



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Exploración del mecanismo de acción que subyace a la citