera oleada de muerte celular del desarrollo embrionario y morfogénesis murinos; es crucial en el desarrollo temprano de los mamíferos y en las células deficientes de los componentes del apoptosoma y caspasas. AIF puede desencadenar un tipo de MCP con características estructurales de la apoptosis independientemente del apoptosoma y de las caspasas (Joza, N., *et al.* 2001). Una vez liberada, AIF se transloca al núcleo y se une al ADN de forma secuencia-independiente donde induce cambios nucleares y recluta endonucleasas que provocan la fragmentación del ADN a gran escala (50Kb) de forma caspasa-independiente. Este tipo de fragmentación es característico de la acción de AIF y se diferencia de la fragmentación oligonucleosomal típica de la actividad de caspasas.

Evidencias que apoyan el papel caspasa-independiente de AIF se encuentran en los trabajos de Joza (2001) y Cregan (2002). En el modelo de cuerpos embionarios murinos de Joza se comprobó que la adición de un inhibidor general para caspasas (z-VAD.fmk) no previno la muerte celular ni la formación de las cavidades durante el desarrollo embrionario *in vitro*. Más adelante, Cregan *et al.* demostraron que, en su modelo de neuronas murinas, la adición de otro inhibidor de caspasas (BAF) no causó decrementos significativos en el número de células con ADN fragmentado.

Por otra parte, recientemente se reportó que en células MCF-7 deficientes en pro-caspasa 3 se regula a la alta la expresión de Bax y AIF después del tratamiento combinado de doxorubicina (0.1 µg/mL) y paclitaxel (0.1 µg/mL). En este caso la liberación de AIF funciona como una ruta de muerte alterna a la MCP dependiente de caspasa 3 y provoca la ejecución del programa de apoptosis (Zoli, W., *et al.* 2005). En el mismo estudio se reporta una apoptosis no dependiente de AIF en la línea celular de mama BRC-230, en la que sí se expresa la pro-caspasa 3.

Con respecto a la regulación de AIF a nivel transcripcional, se ha encontrado que el gen *aif* tiene elementos de respuesta a p53 y que es regulado positivamente por éste. La regulación p53-dependiente no necesariamente implica un aumento de la proteína P53, más bien, la transcripción de *aif* se regula por niveles basales de P53 y, de esta forma, células que tienen el gen silvestre de p53 podrían ser capaces de activar una vía alterna de MCP ante el daño (Stambolsky, P., *et al.* 2006). Sin embargo, AIF tiene que sufrir cambios postraduccionales para ser liberado de la mitocondria y, más aún, ser procesada antes de translocarse al núcleo (Otera, H., *et al.* 2005).

La endonucleasa G también es una proteína mitocondrial mediadora de la MCP. Ante el daño por estrés oxidativo o activación de los receptores de muerte membranales, endoG se libera de la mitocondria y se transloca al núcleo provocando la fragmentación internucleosomal del ADN de forma caspasa-independiente (Kim, J.T., *et al.* 2002). Se ha encontrado que endoG se transloca de la mitocondria al núcleo donde induce la fragmentación del ADN independientemente de las caspasas (Li *et al.* 2001). En un modelo de *C. elegans* se demostró que tanto el homólogo de la endoG (CPS-6) como el homólogo de AIF (WAH1) interactúan ante los estímulos de muerte. WAH-1 se une a CPS-6 y potencia su actividad de endonucleasa. A este complejo WAH-1/CPS-6 se le ha llamado *degradasoma* pero sólo se ha descrito en *C. elegans*. No se ha reportado tal interacción en células de mamífero donde se especula que pueden participar otras endonucleasas río-abajo de AIF.

Durante la activación de vías independientes de caspasas también participan otras proteasas como las cisteín-proteasas (*cis* catepsinas o calpaínas) o las serín-proteasas, granzimas, catepsina-D o el mismo proteosoma. Algunas de estas son liberadas de otros organelos, como el retículo endoplásmico o los lisosomas por lo que se entiende que la célula, además de tener más de una forma de morir, tiene más de una manera de percibir el daño.



### 1.6.1. Apoptosis clásica y cáncer

La apoptosis es sólo una de las formas de llevar a cabo la MCP y es un recurso normal de homeostasis. Las características morfológicas generales de la apoptosis clásica son la reducción del tamaño del citoplasma, la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos con fragmentos de ADN. La degradación del ADN a nivel de nucleosomas (fragmentación oligonucleosomal), la formación de *capullos* (zeiosis) y la exposición de la fosfatidil-serina hacia el espacio extracelular también son cambios típicos de la apoptosis clásica (Leist y Jäättelä, 2001).

La apoptosis es una *muerte silenciosa y limpia* ya que, cuando ocurre *in vivo*, la célula apoptótica es fagocitada por los macrófagos y no se desencadenan las respuestas de inflamación características de la muerte accidental (necrosis).

Como se mencionó en párrafos anteriores, las células normales, ante ciertos estímulos, disparan la cascada de eventos de muerte celular o quedan arrestadas en alguna de las fases del ciclo en espera de la reparación del daño, si es que hay alguno. Por el contrario, en la mayoría de las cánceres la maquinaria de apoptosis es defectuosa como resultado de una serie de mutaciones adquiridas que no permiten la correcta activación de los puntos de control del ciclo celular ni la activación de la apoptosis cuando ésta es necesaria, es decir, son resistentes a la apoptosis y no detienen el ciclo celular aún ante el daño (Hanahan, D. y Weinberg, R.A., 2000). Por lo anterior, a las células malignas se les considera *inmortales*.

Algunas de las mutaciones que les confieren resistencia a la apoptosis son la translocación del gen *bcl-2* (que previene la apoptosis y también hace a las células tumorales resistentes a los efectos citotóxicos de ciertos compuestos) y las alteraciones en otros genes como *c-myc*, *p53*, *pten* y *c-fos*.

### **1.6.2. Fármacos antitumorales y apoptosis.**

Como se puede ver, la inducción de la apoptosis constituye una forma de regular la progresión del cáncer. La muerte MCP es un proceso que puede ser inducido por ciertos compuestos antitumorales (Ryungsa, *et al.*, 2002). Se ha reportado que la activación de la apoptosis es uno de los mecanismos de acción de los fármacos antitumorales y su citotoxicidad depende de esta activación.

El entendimiento a nivel molecular va más allá de la búsqueda de fármacos con potencial antitumoral, sino que también se debe considerar el diseño de estrategias para esquivar los problemas derivados de la resistencia que generan las células tumorales debido a la acumulación de mutaciones (Richter, *et al.*, 2005). La información del mecanismo molecular en células malignas ha cambiado la forma de tratar el cáncer: las aproximaciones convencionales de quimioterapia tienen como blanco a todas las células en división, lo que aumenta el riesgo de toxicidad colateral (por ejemplo, sistema inmune deprimido). Por lo anterior es muy importante entender cómo se activa la maquinaria de la apoptosis después del daño o la aplicación del fármaco (Makin & Hickman, 2000). La resistencia a los fármacos es un problema clínico que tiene bases moleculares lo que suma importancia a este último tipo de estudios.

Desde hace más de una década se conocen algunos genes y proteínas activadoras de la apoptosis. De los principales genes implicados en la apoptosis se encuentra el transactivador p53, un gen supresor tumoral con varias proteínas efectoras que son clave en la respuesta celular al daño genotóxico inducido por fármacos. p53 codifica una proteína cuya inactivación es uno de los pasos universales en el desarrollo del cáncer (Lane, D.P., 1992). Otras proteínas como las de la familia Bcl-2 (proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas), y las caspasas también juegan un papel decisivo en el destino de una célula (Makin, G. 2000).

Como se mencionó en párrafos anteriores, se conocen dos rutas por medio de las cuales los compuestos anticáncerígenos pueden inducir apoptosis: una vía que implica a

los receptores membranales y otra que es independiente de estas proteínas. Ambas rutas están relacionadas con la liberación del citocromo c (cyt-c). Esta última proteína mitocondrial funciona como un interruptor que prende o apaga la maquinaria de muerte celular pero, a su vez, está regulada por la interacción de proteínas proapoptóticas (Bax, Bid y Bak), antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>) e inhibidores de la apoptosis (IAPs). Los mecanismos mencionados representan una vía claramente mitocondrial dependiente de la liberación del cyt-c en muchos casos.

El conocimiento de estas rutas y de sus activadores y represores puede ser aplicado para desarrollar estrategias que regulen positivamente a las proteínas proapoptóticas e inhiban la expresión de las antiapoptóticas. También se pueden diseñar métodos con los que se incremente la sensibilidad de las células malignas a los fármacos utilizados.

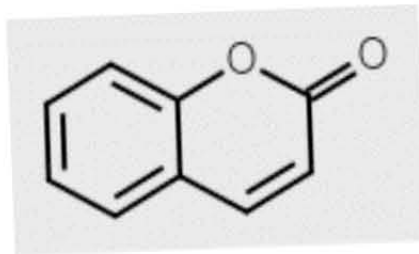
La gran cantidad de factores que intervienen en la apoptosis, además de hacerlo un proceso complicado, proporciona a los investigadores una amplia gama de blancos moleculares potencialmente terapéuticos. Las investigaciones no sólo se han enfocado en el estudio de la cascada mitocondrial, sino que también se han buscado blancos en las vías de señalización membranal que se encuentra río abajo de los receptores de muerte. También se han realizado estudios con inhibidores Cdk's, lipoxigenasas y caspasas (efectoras y activadoras). Algunos de éstos con el fin de promover la apoptosis y otros de inhibirla, dependiendo de cuál sea la enfermedad que se está tratando, ya que las alteraciones a nivel de apoptosis también pueden llevar a otras enfermedades crónico-degenerativas como el mal de Parkinson. En cualquiera de los casos los mejores compuestos son aquéllos que permiten la inhibición específica de células dañadas y causan menos efectos secundarios (Bamford, *et al.*, 2000).

La actividad citotóxica es, por lo tanto, una característica que se busca en los compuestos que se prueban como anticáncerígenos. Estudios previos han demostrado que varios agentes anticáncerígenos actúan a nivel de apoptosis (Kaufmann & Earnshaw, 1989), por ejemplo, ciertos antimetabolitos (cytarabina, fludarabina, gemcitabina,

hidroxiurea), agentes que fragmentan al ADN (bleomicina), agentes que se entrecruzan con el ADN (cisplatino, clorambucil, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno), agentes intercalantes del ADN (adriamicina, mitoxantrona), inhibidores de la síntesis protéica (L-asparaginasa, cicloheximida, puromicina, toxina diftérica), inhibidores de la topoisomerasa I (camptotecina, topotecan) e inhibidores de la topoisomerasa II (etopósido y tenipósido).

## 1.7 Cumarinas

Las cumarinas (1,2-benzopironas) son metabolitos secundarios muy comunes en plantas que se han utilizado como aromatizantes, jabones y saborizantes. Constituyen el compuesto orgánico base de una clase de fitoquímicos que ha despertado el interés de la comunidad científica por sus propiedades anti-inflamatorias, anticoagulantes, antimutagénicas, antioxidantes, vasodilatadoras y citotóxicas, además de su uso en tratamientos contra el VIH. Las cumarinas se pueden obtener de varias plantas (lavanda, fresas, trébol dulce y canela) o pueden sintetizarse a partir de la fenilalanina. El núcleo básico de la cumarina consiste en dos anillos fenólicos insaturados con dos átomos de oxígeno en las posiciones 1 y 2 (*figura 1*).



*Figura 1.* Núcleo básico de la 1,2-benzopirona (cumarina).

El núcleo de benzopirona se puede hidroxilar metabólicamente en la posición 7 para dar como producto la 7-hidroxi-cumarina (umbeliferona). Otras cumarinas hidroxiladas (6,7 -dihidroxicumarina o esculetina; 7-hidroxi-6-metoxicumarina o escopoletina) también se encuentran comúnmente en la naturaleza.

La toxicidad de las cumarinas y compuestos derivados se reportó por primera vez a principios del siglo XX en animales de granja a los que se les alimentaba con trébol dulce (*Melilotus alba*) mohoso. Cuando el moho invade al trébol dulce se produce el metabolito *bis*-hidroxicumarina por la oxidación de la cumarina a 4-hidroxicumarina que es un agente anticoagulante causante de hemorragias y síntomas asociados. Fue hasta 1939 que Campbell & Link identificaron a este agente activo en la descomposición del trébol dulce.

Las cumarinas pueden ser simples o compuestas dependiendo de los sustituyentes que tenga el núcleo de benzopirona. Las cumarinas compuestas pueden tener sustituyentes variados tales como furano, pirano, acilo, prenilo, fenilo, hidroxilo o grupos nitrogenados. Las furanocumarinas son compuestos tóxicos que se encuentran generalmente en las familias Apiaceae y Rutaceae. Se sabe que su toxicidad aumenta en presencia de la luz ultravioleta y que su principal modo de acción es por unión al ADN (aunque también se ha encontrado que interactúa con lípidos y proteínas).

Las alquil y fenil cumarinas, como su nombre indica, tienen grupos alquilo o fenilo asociados. Se ha reportado que las fenilcumarinas tienen actividad como inhibidoras de la transcriptasa reversa en el virus HIV-1.

Las cumarinas hidroxiladas (hidroxicumarinas mono o dihidroxiladas) tienen actividad anticoagulante y algunas, como la esculetina tienen actividad de inhibición de la viabilidad celular (Chia-Yih Chu, *et al.*, 2001).

### **1.7.1 Mecanismo de acción y relación estructura-actividad de las cumarinas.**

Finn, Creaven & Egan (2001) estudiaron el potencial citotóxico y la toxicidad selectiva de cumarinas sintéticas y naturales utilizando células epiteliales neoplásicas y normales de humano. Los autores encontraron que el potencial citotóxico de las cumarinas depende de la naturaleza y posición de los grupos sustituyentes.

La cumarina tiene efectos antitumorales *in vivo* y citostáticos *in vitro*. Al metabolizarse se monohidroxila y los productos resultantes poseen tiempos de vida media significativamente más largos en humano, lo que hace pensar que la actividad se debe a sus metabolitos monohidroxilados.

Jiménez-Orozco, *et al.* (1999), trabajaron con 3-, 4-, 6-, y 7- y 8-monohidroxycumarinas y sus acetatos y metil-éteres. Se determinó su efecto citostático *in vitro* en fibroblastos y melanoma (B16-F10) de ratón. En este estudio se encontró que los derivados con sustituyentes tienen mayor actividad citostática que la cumarina simple ( $IC_{50}$  de 30-40  $\mu\text{g/mL}$  para las cumarinas compuestas más activas y de 280  $\mu\text{g/mL}$  para la cumarina simple), apoyando la hipótesis de la relación estructura-actividad.

Aunque la actividad biológica de las cumarinas y algunos de sus derivados más complejos parece estar basada en el núcleo de la cumarina (Finn, *et al.*, 2002), los antecedentes indican que el número y tipo de sustituyentes y el grado de hidroxilación sí juegan un papel importante en la intensidad de la actividad antiproliferativa y citotóxica, hecho que ha llevado al estudio exhaustivo de este tipo de compuestos.

Un trabajo que demuestra la relación estructura-actividad en 21 cumarinas diferentes es el de Kawaii, *et al.* (2001). Los resultados demuestran que la entidad 6,7-dihidroxi juega un papel importante en la actividad antiproliferativa de los compuestos. Chia-Yih Chu *et al.* (2001) demostraron que la esculetina induce la fragmentación del ADN y otros cambios morfológicos que se consideran característicos de la apoptosis en células HL-60, después de 24 horas de tratamiento con el fármaco (100  $\mu\text{M}$ ). Además, la esculetina también reduce la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y activa a la cisteína-proteasa CPP32 (una caspasa-3 efectora).

López-González *et al.* (2004) también trabajaron con una cumarina hidroxilada (7-hidroxycumarina o umbeliferona) en líneas celulares de carcinoma pulmonar (NSNLC). Reportaron la inhibición de la proliferación celular, arresto del ciclo celular en la fase  $G_1$  e inducción de apoptosis con los cambios morfológicos celulares

característicos. Uno de los resultados más importantes de este estudio fue que la 7-hidroxycumarina tuvo mayor actividad citostática que la cumarina simple en 7 líneas celulares de cáncer pulmonar ( $IC_{50} = 50-136 \mu\text{g/mL}$  para la 7-OH-cumarina;  $IC_{50} = >160 \mu\text{g/mL}$  para cumarina simple) apoyando la noción de que existe una relación entre la estructura química y la actividad biológica.

En 2001, el grupo de Xue-Li Liu probó que la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxycumarina) inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en células PC<sub>3</sub> (cáncer de próstata humano), PAA (cáncer de pulmón humano) y HeLa (cáncer de cérvix humano). Las  $IC_{50}$  para la escopoletina en las tres líneas celulares son de 157, 154 y 294  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estos resultados son congruentes con los del grupo de López-González en lo que respecta a la actividad citotóxica en el cáncer de pulmón y también apoyan la relación estructura-actividad. La actividad selectiva de los compuestos antitumorales es una característica que se debe considerar en la búsqueda de fármacos anticáncerígenos para disminuir los efectos secundarios.

Por otra parte parte, Kawaii *et al.* (2001) trabajaron con 33 cumarinas compuestas (isopenteniladas y sus derivados con sustituyentes pirano y furano) en varias líneas celulares normales y tumorales buscando efectos antiproliferativos. Este grupo estableció que las pirano- y furanocumarinas tienen una gran actividad antiproliferativa en células tumorales pero poca actividad en células normales.

Finn *et al.* (2002) reportaron la actividad citotóxica de las cumarinas compuestas 6-nitro-7-hidroxycumarina y 7,8-dihidroxycumarina en células de carcinoma renal humano y células del túbulo proximal no-tumorales. Los autores demostraron que la citotoxicidad es selectiva en estos modelos ( $IC_{50}$  de 44 y 4.3  $\mu\text{M}$  para la 6-nitro-7-hidroxycumarina y la 7,8-dihidroxycumarina, respectivamente, en adenocarcinoma renal, A-498, y de  $>500 \mu\text{M}$  para ambos fármacos en células renales normales). Estos investigadores reportaron la toxicidad selectiva de otras cumarinas hidroxiladas (como la umbeliferona) en melanocitos malignos y en fibroblastos humanos normales. Se demostró que las cumarinas hidroxiladas y con sustituyentes nitro poseen toxicidad

selectiva dependiente de la dosis y el tiempo de exposición. Este mismo grupo encontró que las cumarinas preniladas alteran la morfología nuclear. En 2003 retomaron el estudio de la 6-nitro-7-hidroxycumarina y probaron que este compuesto también altera la progresión del ciclo celular dando lugar a la aparición del pico sub-G<sub>1</sub> y la disminución de la expresión de la ciclina D<sub>1</sub>.

Basándose en estos antecedentes se pueden subrayar dos características deseables para los fármacos potencialmente anticáncerígenos): 1) que su actividad sea selectiva y 2) que tengan más de un sustituyente reactivo.

### 1.7.2. Obtención de cumarinas.

Diferentes tipos de cumarinas han sido aisladas previamente de especies de árboles tropicales como *Calophyllum brasiliense* y *Mammea americana*. El grupo de Kakuko Yasunaka, en 2004, aisló compuestos activos de diferentes plantas medicinales mexicanas para determinar su potencial como agentes antibacterianos. Entre estos compuestos se aisló la cumarina A/AA. La cumarina A/AA (figura 2) fue extraída por el grupo de Yasunaka de las cáscaras del fruto de la *Mammea americana* (zapote Domingo). Esta planta se ha utilizado ampliamente en medicina popular para tratar enfermedades cutáneas y fiebre (Yasunaka, *et al.*, 2005). El extracto obtenido se disuelve fácilmente en compuestos orgánicos, a temperatura ambiente.

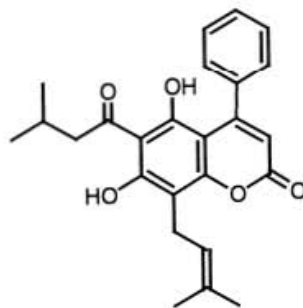


Figura 2. Estructura de la cumarina A/AA(cumarina A/AA). Tomada de K. Yasunaka *et al.*, 2005



Este mismo grupo reportó que la cumarina A/AA tiene una gran actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Esta actividad fue mucho más alta que la de la oxacilina, un potente antibiótico utilizado ampliamente en el tratamiento de infecciones por *S. aureus*. Por otra parte se ha propuesto que la A/AA, por su estructura compleja y su actividad biológica, también podría ser un buen candidato para la terapia antitumoral.

## **II. Objetivos**

1. Objetivo general: Probar la actividad citotóxica y analizar el mecanismo de acción antitumoral de la cumarina A/AA en células tumorales.
2. Objetivos particulares:
  - a) Determinar la  $IC_{50}$  de la cumarina A/AA en líneas celulares humanas (HeLa, Calo, SW480 y SW620).
  - b) Analizar el efecto de la cumarina A/AA en un modelo de células normales.
  - c) Analizar si la cumarina A/AA provoca la fragmentación del ADN en las líneas celulares que sean sensibles al tratamiento.
  - d) Determinar el efecto de la A/AA en la progresión del ciclo celular.
  - e) Evaluar la expresión de las proteínas Bax, Bcl2, caspasa 3 y AIF.
  - f) Analizar el proceso de muerte celular por vías de muerte no clásicas, como la liberación de la proteína AIF en las células tratadas con la cumarina A/AA.

## **III. Hipótesis**

Se sabe que las cumarinas compuestas tienen una relación estructura-actividad citotóxica dependiente del número y tipo de sustituyentes. Dado que la cumarina A/AA es una cumarina compuesta, se espera que tenga actividad citotóxica en diferentes líneas celulares y provoque cambios que alteren el patrón de expresión normal de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas, induciendo de este modo muerte celular programada.

## **I. Justificación**

El mecanismo de acción antitumoral de cumarinas complejas no ha sido establecido con claridad. Hay evidencia de que las cumarinas complejas inhiben la proliferación celular por medio de la apoptosis y el arresto en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Sin embargo también se deben considerar alternativas en las vías de muerte, incluso no descartar la posibilidad de que el proceso de muerte sea de tipo necrótico o a través de una MCP tipo-apoptosis. La caracterización del mecanismo de acción de los fármacos con potencial farmacológico abre la gama de posibilidades de sus usos y restricciones.

En el presente proyecto se plantea la investigación de la actividad citotóxica y mecanismo de acción antitumoral de una cumarina compleja (cumarina A/AA) en diferentes líneas celulares de cáncer, incluyendo una línea de cáncer cérvico-uterino. Si bien en experimentos anteriores se demostró que la cumarina A/AA induce la fragmentación del ADN, se espera demostrar la participación de proteínas pro y anti apoptóticas. Finalmente, con estos resultados se podrá proponer un mecanismo de acción antitumoral para la cumarina A/AA lo que representará un avance en el campo de estudio del mecanismo de acción de cumarinas complejas.

## I. Material y métodos

### 5.1 Cultivo celular y líneas celulares utilizadas.

#### 5.1.2. Material para el cultivo

- Se utilizaron las líneas celulares humanas HeLa y Calo (carcinoma cervical); SW480 (adenocarcinoma de colon) y SW620 (metástasis de linfoma en colon humano).
- Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoBRL, *Life Technologies*<sup>TM</sup>) líquido y suplementado con 10% suero fetal bovino, antimicótico/antibiótico, piruvato de sodio y aminoácidos esenciales (*Gibco*<sup>TM</sup>).
- Campana de flujo laminar vertical u horizontal.
- Cajas Petri desechables, estériles, de 30 y 90 mm.
- PBS/EDTA estéril.
- Incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, en condiciones de humedad constante.

#### 5.1.3. Técnica de cultivo celular.

Las células fueron cultivadas en medio DMEM hasta que alcanzaban una confluencia de al menos 80%; entonces eran propagadas (enjuagues y raspado celular con PBS/EDTA) a cajas de cultivo nuevas con medio fresco y se utilizaban en los experimentos.

### 5.2 Ensayos de citotoxicidad (IC<sub>50</sub>)

#### 5.2.1. Material para el ensayo de MTT

- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Reactivo de MTT [2.5 mg/mL] (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio) disuelto en PBS/EDTA estéril.
- Taxol (Paclitaxel) [0.25 µM].
- Medio DMEM.

- Cumarina A/AA (cumarina) disuelta en DMSO a diferentes concentraciones. La cumarina A/AA fue obtenida en el laboratorio del Dr. Reyes-Chilpa, en el Instituto de Química, UNAM.
- Placas tipo ELISA de 96 pozos.
- 

### 5.2.2. Ensayo de MTT (Mosmann, 1983)

Para evaluar la citotoxicidad el compuesto cumarina A/AA se utilizó la técnica colorimétrica de MTT. El fundamento de esta técnica consiste en que las mitocondrias activas de células viables reducen la sal de tetrazolio (MTT) a cristales de formazán solubles en DMSO. Esta reducción se puede medir mediante un espectrofotómetro porque hay un cambio de color de amarillo intenso a morado oscuro.

### 5.2.3. Procedimiento de la técnica MTT.

- Se sembraron ~6,000 células en cada pozo de la placa de 96 y se completó cada pozo hasta un volumen de 200  $\mu$ L con medio DMEM fresco.
- Se incubaron por 24 horas a 37°C bajo las condiciones normales de cultivo mencionadas en párrafos anteriores.
- Se prepararon diluciones seriales del fármaco [1,5,10,20,40 y 60]  $\mu$ M en medio DMEM.
- A las 24 horas de incubación se adicionaron 50  $\mu$ L de estas soluciones de cumarina A/AA a cada pozo. Como controles negativos se agregaron en los pozos respectivos: 50  $\mu$ L de medio DMEM fresco, 50  $\mu$ L de DMSO disuelto en medio DMEM (la cantidad de DMSO fue determinada como el volumen más alto que se utilizó para disolver la mayor concentración de fármaco en cada experimento); como control positivo se disolvió Taxol en medio DMEM para una concentración final de 0.25  $\mu$ M en cada pozo.
- Se incubaron las células por 48 y 72 h.
- Después de los tiempos de incubación correspondientes se retiró el medio y se adicionaron 180  $\mu$ L de medio DMEM fresco y 20  $\mu$ L del reactivo MTT.

- Las células se incubaron 4 horas bajo las condiciones ya mencionadas y, transcurrido este tiempo, se retiró el medio/MTT y se disolvieron los cristales de formazán en 250  $\mu$ L de DMSO.
- La absorbancia se leyó en un lector de ELISA a 550 nm.
- Se calculó el porcentaje de inhibición para cada concentración de fármaco y para los controles tomando como referencia la absorbancia máxima del control negativo “medio”. La fórmula empleada para el porcentaje de inhibición es: %inh = 100-(100 \* absorbancia observada / absorbancia del control negativo).
- La IC<sub>50</sub> se determinó utilizando el programa de cálculo *OriginPro 7.0* (RockWare, Inc) y ajustando los datos a una curva sigmoideal.

### 5.3 Determinación de la fragmentación de ADN por TUNEL (*Tdt-mediated dUTP Nick End Labeling*)

#### 5.3.1. Material y reactivos para el ensayo de TUNEL

- Paquete comercial para la técnica de TUNEL (*in situ cell death detection kit, fluorescein, Roche*<sup>®</sup>)
- Taxol 0.25  $\mu$ M
- DMSO
- Cumarina A/AA (30  $\mu$ M) disuelta en DMSO
- ADNsa (1  $\mu$ g/mL)
- Paraformaldehído al 4%
- PBS estéril y frío
- Tritón X-100 al 0.1% en citrato de sodio 0.1%
- Medio de montaje *Dako*
- Solución bloqueadora (0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol)
- Cajas de reacción de 12 pozos
- Bisturí, pinzas, pipetas, cubreobjetos y portaobjetos estériles.

### 5.3.2. Ensayo de TUNEL de Gorczyca W. *et al.*, 1993.

Para determinar si el tratamiento con cumarina A/AA induce fragmentación del núcleo (endonucleólisis) se utilizó la técnica de TUNEL cuyo fundamento es que la enzima **desoxinucleotidil-transferasa Terminal (TdT)** cataliza la adición molde-independiente de nucleótidos modificados (en este caso marcados con fluoresceína) a los extremos 3'-OH de ADN de cadena sencilla y doble. De esta manera quedan marcados por fluoresceína los fragmentos de ADN producto de la degradación nuclear y éstos pueden ser detectados por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo.

### 5.3.3. Procedimiento.

- Las células se sembraron a una densidad de 400,000 en cajas de 6 cms en las que se colocaron 5 cubreobjetos y 4 mL de medio DMEM. Así se incubaron durante 24 hrs. Se consideraron los controles DMSO (disolvente) y taxol 0.25µM.
- Después de la incubación se agregó la cumarina A/AA 30µM, el DMSO o el taxol a las cajas correspondientes y se incubó con los compuestos respectivos por 12, 15, 20, 24, 48 y 72h. A la hora indicada se retiró el medio y se fijaron las células utilizando paraformaldehído al 4%.
- Se retiró el paraformaldehído y se lavaron los cubreobjetos con PBS frío.
- Los cubreobjetos se colocan en cajas de reacción y se incuban con los reactivos correspondientes: para el control positivo de la técnica se utiliza ADNsa (1µg/mL) y para el control negativo se ponen todos los reactivos excepto la TdT.
- Se vuelve a lavar con PBS y se bloquea con CH<sub>3</sub>OH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Se hace otro lavado con PBS y se permeabiliza por 2' en cama de hielo utilizando tritón X-100 0.1% en citrato de sodio 0.1%.
- Se lava con PBS y se agrega la mezcla de TUNEL con la que se dejan incubando las muestras por 1hr a 37°C, en cámara húmeda.
- Se lava dos veces más con PBS y se montan los cubreobjetos con medio de montaje DAKO. Las muestras se deben guardar a 4°C y fuera de la luz.

- La detección del ADN fragmentado se realiza en un microscopio de fluorescencia.

5.4 Evaluación de la morfología celular. Para determinar cómo cambia la morfología cuando las células son tratadas con el compuesto cumarina A/AA se realizaron tinciones con hematoxilina-eosina

5.4.1. Material y reactivos para la técnica de hematoxilina eosina.

- Hematoxilina en solución acuosa
- Eosina en solución acuosa.
- Cajas de reacción
- PBS
- Etanol al 70, 80, 96 y 100%
- Xilol
- Resina de montaje

5.4.2. Tinción con hematoxilina-eosina

Esta técnica para la observación de la morfología de muestras fijas se basa en que los núcleos y otros componentes celulares basofílicos se tiñen de azul intenso con la hematoxilina. En cambio, el citoplasma se tiñe de rojo o rosado con la eosina.

5.4.3. Procedimiento de la técnica de hematoxilina-eosina.

- Las células previamente fijadas se lavan en PBS, 2 veces, por 5' cada vez.
- Se retira el PBS y se lava con agua destilada.
- Se tiñe con hematoxilina por 4' y se lava varias veces con agua destilada.
- Se tiñe con eosina por 3'y se lava 3 veces con etanol absoluto.
- Se pasan las muestras por un *tren de deshidratación* de etanol al 40, 80 96 y 100%, por 2' en cada alcohol.
- Los cubreobjetos se pasan dos veces por xilol rápidamente.
- Se monta en resina, sobre portaobjetos.
- La morfología se observa en microscopio de luz invertido.

## 5.5 Análisis de la distribución del ciclo celular en células HeLa.

Para determinar cómo cambia la distribución del ciclo celular al tratar a las células con cumarina A/AA se realizaron análisis de citometría de flujo.

### 5.5.1. Material y reactivos para la técnica de citometría de flujo.

- Etanol al 70%
- PBS pH 7.4
- PBS/EDTA pH 7.4
- Solución de ioduro de propidio (PI) 0.02 mg/mL.
- Citómetro FACScan (Beckton-Dickinson).
- 6

### 5.5.2 Procedimiento de la técnica de citometría de flujo.

- Se tratan las células a la concentración de compuesto indicada y se cultivan por los tiempos determinados. En cada tiempo de interés, se recolectan las células. Para recolectar en cada punto se despegan con 2 mL de PBS/EDTA.
- La suspensión se pasa a un tubo de poliestireno y se centrifuga a 1500 rpm por 5'. Se descarta el sobrenadante y el botón celular se conserva en una mezcla de 9 mL de etanol frío al 70% y 1 mL de PBS frío. Se conservan las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.
- Para analizar las muestras en el citómetro se centrifugan a 1500 rpm por 5' y se decanta el sobrenadante. El botón celular se lava en 5 mL de PBS frío y se resuspende suavemente. Se centrifuga de nuevo a 1500-2000 rpm por 5' y se desecha el sobrenadante.
- El pellet resultante se resuspende en 1 mL de solución de PI 0.02 mg/mL (la solución se prepara al momento de uso). La resuspensión celular se mantiene en hielo hasta su análisis.

La captura de datos se realizó en un aparato FACScan (Beckton-Dickinson) en el Instituto Nacional de Cáncerología.



## 5.6 Análisis de expresión de proteínas por la técnica de Western Blot (Towbin, H. 1979)

### 5.6.1 Material y reactivos

- Buffer de lisis (DTT 1mM, Tris Hcl 10 mM, Glicerol 30%, EDTA 1mM, Tritón X-100 1%, leupeptina 5µg/mL, aprotinina 5µg/mL, pesptatina 2µg/mL, PMSF 1mM, ortovanadato 1mM, azida de sodio 15 mM).
- Gel de acrilamida, solución amortiguadora de carga con β-mercaptoetanol y cámara para realizar el corrimiento electroforético.
- Membranas de transferencia Hybond™-ECL™ de Amershan Biosciences y membranas Immobilon™-P de Millipore.
- Equipo de transferencia semilíquida Trans-Blot® SD de BIO-RAD.
- TBS pH 7.4, TBS-Tween® 0.1%, soluciones amortiguadoras de corrida y de transferencia.
- Placas Hyperfilm™ ECL para detección por quimioluminiscencia de Amershan Biosciences.
- Reactivos de detección quimioluminiscente ECL™ de Amersham Biosciences.
- Solución de revelado y fijado de Kodak.
- Anticuerpos primarios para detectar PARP (F-2), Bcl-2 (C-2), caspasas 3 p20 (N-19) y caspasa 3 (E8); Bax (B-9), p53 (D0-1), actina (c-11) y AIF (D-20). Anticuerpos secundarios anti-cabra y anti-ratón. Todos los anticuerpos utilizados de la casa comercial Santa Cruz Biotechnology, Inc. Todos los anticuerpos fueron disueltos en TBS-Tween®.
- 

### 5.6.2 Procedimiento de la técnica de Western Blot.

- Las muestras de células tratadas se lisan con la solución amortiguadora de lisis, se incuban 30' en hielo y se centrifugan a 12,000 rpm a 4°C. Se conserva el sobrenadante y se desecha el botón celular.
- La cantidad de proteína se determina por el método de Bradford y con el reactivo de Bio-Rad para cuantificación.

- Las muestras se preparan para la electroforesis en amortiguador con  $\beta$ -mercaptoetanol y se hierven por 5' en baño María.
- Se carga la cantidad deseada de proteína y se corre el gel SDS-PAGE.
- Se transfieren las proteínas a la membrana por método semi-seco y se bloquea con leche 10% en TBS-Tween por 10'-2h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
- Se hacen lavados con TBS-Tween y se agregan los anticuerpos por separado. Las membranas se incuban con el anticuerpo primario por 1-2h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en agitación constante.
- Se agrega la dilución de anticuerpo secundario, se lava en TBS-Tween.
- Las membranas se tratan con el reactivo de detección ECL y se exponen las placas sensibles a las membranas tratadas.
- Se revelan las placas.
- Se cuantifica la intensidad de banda en el programa Kodak ID 3.6 y se calcula la expresión relativa de cada proteína.

•

5.7 Fraccionamiento subcelular para el estudio de la liberación de AIF en diferentes fracciones celulares.

5.7.1. Material y reactivos para el fraccionamiento subcelular.

- *Buffer isotónico para mitocondrias (pH 7.5)*
  - manitol 210 mM
  - sacarosa 70 mM
  - EDTA 1 mM
  - HEPES 10 mM
  - Mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Biochemicals)
- *Buffer de lavado para mitocondrias (pH 7.5)*
  - Tris HCl 10 mM
  - EDTA 1 mM
  - Sacarosa 250 mM

- Mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Biochemicals).
- Jeringas para insulina de 1 mL (0.50 mm); 25G x 16 mm
- Buffer de lisis para extracción de proteínas.
- Material descrito para Western Blot.
- Anticuerpo para detección de la proteína AIF (anti-AIF D-20, sc-9916, goat polyclonal) de Santa Cruz Biotechnology, Inc).
- 

#### 5.7.2 Procedimiento para la técnica de fraccionamiento subcelular.

**A) Fraccionamiento Subcelular** (modificado de Arnoult, D., 2002 y García-Trejo, J.J. 2000).

- Las células HeLa fueron cosechadas (95-100% de confluencia) y subcultivadas a una densidad de  $3.3 \times 10^6$  células en cajas de Petri. Posteriormente se incubaron 24 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Después de este periodo de incubación, las células fueron tratadas con cumarina A/AA 30µM o DMSO 0.28%.
- Las células tratadas con A/AA o control disolvente (DMSO) se cosecharon con PBS-EDTA y con gendarme estéril a 12, 15, 20 o 24 horas de tratamiento. La suspensión de tres cajas ( $10 \times 10^6$ ) con el mismo tratamiento se colectó a un tubo de poliestireno frío y estéril (15 mL) y se centrifugó a 1500 rpm por 5' a 4°C.
- El botón celular obtenido se resuspendió en 1 mL de buffer isotónico para mitocondrias y se homogenizó con jeringa para insulina 35 veces sobre una cama de hielo.
- La suspensión se pasó a un tubo de 1.9 mL y se centrifugó a 1500 x g, 4°C por 10'.
- El sobrenadante de esta centrifugación se separó y se guardó en un tubo de 1.9 mL, en cama de hielo. El botón celular se volvió a resuspender 35 veces con la jeringa para insulina en 1 mL del buffer isotónico.
- Esta mezcla se vuelve a centrifugar a 1500 x g, 4°C, por 5'.

- El sobrenadante se juntó con el del pasó anterior y el botón celular (células completas y núcleos) se desechó.
- Los sobrenadantes se centrifugan a 10, 000 x g, 4°C, por 20´.
- El sobrenadante de esta centrifugación corresponde a la fracción citosólica y se guarda a -70°C.
- El botón corresponde a la fracción mitocondrial y se resuspende en 1 mL de buffer de lavado de mitocondrias y se centrifuga a 10,000 x g, 4°C por 15´.
- El sobrenadante se descarta y el botón mitocondrial se resuspende en 500 µL de buffer de lavado de mitocondrias y se almacena a -70°C.

#### **B) Localización subcelular de proteínas citoplásmicas y mitocondriales.**

- Las muestras de mitocondria resuspendidas en buffer de lavado se centrifugan una vez más a 10,000 x g, 4°C por 20´ y el botón mitocondrial se lisa con jeringa para insulina utilizando 100 µL de buffer de lisis para extracción de proteínas.
- Las muestras lisadas se incuban en una cama de hielo por 1h.
- Se centrifugan a  $12.5 \times 10^3$  rpm, 4°C por 1h.
- El sobrenadante se cuantifica por la técnica de Bradford.
- Las muestras de citoplasma se cuantifican directamente por la técnica de Bradford.
- Las fracciones citosólica y mitocondrial se cargaron en un gel de SDS-PAGE (10%) y la proteína AIF se detectó por inmunoblot como se describe en la sección 5.6.2.

#### 5.8. Estadística.

Utilizando el programa *Prism 3.0* de GraphPad, se realizó una prueba *t* de Student para la comparación entre grupos y se consideraron estadísticamente significativas las diferencias de  $P < 0.05$ .

## II. Resultados

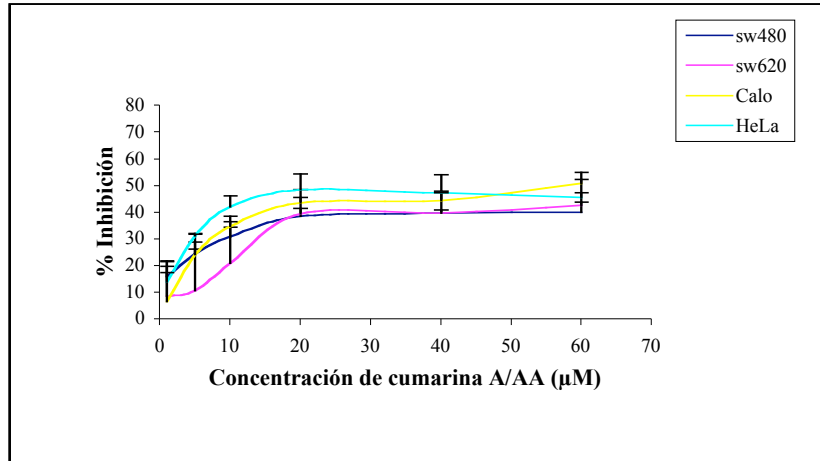
### 6.1 Actividad citotóxica de la cumarina A/AA en las líneas celulares HeLa y Calo (cáncer cérvico-uterino); SW-480 y SW-620 (cáncer colorrectal). *Tabla 3, gráficas 1, 2 y 3*

Se realizaron 3 experimentos independientes para la determinación de la IC<sub>50</sub> en cada línea celular. A continuación se presenta una tabla con los promedios de estas IC<sub>50</sub>. Después de calcular la IC<sub>50</sub> para células tumorales, se procedió a probar al compuesto en células normales. Se realizaron 4 experimentos independientes para determinar si la cumarina A/AA tenía algún efecto tóxico en un modelo de linfocitos normales extraídos de sangre periférica. En la *gráfica 3* se compara el porcentaje de inhibición para los linfocitos normales a una concentración de 100 μM del compuesto contra el porcentaje de inhibición en células HeLa a una concentración de 80 μM.

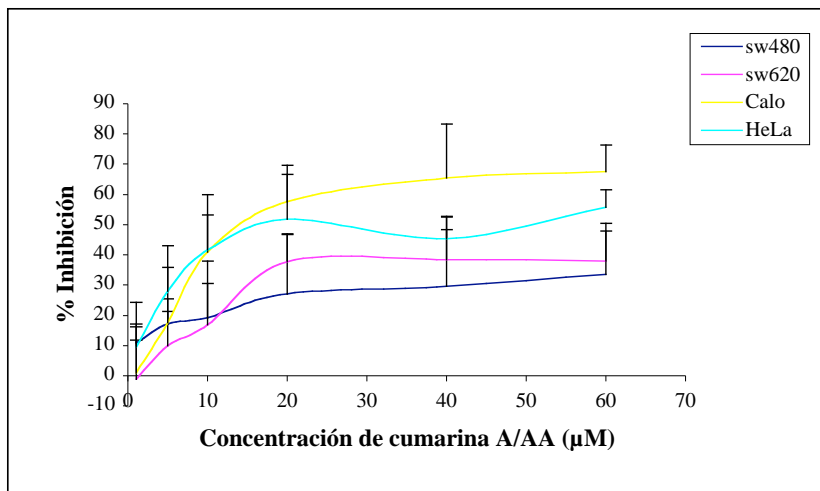
Se probó un rango de concentraciones de 10, 30 60 y 100 μM en linfocitos y se observó un comportamiento similar en los cuatro experimentos. El compuesto no tuvo efecto en la actividad metabólica de los linfocitos cuando se comparó con el control disolvente. Hasta una concentración alta (100 μM) se pudo ver el efecto citotóxico de la cumarina sobre los linfocitos, alcanzando un porcentaje de inhibición máximo de 24.2% a las 48h de tratamiento. No se alcanzó la IC<sub>50</sub> con ninguna de las concentraciones probadas. Dado que la línea celular más sensible al tratamiento con la cumarina A/AA fue HeLa, para los experimentos siguientes se utilizaron estas células tratadas con A/AA 30μM, concentración a la cual el compuesto ejercía un efecto citotóxico sostenido.

*Tabla 3.* Actividad citotóxica de la cumarina A/AA

Línea celular	IC <sub>50</sub> (μM)	
	48 h	72 h
Calo	65.6 ± 4.1	15.3 ± 5.7
HeLa	65 ± 2.8	13.3 ± 8.2
SW480	75 ± 2.6	74 ± 9.2
SW620	73.5 ± 5.2	65.4 ± 4.6

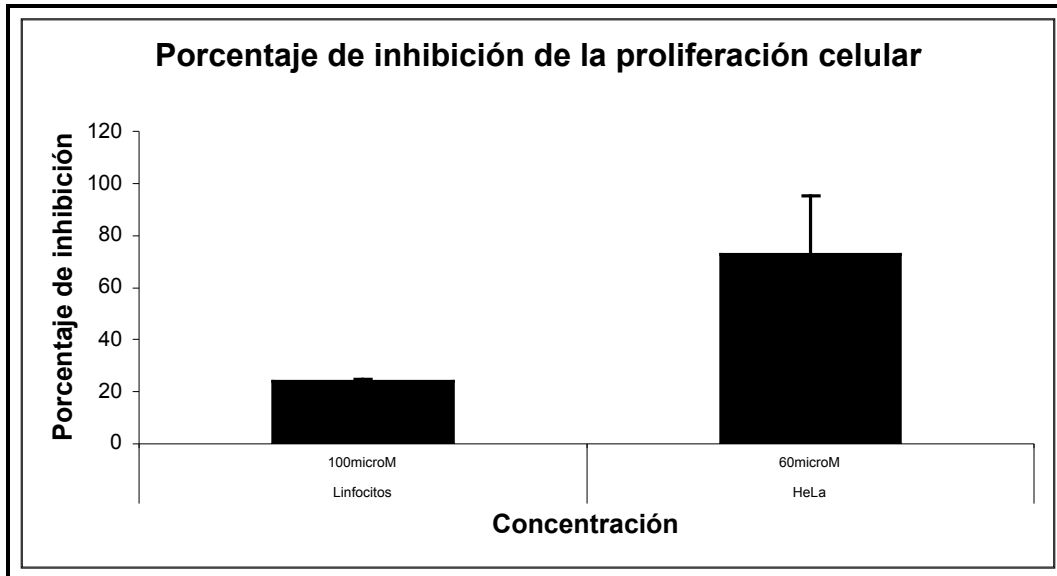


Gráfica 1. Efecto citotóxico de la cumarina A/AA determinado en las líneas Calo, HeLa, SW480 y SW620, por la técnica de MTT, a las 48 horas de tratamiento. Las barras indican la desviación estándar. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes para SW480 y SW620 y 2 experimentos independientes para HeLa y Calo



Gráfica 2. Efecto citotóxico de la cumarina A/AA determinado en las líneas celulares Calo, HeLa, SW480 y SW620 a las 72 horas de tratamiento, mediante la técnica de MTT. Las barras indican la desviación estándar. Los resultados son promedio de 3 experimentos independientes para SW480 y SW620 y 2 experimentos independientes para HeLa y Calo.

## 6.2 Efecto de la cumarina A/AA en linfocitos . Gráfica 3.



Gráfica 3. Promedios de los porcentajes de inhibición para células HeLa (n=2) y linfocitos normales (n=3) a 48 h de tratamiento. Para células HeLa el porcentaje de inhibición es resultado de 2 experimentos independientes a una concentración de cumarina A/AA de 60  $\mu$ M. Para los linfocitos el porcentaje de inhibición es resultado del promedio de 3 experimentos independientes a una concentración de 100 $\mu$ M.

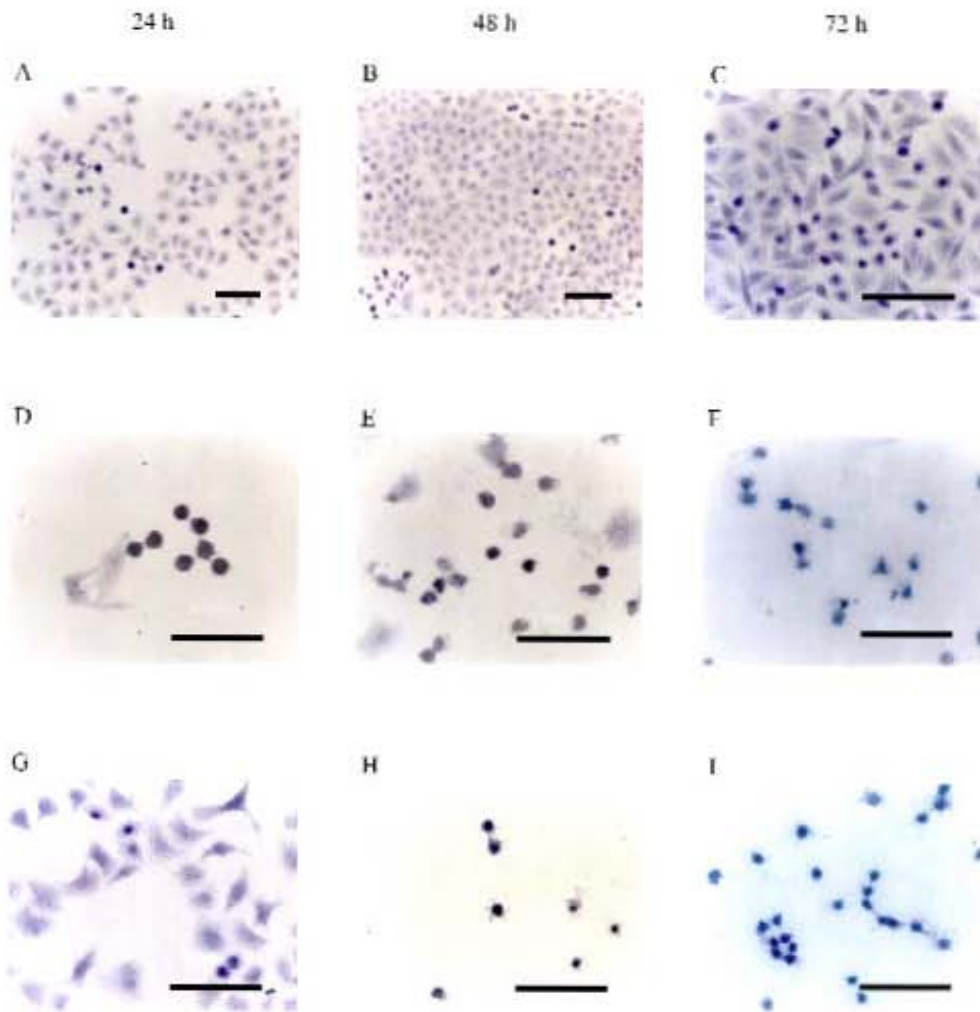
### **6.3 Efecto de la cumarina A/AA en la morfología de células HeLa. *Figura 3.***

Una de las características morfológicas distintivas de la apoptosis es la condensación de la cromatina (Gorczyca, W. 1998). Esta condensación se puede observar como una hipercromicidad muy homogénea del ADN en el núcleo de las células apoptóticas y se evidencia al teñir con hematoxilina y eosina.

A las 24 h de tratamiento con cumarina A/AA (*figura 3G*) se observa una morfología normal: células romboides y en monocapa, igual a la de las células sin tratamiento (*figura 3A-3C*). Desde las 48 y hasta las 72 h (*figura 3H-I*) de tratamiento se puede observar que las células han perdido tamaño debido a la deshidratación; también se observa que la cromatina se ha condensado y ocupa la mayor parte de la célula dando como resultado la hipercromicidad del ADN.

Las células tratadas con taxol (compuesto inductor de apoptosis en esta línea celular) a una concentración de 0.25  $\mu\text{M}$ , presentan núcleos hiperpicnóticos, reducción de tamaño, pérdida de la adhesión al plástico, contorno celular esférico y condensación de la cromatina que se deduce de la marcada tinción en las zonas nucleares que, debido a la pérdida de agua, ocupan la mayor parte del área de la célula. Todos estos cambios se aprecian desde las 24 horas de tratamiento (*figura 3D-3F*).





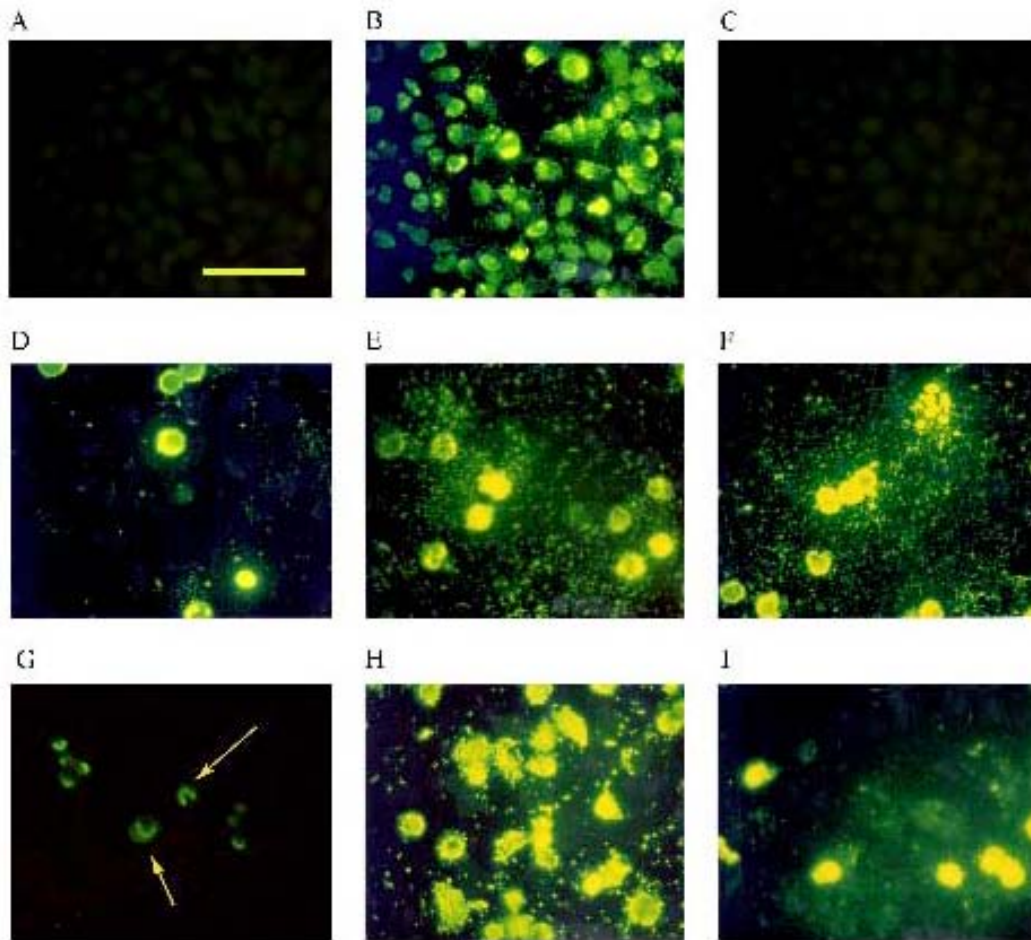
*Figura 3. Análisis de la morfología celular mediante la tinción con hematoxilina-eosina. Las células HeLa se cultivaron durante 24 horas en condiciones estándar. Después de este tiempo se trataron con DMSO (0.15%), taxol [0.25 $\mu$ M] como control positivo o cumarina A/AA [30 $\mu$ M)]. Posteriormente las células se cosecharon y fijaron en paraformaldehído al 4% y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina como se describe en materiales y métodos. **A-C**: DMSO; 24, 48 y 72h de tratamiento, respectivamente. **D-F**: Taxol, 24, 48 y 72h; **G-I**: Cumarina A/AA, 24, 48 y 72h de tratamiento, respectivamente. Barra=100 $\mu$ M.*

#### **6.4 Efecto de la cumarina A/AA sobre la fragmentación del ADN en células HeLa**

##### ***Figura 4.***

Las células HeLa se trataron por 12,15, 20, 24, 48 y 72 horas con cumarina A/AA [30  $\mu\text{M}$ ]. Para las 12, 15 y 20 horas de tratamiento no se obtuvo una reacción positiva con la técnica de TUNEL ni se observó alteración en la morfología normal de las células con respecto al control disolvente lo que indica que no hay fragmentación del ADN antes de las 20 horas de tratamiento (datos no mostrados). A las 24 horas de tratamiento (*figura 4-G*) se puede observar la condensación de la cromatina en un patrón de “herradura”. Este patrón de condensación se ha asociado a la fragmentación del ADN a gran escala.

Para las 48 horas de tratamiento ( *figura 4-H* ) es más evidente la fragmentación nuclear y la presencia de cromatina condensada y de posibles cuerpos apoptóticos. Para este tiempo de tratamiento la condensación de la cromatina ya ha perdido la forma de herradura y se observa más homogénea. A las 72 horas de incubación con la cumarina se evidencia el encogimiento celular y la fluorescencia homogénea del ADN, ambos sugerentes de una muerte celular programada (*figura 4-I*) El efecto positivo del taxol (0.25 $\mu\text{M}$ ) sobre la degradación del ADN es evidente desde las 24 horas de tratamiento y no cambia en intensidad en ninguno de los tiempos de tratamiento probados.

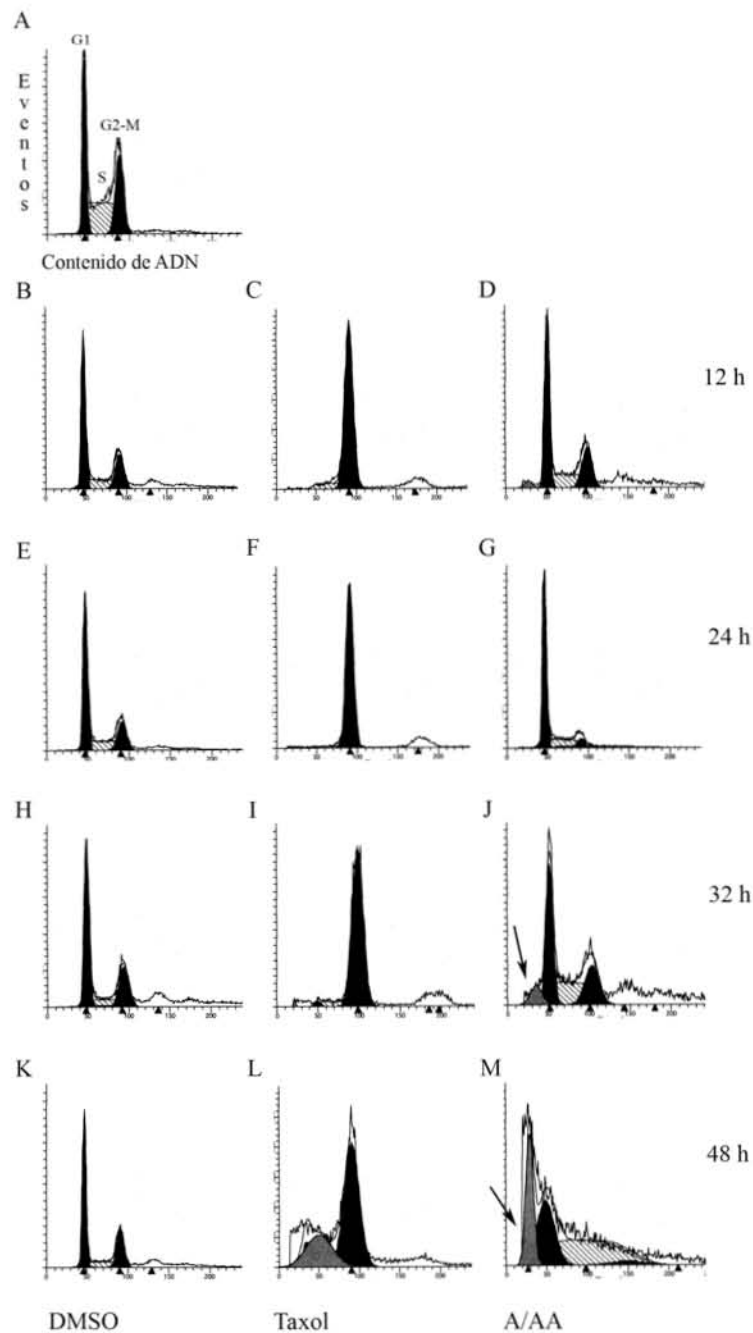


*Figura 4. Análisis de la fragmentación del ADN por la técnica de TUNEL. Las células HeLa se trataron con cumarina A/AA [30  $\mu$ M], taxol [0.25 $\mu$ M] o DMSO( 0.15%) por 12, 15, 20, 24 , 48 y 72 horas, como se indique en cada caso. **A:** control negativo de la técnica (sin TdT); **B:** control positivo de la técnica (con ADNasa); **C:** control disolvente (DMSO) 48h de tratamiento; **D:** control positivo (taxol) 24h de tratamiento; **E:** taxol 48h de tratamiento; **F:** taxol 72h de tratamiento; **G:** A/AA 24h de tratamiento; **H:** A/AA 48h tratamiento; **I:** A/AA 72h tratamiento. Las flechas señalan el ADN fragmentado en forma de herradura. Barra= 100 $\mu$ M.*

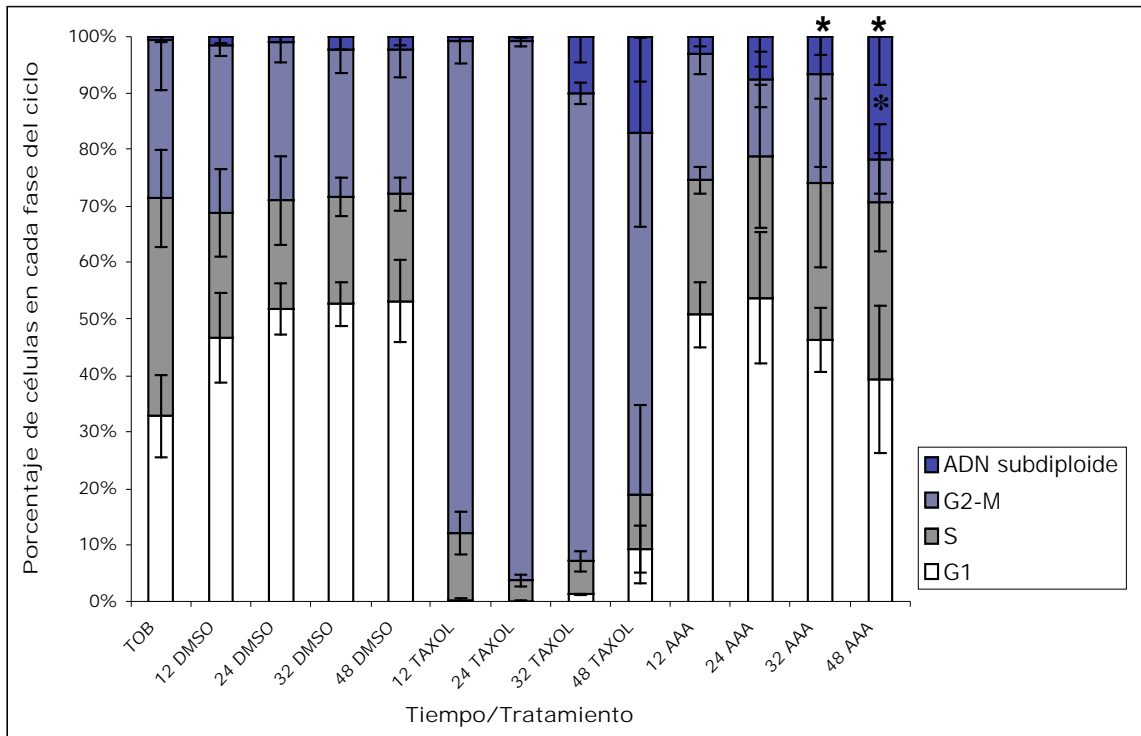
## 6.5 Efecto de la cumarina A/AA en la distribución de las fases del ciclo celular de HeLa. *Figura 5 y gráfica 4.*

En la *figura 5* se muestran los histogramas de las fases del ciclo celular de HeLa. Las células tratadas con cumarina A/AA 30 $\mu$ M (*figura 5-D,G*) presentan una distribución no alterada del ciclo celular al compararlas con el control (*figura 5-B,E,H,K*), hasta las 24h de tratamiento. A partir de las 32h, en las células tratadas con cumarina A/AA se puede ver que hay un aumento muy evidente del contenido de ADN subdiploide y que este incremento es dependiente del tiempo (*figura 5-J,M*) ya que a 48h el pico más pronunciado corresponde a ADN fragmentado. El taxol, al activar el punto de control de la fase M, causa un arresto en G<sub>2</sub>M que es evidente desde las 12h de tratamiento (*figura 5-C*). Este arresto puede llevar a un proceso apoptótico o bien provocar que la célula salga de la fase M y, sin dividirse, pase a una fase G<sub>1</sub> en estado tetraploide. Sin embargo, en las células tratadas con cumarina A/AA no se observa arresto precediendo la aparición del pico subdiploide, a diferencia del taxol, donde el pico subdiploide sólo aparece después del arresto que se mantiene a lo largo del tratamiento.

Los datos de los histogramas se integran en la *gráfica 4* donde se aprecian los mismos resultados de una forma más esquemática. En esta gráfica es más evidente el incremento del ADN fragmentado a lo largo del tratamiento con cumarina A/AA así como la relativa conservación en la distribución de las otras fases. Mediante el análisis citométrico se determinó que las fases que sufren cambios estadísticamente significativos con respecto al control son la fase S y la porción sub-diploide.



*Figura 5. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. A. Células HeLa sin tratamiento, 24 horas de cultivo (T0). B, E, H, K. Control disolvente (DMSO, 0.15%). C, F, I, L. Control positivo. Células HeLa tratadas con taxol [0.25  $\mu$ M]. D, G, J, M. Células HeLa tratadas con cumarina A/AA [30  $\mu$ M]. La figura muestra un resultado representativo de tres experimentos independientes. G<sub>1</sub>= Fase G1 del ciclo celular; G<sub>2</sub>-M= Fase G2-mitosis; S= fase de síntesis del ciclo celular. Las flechas indican la acumulación de ADN fragmentado en las células tratadas con cumarina A/AA.*



Gráfica 4. Porcentaje de células HeLa en cada fase del ciclo celular. Las células se trataron con DMSO (0.15%), taxol [0.25  $\mu$ M] o cumarina A/AA [30  $\mu$ M]. Los resultados muestran los promedios de tres experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. Las diferencias significativas se obtuvieron mediante una prueba *t* de Student y se indican con un asterisco para valores de  $P < 0.05$ .

TOB= Distribución de fases al inicio del experimento, en células sin tratamiento.

## 6.6 Efecto de la cumarina A/AA en la expresión de proteínas que participan en los programas de muerte celular programada. Figuras 6-8.

Mediante la técnica de Western Blot, y como se describe en materiales y métodos, se analizaron algunas proteínas que podrían participar en la muerte de las células HeLa inducida por la cumarina A/AA.

Bax es una proteína apoptogénica de la familia Bcl-2. Se encontró que la expresión de Bax aumenta con respecto al control (DMSO) ante la inducción de muerte por la cumarina A/AA. El incremento en la expresión de Bax se observa desde las 12h de tratamiento y continúa hasta las 24h. Por el contrario, la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (familia Bcl-2) disminuye a las 24h de tratamiento con la cumarina. En tiempos previos de tratamiento (12-20 horas) no se observaron cambios en la expresión de la proteína (figura 6).

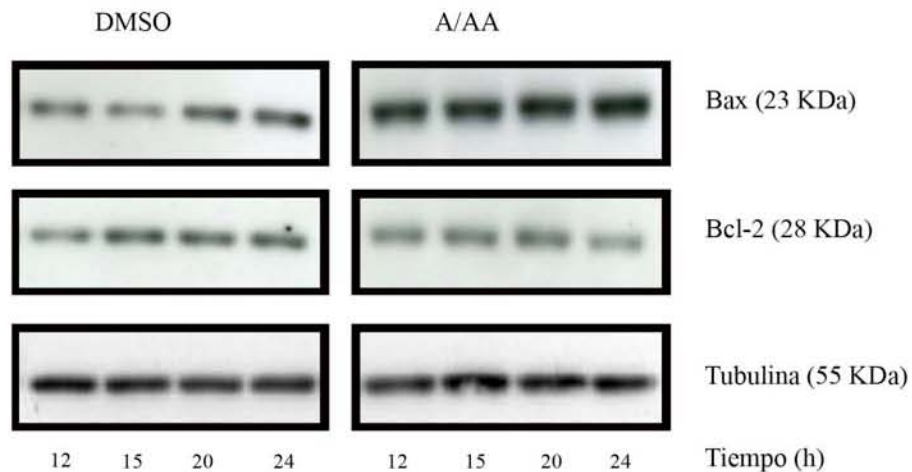
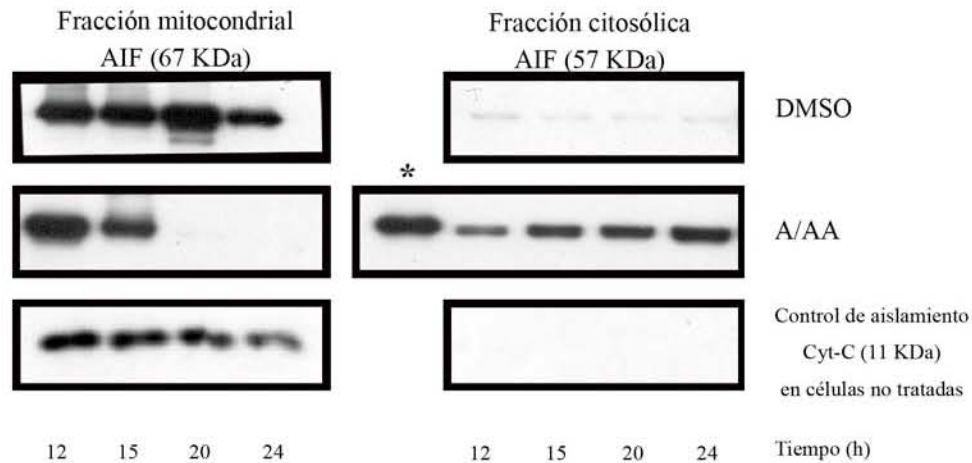


Figura 6. Expresión de Bax y Bcl2 por la técnica de Western Blot. En esta figura se puede observar el incremento de la expresión de Bax (panel superior) con respecto al control disolvente (DMSO), desde las 12 horas de tratamiento. En el panel de en medio se muestra la disminución de la expresión de Bcl2 con respecto al control, a las 24 h de tratamiento. Como control de carga se utilizó  $\alpha$ -tubulina (panel inferior). Los experimentos se realizaron con 25  $\mu$ g de proteína total. Se muestra un resultado representativo de dos experimentos independientes

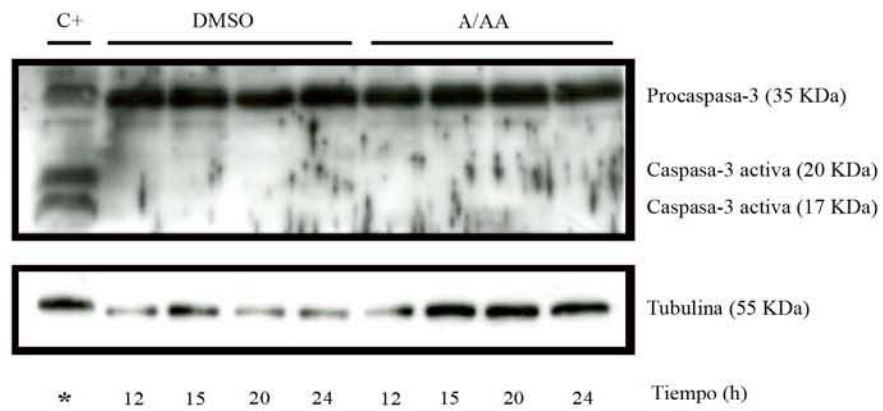
Posteriormente se analizó la expresión de la proteína AIF en extractos puros de mitocondrias aisladas de células HeLa tratadas con cumarina A/AA así como los cambios en la expresión de esta proteína en la fracción citosólica durante un periodo de 12 a 24 horas. El control disolvente no tiene efecto sobre la distribución de AIF, la cual se encuentra en su mayor parte en la mitocondria de células sanas (*figura 7*, panel superior izquierdo) a lo largo del tiempo de exposición. Ante el estímulo con la cumarina A/AA se puede observar un decremento en la expresión de AIF en la fracción mitocondrial a partir de las 15 horas de tratamiento; por el contrario, en la fracción citosólica se puede observar un aumento en la expresión a partir de las 12 horas con respecto al control de fracción citosólica sin tratamiento (*figura 7*, panel superior, lado derecho).



*Figura 7. Análisis de la expresión de AIF mediante la técnica de fraccionamiento subcelular y Western Blot.* La figura muestra la expresión mitocondrial de la proteína AIF (67 KDa) en extractos de células expuestas al control disolvente (panel superior, izquierda) y su expresión basal en la fracción citosólica (panel superior, derecha). Al inducirse la muerte celular con cumarina A/AA, la expresión de AIF disminuye en la fracción mitocondrial (panel de en medio, izquierda) y aumenta en la fracción citosólica (panel de en medio, derecha), lo que indica que AIF se está liberando hacia el citosol. En el panel inferior se presenta la expresión del citocromo-c como un control de aislamiento para el experimento (en células sanas, el citocromo-c se encuentra restringido al espacio intermembranal de la mitocondria). Se utilizaron 15 µg de proteína citosólica y mitocondrial para todos los experimentos de liberación de AIF. Como control positivo se trató a las células con *staurosporina* [200 nm], un compuesto que induce la liberación de AIF en células HeLa en cultivo. La figura muestra un resultado representativo de dos experimentos independientes.



También se analizó la aparición de la forma activa de la procaspasa-3 en células tratadas con la cumarina A/AA en un periodo de 12 a 24 horas de exposición. Los datos se compararon con un control positivo de apoptosis en el que se sabía con certeza que la caspasa-3 estaba activada y rendía dos fragmentos característicos (subunidades p17 y p20). En la *figura 8* es evidente que la caspasa-3 no está activada en ninguno de los tiempos de exposición a la cumarina A/AA ni al control disolvente ya que no se detectaron las bandas correspondientes a la forma activa de la enzima.



*Figura 8. Análisis de la expresión de las subunidades activas de la caspasa-3 por la técnica de Western Blot. Se muestra la expresión de la procaspasa-3 (banda superior, panel superior) y sus formas activas, p17 y p20, (bandas inferiores, primer carril del panel superior) en un control positivo de apoptosis clásica (tejido de útero de rata en estro a las 06 :00 hrs.); también se muestra la expresión de la procaspasa-3 en extractos de proteína total de células HeLa expuestas al control disolvente (DMSO) o a la cumarina A/AA 30  $\mu$ M (bandas 2-9, panel superior). Nótese la ausencia de las formas activas de la caspasa 3 en los extractos tratados con la cumarina y con el control negativo. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga del experimento (panel inferior). Para el control positivo de apoptosis se utilizaron 120  $\mu$ g de proteína total; para el control negativo (DMSO) y el tratamiento (A/AA) se cargaron 25  $\mu$ g de proteína total. En la figura se muestra un resultado representativo de dos experimentos independientes.*

## VII. Discusión

La caracterización de la MCP se ha convertido en un área principal de estudio dentro de la búsqueda de nuevas terapias antitumorales. La inducción de la apoptosis es uno de los mecanismos de acción mejor establecidos para diferentes fármacos antitumorales (Makin, G., *et al.* 2000; Jäättelä, M., *et al.* 2004), sin embargo, éste no es el único mecanismo de acción de los compuestos quimioterapéuticos. Dado que uno de los principales problemas que limitan los alcances de la quimioterapia es la resistencia a la apoptosis por diferentes factores, como la presencia del gen de multiresistencia a drogas (*mdr*) o las mutaciones en genes que regulan las rutas de muerte (Tainton, K.M., *et al.* 2004), resulta de gran importancia describir detalladamente las rutas de muerte alternas y conocer qué compuestos pueden activarlas.

En el presente trabajo se demostró que la cumarina A/AA es citotóxica en las líneas celulares humanas HeLa y Calo de cáncer cérvico-uterino y SW-480 y SW-620 de cáncer colorrectal. Adicionalmente, se hicieron experimentos en los que se comprobó que la toxicidad de esta cumarina es menor para PBMCs normales. Posteriormente se describió el mecanismo de acción antitumoral de este compuesto en la línea celular HeLa.

De acuerdo con lo reportado por Guilet, D., Finn, G.J., y Kawaii, S., *et al.* (2001) sobre la actividad citotóxica de diferentes tipos de cumarinas compuestas en distintas líneas tumorales y células normales, en este estudio se encontró que la cumarina A/AA es citotóxica en las líneas HeLa, Calo, SW-480 y SW-620, siendo HeLa la línea más sensible al tratamiento con el compuesto ( $IC_{50} = 13.3 \mu\text{M}$  a 72 h; *tabla 3, gráficas 1 y 2*). Adicionalmente, varios investigadores han establecido la importancia de la posición y la naturaleza de los sustituyentes químicos en relación con su actividad biológica, selectividad y capacidad de inducir MCP en diferentes líneas celulares tumorales y no-malignas (Jiménez-Orozco, *et al.*, 1999; Finn, G.J., *et al.* 2001; Kawaii, S., *et al.* 2001; López-González, *et al.* 2004). La A/AA tiene dos sustituyentes importantes para la actividad biológica: un grupo isopentil en la posición 8 y un grupo hidroxilo en la posición 7, además de otros tres sustituyentes para los que no se ha reportado su

importancia biológica directa (Kawaii, S., *et al.* 2001). De acuerdo a lo esperado, en el presente trabajo se encontró que la A/AA es citotóxica para cuatro líneas tumorales pero no tiene el mismo efecto en PBMCs (*gráfica 3*). Lo anterior sugiere que la cumarina A/AA tiene un efecto diferente sobre células normales y células tumorales y esta aparente actividad selectiva apoya su uso en experimentos posteriores *in vivo*. Sin embargo, esto requiere ser demostrado en células epiteliales de la misma estirpe.

En varios grupos de investigación se ha establecido que diferentes cumarinas compuestas citotóxicas inducen MCP por la vía apoptótica clásica (activación de caspasas, escisión de PARP, regulación a la alta de supresores tumorales y decrementos en la expresión de proteínas anti-apoptóticas) después de un arresto del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> y la acumulación de ADN subdiploide (Chia-Yih, Ch., *et al.* 2001; López-González, *et al.*, 2004; Finn, G., *et al.* 2003). Con el fin de establecer si la A/AA activaba la vía apoptótica, la primera aproximación experimental fue el análisis de la morfología de las células HeLa tratadas con el compuesto. De forma similar al control positivo para la inducción de apoptosis (taxol, 0.25  $\mu$ M), se encontró que la cumarina A/AA provoca cambios morfológicos típicos de una MCP (*figura 3*). A diferencia del taxol, que tiene un efecto temprano sobre la morfología de HeLa, la cumarina tuvo efecto hasta las 48 horas de tratamiento.

Aunque la morfología celular es una de las formas más comunes de establecer si un compuesto induce o no MCP, se sabe que los cambios más típicos pueden resultar de otros tipos de muerte (MCP tipo-apoptosis, MCP tipo-necrosis) o de la combinación de sus diferentes rutas (Jäättelä, M. 2004), por lo que el análisis a nivel bioquímico es importante en el esclarecimiento de estas vías. Por lo anterior, y dado que los cambios en la morfología de las células tratadas con la cumarina se evidenciaron hasta las 48 horas de tratamiento, se procedió a determinar si la exposición a la cumarina A/AA provocaba la fragmentación del ADN, característica distintiva de procesos de MCP.

Utilizando al taxol como control positivo para la fragmentación oligonucleosomal del ADN, condensación periférica de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos en

células HeLa (Maldonado, V., *et al.* 1996), se analizaron los cambios en la cromatina de esta línea celular tratada con cumarina A/AA 30  $\mu$ M. Se encontró que el tratamiento con la cumarina A/AA provoca dos tipos distintos de fragmentación nuclear de manera secuencial: a partir de las 24 horas de exposición al compuesto se puede observar la cromatina condensada en forma de “herradura” en la periferia celular; este efecto se observó sólo en pocas células siendo la mayoría negativas para la reacción de TUNEL. Posteriormente (48 horas de tratamiento), la cromatina compactada se observa más homogénea y se pueden apreciar posibles cuerpos apoptóticos (*figura 4*). Sin embargo, se ha reportado que durante procesos de MCP *in vitro* puede presentarse muerte celular por necrosis secundaria que trae consigo la permeabilización de la membrana plasmática (Proskuryakov, *et. al.* 2003). Por lo anterior, no es improbable que los pequeños cuerpos marcados sean ADN degradado y liberado hacia el espacio extracelular.

Adicionalmente, se sabe que en núcleos purificados de células HeLa la adición de la proteína AIF provoca “apoptosis nuclear etapa I”, que está caracterizada por un patrón de condensación periférico y fragmentación del ADN a gran escala (50 Kbs). En este mismo modelo, la “apoptosis nuclear etapa II”, caracterizada por fragmentación oligonucleosomal del ADN y condensación homogénea de la cromatina, sólo se presentó cuando se agregó CAD a los núcleos. CAD es un blanco clásico de la caspasa-3 y es responsable de la fragmentación oligonucleosomal característica de las muertes por apoptosis clásica (Susin, S., *et al.* 2000). En la *figura 4* se muestra una condensación periférica a las 24 horas de tratamiento y una condensación homogénea a las 48 horas. En un escenario similar al descrito para los núcleos purificados de células HeLa, la cumarina A/AA podría inducir la activación de la apoptosis nuclear etapa I y II de manera secuencial.

Por otra parte, existen reportes en los que se demuestra que la MCP o la actividad antiproliferativa va acompañada de un arresto previo del ciclo celular, hecho que lleva a la subsecuente acumulación de ADN subdiploide, como se ha demostrado en la línea de cáncer gástrico TGBC11TKB tratada con esculetina (Kawaii, S., *et al.* 2001). En esta línea, el tratamiento con esculetina provoca un arresto del ciclo celular en la fase G<sub>1</sub> de

forma dosis-dependiente. De manera similar, la 6-nitro-7-hidroxycumarina provoca un arresto en la fase S del ciclo celular antes de activar la vía de la apoptosis en células de carcinoma renal humano A-498 (Finn, G., *et al.* 2003). La decursina, otra cumarina compuesta, (C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>) activa la apoptosis y provoca un arresto en la fase G<sub>1</sub> a partir de las 12 horas de tratamiento (Yim, D., *et al.* 2005). Adicionalmente, López-González, J., *et al.* (2004) también concluyeron que la inhibición del crecimiento celular por la 7-hidroxi-cumarina en células NSCLC de carcinoma pulmonar humano es dependiente de la dosis y posterior a un arresto del ciclo en G<sub>1</sub>.

Con el fin de comprobar si un arresto previo en el ciclo celular también participaba en la inducción de MCP en las células HeLa tratadas con la cumarina A/AA, se analizó la distribución de las fases del ciclo celular a diferentes tiempos de exposición. En este estudio se pudo observar que a partir de las 32 horas de exposición al compuesto hay un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de células con ADN subdiploide. Resulta interesante que la distribución de fases del ciclo no se ve alterada hasta las 32 horas de tratamiento y que la diferencia más notable entre fases es consecuencia de la fragmentación del ADN y no de un arresto en el ciclo celular. Contrario a las investigaciones anteriores en las que la muerte celular o el efecto antiproliferativo es posterior a la alteración de las fases del ciclo, el efecto citotóxico de la cumarina A/AA parece no estar mediado por modificaciones en el ciclo celular, lo que representa un antecedente novedoso en lo que respecta al mecanismo antitumoral de este tipo de compuestos.

Aunque no se encontraron alteraciones en la distribución de las fases del ciclo celular después del tratamiento con la cumarina A/AA, la acumulación de ADN subdiploide indica que probablemente la cumarina induce la activación de la apoptosis o de MCP tipo-apoptosis, ya que se ha reportado que la presencia de ADN fragmentado es una característica de estos tipos de muerte (Finn, G., *et al.* 2003). Por lo anterior, se buscaron cambios en la expresión de diferentes proteínas que regulan estas rutas.

La línea HeLa con la que se trabajó para todos los experimentos descritos es p53<sup>+/+</sup> (comunicación personal de la Dra. Quintero, Facultad de Química, UNAM). Este gen es bien conocido como un sensor inicial de daño al ADN por lo que podría participar en la MCP inducida por la cumarina A/AA. También se ha establecido que p53 es un transactivador de varios genes que participan en las rutas de muerte celular y que regula la expresión de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Mitsunaga, M., *et al.* 2007). Es por ésto que en el presente trabajo se investigaron los cambios en la expresión de las proteínas Bax y Bcl-2 (ambas de la familia Bcl-2).

Tanto Bax como Bcl-2 comparten tres dominios “BH” (dominio de homología-Bcl-2). Ante un estímulo apoptótico, Bax y otras proteínas de este grupo se oligomerizan y se translocan del citosol a algunas membranas intracelulares. En la membrana mitocondrial, estas proteínas participan en la permeabilización de la membrana externa permitiendo la liberación de otras proteínas proapoptóticas, entre ellas citocromo-c, AIF, endonucleasa G, Smac/DIABLO y Htr2/Omi, que a su vez participan en la activación de las caspasas (Willis, S., *et al.* 2005; Antignani, A., *et al.* 2006). Por el contrario, las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 ejercen su papel protector contra la MCP impidiendo la oligomerización de las proteínas BH y la formación de poros en la membrana mitocondrial (Letai, A., *et al.* 2005). De lo anterior se deduce que en un contexto en el que Bax se exprese más que Bcl-2 habría un balance pro-apoptótico que permitiría la salida de proteínas que inducen la MCP. En el presente trabajo se encontró que la expresión de Bax aumentó con respecto al control desde las 12 horas de tratamiento con la cumarina A/AA. Tres horas después de este aumento, la expresión de la proteína Bcl-2 disminuyó en las células tratadas con la cumarina (*figura 6*). Los datos anteriores confirman que el tratamiento con la A/AA podría inducir la formación de poros en la membrana externa mitocondrial y de esta forma permitir la liberación de proteínas proapoptóticas.

Como se mencionó en los antecedentes, varias proteínas proapoptóticas pueden ser liberadas a través de los poros mitocondriales (Leist, M y Jäätelä, M., 2001). Dado que a las 24 horas de tratamiento con la cumarina A/AA se observó que la condensación

de la cromatina es característica de una apoptosis nuclear etapa I provocada por la translocación de AIF (Susin, S., *et al.* 1999) y aparentemente la inducción de poros en la mitocondria comienza desde las 12 horas (*figura 6*), se investigaron los cambios en la expresión de esta proteína en mitocondrias aisladas y las correspondientes fracciones citosólicas, ya que AIF ejerce su acción proapoptótica sólo al ser liberada al citosol y translocarse al núcleo (Klein, J., *et al.* 2002).

En este trabajo se demostró que la cumarina A/AA induce la liberación de AIF desde la mitocondria hacia el citosol de forma tiempo-dependiente desde las 12 horas de tratamiento (*figura 7*). Esta liberación coincide con la posible apertura de poros mitocondriales, lo que correlaciona con los cambios en expresión de Bax y Bcl-2 observados en este trabajo (*figura 6*). Los datos en conjunto sugieren que la cumarina A/AA provoca la apertura de poros mitocondriales desde las 12 horas y que a través de éstos es liberada AIF. Una vez liberada, AIF podría translocarse al núcleo, unirse al ADN, reclutar endonucleasas y provocar la fragmentación del ADN a gran escala (50 Kbs) y la condensación periférica de la cromatina, de acuerdo con lo reportado previamente (Daugas, E., *et al.* 2000; Cande, C., *et al.* 2004).

La liberación de AIF hacia el citosol y su translocación al núcleo son eventos muy tempranos en la muerte celular. En varios modelos se ha visto que la activación de las caspasas es un evento posterior a la translocación de AIF (Seong-Woon Yu, *et al.* 2003). Dado que a las 48 horas de tratamiento con la cumarina A/AA se observó un patrón distinto de fragmentación del ADN típico de nucleasas activadas por caspasa-3, como CAD, se analizó la expresión de las subunidades activas de la caspasa-3 en un periodo de tiempo de 12 a 24 horas, con el fin de determinar si también estas proteasas jugaban un papel en la inducción temprana de la muerte (*figura 8*). En este estudio no se detectaron las bandas de la caspasa-3 activa en las células HeLa tratadas con la cumarina A/AA durante el periodo de tiempo mencionado. Este resultado es contrario a lo encontrado para otras cumarinas que inducen muerte por la vía típica de las caspasas (Yim, D., *et al.* 2005; Kim, R., *et al.* 2005). El hecho de que la cumarina A/AA induzca MCP sin la participación inicial de la caspasa-3 es un descubrimiento interesante en el campo de

estudio del mecanismo de acción de cumarinas. Tomando en cuenta estos datos se podría utilizar a la cumarina A/AA como agente antitumoral alternativo en casos donde las rutas típicas de apoptosis (por ejemplo, aquellas dependientes de caspasa-3) estén alteradas.

Es probable que si se analizara la expresión de la caspasa-3 a 48 y 72 horas de tratamiento con la cumarina A/AA se detecten las bandas activas y que en este contexto AIF funcione como un efector temprano de muerte precediendo la activación de las caspasas. Este tipo de MCP en el que la fragmentación a gran escala y la condensación periférica de la cromatina preceden la fragmentación oligonucleosomal y la condensación homogénea ya se ha reportado en otros modelos (Oberhammer, F., *et al.* 1993; Lagarkova, M., *et al.* 1995, Daugas, E., *et al.* 2000). Además, otros autores han reportado que AIF funciona como factor proapoptótico caspasa-independiente (Joza, N *et al.*, 2001), caspasa-dependiente (Arnoult, D., *et al.*, 2002) o como un factor adicional de inducción de muerte celular (Cregan, S., *et al.* 2002). Tomando en cuenta lo anterior, es posible que en la MCP inducida por cumarina A/AA en células HeLa AIF actúe como el factor iniciador de muerte sin la participación inicial de la caspasa-3.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se sugiere la siguiente secuencia de eventos para la MCP de células HeLa expuestas a cumarina A/AA:

1. Inicio del tratamiento de células HeLa con cumarina A/AA (0 hrs).
2. Apertura de poros de la membrana externa mitocondrial provocada por el aumento en la expresión de Bax y la disminución de Bcl-2 (12 hrs).
3. Liberación de AIF al citosol (12 hrs) e inicio de la fragmentación del ADN a gran escala (apoptosis nuclear etapa I: 24-32 hrs).
4. Fragmentación del ADN y acumulación de la fase subdiploide (32 hrs.).
5. Posible inicio de fragmentación oligonucleosomal del ADN por otras endonucleasas. Aparición de características morfológicas típicas de la apoptosis (48 hrs.).



## **VIII. Conclusión**

La cumarina A/AA es citotóxica en las líneas celulares HeLa y Calo de cáncer cérvico-uterino. Sin embargo, en PBMCs, ejerce una citotoxicidad reducida en comparación con el gran daño provocado en células tumorales a las concentraciones probadas. Lo anterior sugiere que la cumarina A/AA tiene un efecto diferente en células normales y tumorales.

La citotoxicidad de la cumarina A/AA es mediada predominantemente por la activación de un programa de muerte celular tipo-apoptosis que se inicia desde las 12 horas de tratamiento mediante la liberación de la proteína proapoptótica AIF.

En este modelo de muerte, AIF inicia el programa de daño celular de forma caspasa-independiente y provoca la fragmentación del ADN y la aparición de cambios morfológicos sugestivos de apoptosis sin modificaciones significativas en la distribución del ciclo celular.

## **IX. Perspectivas**

La descripción detallada de la ruta de MCP activada por la cumarina A/AA requiere de más estudios en los que se compruebe 1) si el cambio de expresión Bax/Bcl-2 realmente induce la apertura de los poros en la membrana mitocondrial; 2) si antes de la apertura de poros y previo a la liberación de AIF existe un evento de daño al ADN que provoque los cambios subsecuentes descritos en este trabajo.

Adicionalmente, para apoyar el uso de la cumarina A/AA en estudios de toxicidad más complejos es necesario que se prueben sus efectos citotóxicos *in vivo* ya que todos los datos descritos en este trabajo representan los efectos *in vitro* de la cumarina A/AA.

## X. Referencias

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Cuarta Edición. Garland Science Textbooks.

Antignani, A y Youle, R. (2006) *How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane?* Curr. Opin. Cell Biol. 18:685-689.

Api, A.M. (2001) *Lack of effect of coumarin on the formation of micronuclei in an in vivo mouse micronucleus assay.* Food Chem. Toxicol. 39:839-841.

Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H. (1990) *Apoptosis. The role of the endonuclease.* Am. J. Pathol. 136(3):593-608.

Arnoult, D., Parona, P., Martinou, J.C., Antonsson, B., Estaquier, J., Ameisen J.C. (2002) *Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli.* J. Cell Biol. 159:923-929.

Bamford, M., Walkinshaw, G., Brown, R. (2000) *Therapeutic applications of apoptosis research. Minireview.* Exp. Cell Res. 256:1-11.

Bernard, B., Fest, T., Prétet, J.L., Mougin, C. (2001) *Staurosporine-induced apoptosis of HPV positive and negative human cervical cancer cells from different points in the cell cycle.* Cell Death Differ. 8:234-244.

Candé, C., Cecconi, F., Dessen, P, Kroemer, G. (2002) *Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death.* J. Cell Sci. 115:4727-4734.

Candé, C., Vahsen, N., Garrido, C., Kroemer, G. (2004) *Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all*. Cell Death Differ. 11:591-595.

Chu, C.Y., Tsai, Y.Y., Wang, C., Lin, W., Tseng, T. (2001) *Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells*. Eur. J. Pharmacol. 416:25-32.

Cregan, S.P., Fortin, A., MacLaurin, J.G., Callaghan, S.M., Cecconi, F., Yu, S.W., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Park, D.S., Kroemer, G., Slack, R.S. (2002) *Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death*. J. Cell Biol. 158(3):507-517.

Cregan, S.P., Dawson, V.L., Slack, R.S. (2004) *Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death*. Oncogene. 23:2785-2796.

Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Kroemer, G. (2000) *Apoptosis-inducing factor (AIF): an ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis*. FEBS Letters. 476:118-123.

Dongsool, Y., Singh, R.P., Agarwal, C., Sookyeon, L., Chi, H., Agarwal, R. (2005) *A novel anticancer agent, decursin, induces G<sub>1</sub> arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells*. Cáncer Res. 65:1035-1044.

Finn, G.J., Creaven, B., Egan, D.A. (2001) *Study of the in vitro cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines*. Melanoma Res. 11:461-467.

Finn, G.J., Kenealy, E., Creaven, B., Egan, D.A. (2002) *In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines*. Cáncer Letters. 183: 61-68.

Finn, G.J., Creaven, B., Egan D.A. (2003) *Modulation of mitogen-activated protein kinases by 6-nitro-7-hidroxicoumarin mediates apoptosis in reanl carcinoma cells.* Eur. J. Pharmacol. 481:159-167.

García, J.J., Ogilvie, I., Robinson, B.H., Caspaldi, R.A. (2000) *Structure, functioning and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial ADN mutation.* J. Biol. Chem. 275(15):11075-11081.

Gorczyca, W., Bedner, E., Burfeind, P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M.R. (1998) *Analysis of apoptosis in solid tumors by laser-scanning cytometry.* Mod. Pathol. 11(11):1052-8.

Guilet, D., Séraphin, D., Rondeau, D., Richomme, P., Bruneton, J. (2001) *Cytotoxic coumarins from Calophyllum dispar.* Phytochemistry. 58:571-575.

Halicka, H.D., Siter, K., Feldman, E.J., Traganos, F., Mittleman, A., Ahmend, T., Darzynkiewicz, Z. (1997) *Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukemias.* Apoptosis. 2:25-29.

Hanahan, D., Weinberg, R. (2000) *The hallmarks of cáncer.* Cell 100:57-70.

Hengartner, M. (2000) *The biochemistry of apoptosis.* Nature. 407:770-777.

Holland y Frei. (2003) *Cáncer Medicine*, 6. Ed. BC Becker (*American Cáncer Society*).

Hong, Y., Cande, C., Stephanou, C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., Wu, H. (2002) *DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor.* Nat. Struct. Biol. 9(9):680-684.

Hu, Q., Chang, J., Tao, L., Yan, G., Xie, M., Wang, Z. (2005) *Endoplasmic reticulum mediated necrosis-like apoptosis of HeLa cells induced by Ca<sup>2+</sup> oscillation*. J. Biochem. Mol. Biol. 38(6):709-716.

Huang, P., Olf, A. (2001) *Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy*. TRENDS Cell Biol. 11(8):343-348.

Itoigawa, M., Ito, C., Tan, H., Kuchide, M., Tokuda H., Nishino, H., Furukawa, H. (2001) *Cáncer chemopreventive agents, 4-phenylcoumarins from Calophyllum dispar*. Cáncer Letters. 169:15-19

Jäättelä, M. (2004) *Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression*. Oncogene. 23:2746-2756.

Jakopec, S., Dubravcic, K., Polanc, S., Kosmrlj, J., Osmak, J. 2005. *Diazene JK-279 induces apoptosis-like cell death in human cervical carcinoma cells*. Toxicology in vitro. 20; 217-226.

Jäättelä, M., Leist, M. (2001) *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. 2001. Nature Rev. Mol. Cell Biol. Vol. 2.

Jiménez-Orozco, F.A., Molina-Guarneros, J.A., Mendoza-Patiño, F., León-Cedeño, B., Flores-Pérez, E., Santos-Santos, Mandoki, J.J. (1999) *Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line*. Melanoma Res. 9:243-247.

Joza, N. Susin, S. Daugas, E. Stanford, W.L. Cho, S.K. Li, C.Y.J. Sasaki, T. Elia, A.J. cheng, H.-Y. M. Ravagnan, L. Ferri, K.F. Zamzami, N. Wakeham, A. Hakem, R. Yoshida, H. Kong, Y.-Y. Mak, T.W. Zúñiga-Pflücker, J.C. Kroemer, G. Penninger, J.M. (2001) *Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death*. Nature. 410(6828):529-554.

Kang, Y., Yi, M., Kim, M., Park, M., Bae, S., Kang, CH., Cho, Ch., Park, I., Park, M., Rhee, Ch., Hong, S., Chung, H., Lee, Y., Lee., S. (2004) *Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose)polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria*. *Cancer Res.* 64:8960-8967.

Kaufmann, S., Earnshaw, C. (2000) *Induction of apoptosis by cancer chemotherapy*. *Exp. Cell Res.* 256:42-49.

Kawaii, S., Tomono, Y., Ogawa, K., Sugiura, M., Yoshizawa, Y., Ito, Ch., Furukawa, H. (2001) *Antiproliferative effect of isopentenylated coumarins on several cancer cell lines*. *Anticancer Res.* 21; 1905-1912.

Kawaii, S., Tomono, Y., Ogawa, K., Sugiura, M., Yano, M., Yoshizawa, Y. (2001) *The antiproliferative effect of coumarins on several cancer cell lines*. *Anticancer Res.* 21:917-924.

Kim, E., Kwon, K., Shin, B., Seo, E., Lee, Y., Kim, J., Park, J., Park, B., Ryu, D. (2005) *Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor kappaB and caspase-3*. *Life Sci.* 77(7):824-36

Kim, R., Emi, M., Taname, K. (2005) *Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review)*. *Onc. Rep.* 14:595-599.

Lim, J-S. (2006) *Apoptosis-inducing factor (AIF) inhibits protein synthesis by interacting with the eukaryotic translation initiation factor 3 subunit p44 (eIF3g)*. *FEBS Letters.* 580: 6375-6383.

Klein, J.A., Longo-Guess, C.M., Rossmann, M.P., Seburn, K.L. Hurd, R.E. Frankel, W.N. Bronson, R.T. Ackerman, S.L (2002) *The harlequin mouse mutation down-regulates apoptosis-inducing factor*. Nature. 419:367-374.

Lane, D.P. (1992) *Worrying about p53*. Curr. Biol. 2(11):581-583.

Leist, M. Jäättelä, M. (2001) *Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms*. Mol. Cell Biol. 2:1-10

Letai, A. (2005) *Bcl-2: found, bound and drugged!* TRENDS Mol. Med. 11:442-444.

Lizano, M., García-Carrancá, A. (1997) *Molecular variants of human papillomaviruses types 16, 18, and 45 in tumors of the uterine cervix in Mexico*. Gac. Med. Mex. 133(1):48-48.

Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S., Zamzami, N., Métivier, D., Nieminen, A., Brothers, G., Penninger, J., Kroemer, G. (2000) *Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor*. FASEB J. 15:758-767.

López-González, J.S., Prado-García, H., Cazares-Aguilar, D., Molina-Guarneros, J.A., Morales-Fuentes, J., Mandoki, J.J. (2004) *Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines*. Lung Cáncer. 43:275-283.

Li, LY. Luo, X. Wang, X. (2001) *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature. 412(6842):95-9

Liu, X., Liang, Z., Xin-Lu, F., Kai, Ch., Bo-Chu, Q. (2001) *Effect of scopoletin on PC<sub>3</sub> cell proliferation and apoptosis*. Acta Pharmacol Sim. 22(10):929-933.



Lü, C.-X. Fan, T.-J. Hu, G.-B. Cong, R.-S. (2003) *Apoptosis-inducing factor and apoptosis*. Acta Biochim. Biophys. Sin. 35(10):881-885

Madari, H., Panda, D., Wilson, L., Jacobs, R.S. (2003) *Dicoumarol: a unique microtubule stabilizing natural product that is synergistic with taxol*. Cáncer Res. 63:214-1220.

Makin, G., Hickman, J.A. (2000) *Apoptosis and cáncer chemotherapy*. Cell Tiss. Res. 301:143-152.

Maldonado, V., De Anda J., Meléndez-Zajgla, J. (1996) *Paclitaxel-induced apoptosis in HeLa cells is serum dependent*. J. Biochem. Tox. 11(4):183-188.

Mandic, A., Hansson, J., Linder, S., Shoshan, M.C. (2003) *Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling*. J. Biol. Chem. 278(11):9100-9106.

Miramar, M.D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L.M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, J.M., Peleato, M.L., Kroemer, G., Susin, S.A. (2001) *NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. J. Biol. Chem. 276(19):16391-16398.

Oberhammer, F., Wilson, J., Dive, C., Morris, I., Hickman, J., Wakeling, A., Walker, P., Sidorska, M. (1993) *Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation*. EMBO J. 12:3679-3684.

Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z-I., Ishihara, N., Mihara, K. (2005) *Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space*. EMBO J. 24:1375-1386.

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2002) *Global Cáncer Statistics, 2002*. *Cáncer J. Clin.* 55:74-108.

Polster, B.M., Basañez, G., Etxebarria, A., Hardwick, J.M., Nicholls, D.G. (2005) *Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria*. *J. Biol. Chem.* 280(8): 6447-6454.

Porter, A.G., Urbano, A. (2006) *Does apoptosis-inducing factor (AIF) have both life and death functions in cells?* *BioEssays.* 28:835843.

Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L. (2003) *Necrosis: a specific form of programmed cell death?* *Exp. Cell Res.* 1;283(1):1-16

Qingliu, H., Ghang, J., Tao, L., Yan, G., Xie, M., Wang, Z. (2005) *Endoplasmic reticulum-mediated necrosis-like apoptosis of HeLa cells induced by Ca<sup>2+</sup> oscillation*. *J. Biochem. Cell Biol.* 38(6); 709-716.

Richter, M. y Zhang, H. (2000) *Receptor-targeted cáncer therapy*. *DNA Cell Biol.* 24(5):271-282.

Rothbarth, K., Spiess, E., Juodka, B., Yavuzer, U., Nehls, P., Stammer, H., Werner, D. (1999) *Induction of apoptosis by overexpression of the ADN-binding and ADN-PK-activating protein CID*. *J. Cell Sci.* 112(13):2223-32.

Saraste, A. (1999) *Morphological criteria and detection of apoptosis*. *Herz.* 24(3):189-195.

Stambolsky, P., Weisz, L., Klein, Y., Goldfinger, N., Oren, M, Rotter, V. (2005) *Regulation of AIF expression by p53*. *Cell Death Differ.* 1-10.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B., Brothers, G., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D., Aebbersold, R., Siderovski, D., Penninger, J., Kroemer, G. (1999) *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature. 397:441-446.

Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K., Irinopoulou, T., Prévost, M-C., Brothers, G., Mak, T., Penninger, J., Earnshaw, W., Kroemer, G. (2000) *Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis*. J. Exp. Med. 192(4):571-579.

Tainton, K.M., Smyth, M.J., Jackson, J.T., Tanner, J.E., Cerruti, L., Jane, S.M., Darcy, P.K., Johnstone, R.W. (2004) *Mutational analysis of P-glycoprotein: suppression of caspase activation in the absence of ATP-dependent drug efflux*. Cell Death Differ. 11(9):1028-1037.

Urbano, A., Lakshmanan, U., Choo, P., Kwan, J., Guo, K., Saravanakumar, D., Porter, A. (2005) *AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells*. EMBO J. 24:2815-2826.

Vahsen, N., Candé, C., Dupaigne, P., Giordanetto, F., Kroemer, RT., Herker, E., Scholz, S., Modjtahedi, N., Madeo, F., Cam, Le., Kroemer, G. (2006) *Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA*. Oncogene. 25:1763-1774.

Willis, S., Adams, J. (2005) *Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis*. Curr. Opin. Cell Biol. 17:617-625.

Yang, J., Della-Fera, M., Baile, C. (2006) *Esculetin induces mitochondria-mediated apoptosis in 3T3-L1 adipocytes*. Apoptosis. 11:1371-1378.

Ye, H., Cande, C., Stephanou, N., Jiang, S., Burbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., Wu, Hao. (2002) *DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis-inducing factor*. Nature. 9:680-684.

Yin, L., Ohno, T., Weichselbaum, F., Kharbanda, S., Kufe, D. (2001) *The novel isocoumarin 2-(8-hydroxy-y-methoxy-1-oxo-1H-2-benzopyran-3-yl) propionic acid (NM-3) induces lethality of human carcinoma cells by generation of reactive oxygen species*. Mol. Cáncer Ther. 1:43-48.

Yim, D., Singh, R.P., Agarwal, C., Lee, S., Chi, H., Agarwal, R. (2005) *A novel anticáncer agent, decursin, induces G1 arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells*. Cáncer Res. 65(3):1035-1044.

Yu, S.W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N., Poirier, G., Dawson, T., Dawson, V. (2006) *Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death*. PNAS. 103(48):18314-18319.

Zoli, W. Ulivi, P. Tesei, A. Fabbri, F. Rosetti, M. Maltoni, R. Giunchi, D.C. Ricotti, L. Briigliadori, G. Vannini, I. Amadori, D. (2005) *Addition of 5-fluoroacil to doxorubicin-paclitaxel sequence increases caspase-dependent apoptosis in breast cáncer cell lines*. Breast Cáncer Res. 7(5):681-689

## ANEXOS

### Abreviaturas

**AIF:** Factor inductor de apoptosis.

**Apo-1:** (Fas, CD-95). Receptor de la familia TNF.

**Bad:** Promotor de muerte asociado a Bcl-2 (*Bcl2-associated death promoter*).

**BAF:** Boc-Asp-(Ome)-fluorometilcetona. Inhibidor de caspasas.

**Bak:** Proteína de muerte asociada a Bcl-2 (*Bcl2 antagonist/killer*).

**Bax:** Proteína de muerte “x” asociada a Bcl-2 (*Bcl-associated X protein*).

**Bcl<sub>XL</sub>:** Forma larga de Bcl-X. Proteína antiapoptótica de la familia Bcl2.

**Bcl2:** Proteína antiapoptótica de la familia Bcl-2 (*B-cell leukemia/lymphoma 2*).

**BH3:** Dominio que comparten las proteínas proapoptóticas de la sub-familia BH3 (del aminoácido 9-16).

**Bim:** Facilitador de apoptosis de la sub-familia BH3 (*Bcl2-like apoptosis facilitator*).

**CAD:** *Caspase activated DNase*. ADNasa que se activa por caspasas.

**CAK:** *Cdk-activating kinase*. Es una cinasa activadora de Cdks.

**Calo:** Línea celular de cáncer cérvico-uterino humano, con VPH-18 integrado.

**CD-95:** (Fas, Apo-1) Miembro de la superfamilia de receptores TNF.

**Cdk:** cinasa dependiente de ciclinas.

**Daxx-ASK1:** Ruta de muerte que implica a Daxx (proteína adaptadora asociada a receptores de muerte) y a la cinasa de JNK (cinasa NH<sub>2</sub>-terminal de Jun).

**BH:** Dominio de homología Bcl-2 (*Bcl-2 homology*).

**EndoG:** endonucleasa G.

**Fas:** Miembro de la superfamilia de receptores TNF.

**HeLa:** Línea celular de cáncer cérvico-uterino humano, con VPH-18 integrado.

**Htr2/Omi:** Serin-peptidasa mitocondrial que participa en la apoptosis.

**IAPs:** Proteínas inhibidoras de la apoptosis.

**MCF-7:** Línea celular de adenocarcinoma de mama humana que proviene de una efusión pleural.

**MCP:** Muerte celular programada.

**p151NK4B:** Proteína inhibidora de la Cdk4 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*).

**p161NK4:** Proteína inhibidora de la Cdk4 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*).

**p181NK4C:** Proteína inhibidora de la Cdk4 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2C*).

**p191NK4D:** Proteína inhibidora de la Cdk4 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2D*).

**p21C1P1:** Proteína inhibidora de Cdk2 y Cdk4 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*).

**p27K1P1:** Proteína inhibidora de Cdk4 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*).

**p57K1P2:** Proteína inhibidora de Cdk4 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*).

**PBMCs:** Células mononucleares de sangre periférica.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**ROS-ASK1-JNK:** Ruta de muerte celular que implica especies reactivas de oxígeno, la cinasa de JNK y a JNK.

**Smac/DIABLO:** Proteína mitocondrial proapoptótica. Se une a los IAPs y participa en la apoptosis (*Second mitochondrial activator of caspases/Direct IAP-binding protein with low pI*).

**STA:** Staurosporina. Molécula inhibidora de proteina-cinasas. Se utiliza como control positivo de apoptosis en algunos modelos.

**SW480:** Línea celular de adenocarcinoma de colon humano.

**SW620:** Línea celular de adenocarcinoma de colon humano derivado de metástasis de nódulos linfáticos.

**TNF:** Proteína miembro de la superfamilia TNF (*Tumor necrosis factor*).

**TNFR1:** Receptor de TNF.

**W-7:** Inhibidor de la calmodulina.

**Z-VAD.fmk:** Inhibidor general de caspasas (*Z-VAD(OMe)-fluorometilcetona*).

**Apoptosis-inducing factor (AIF) as a primary-effector in apoptosis-like cell death induced by a novel coumarin in HeLa cells.**

Carolina Álvarez-Delgado<sup>1</sup>, Ricardo Reyes-Chilpa<sup>1</sup>, Elizabet Estrada-Muñiz<sup>1</sup>, Adriana Mendoza-Rodríguez<sup>1</sup>, Angelina Quintero-Ruiz<sup>2\*</sup>, José Solano<sup>1</sup>, Marco A. Cerbón<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, D.F., México.

<sup>2</sup>Institute of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, D.F., México.

**ABSTRACT**

The search for new and more effective antineoplastic agents is still a growing field of research in the general effort against cancer. In this study we analysed the cytotoxic effect of the novel coumarin A/AA against different cancer cell lines. In HeLa cells, we further studied the mechanism of action and demonstrated that DNA fragmentation, but no cell-cycle disruptions, were part of the PCD program activated by coumarin A/AA. Interestingly, we found that AIF, a proapoptotic protein of the mitochondrial intermembrane space, is released to the cytoplasm of coumarin A/AA treated cells and acts as a caspase-independent, early cell-death effector.

**KEY WORDS:** coumarin A/AA, HeLa, AIF, apoptosis-like PCD.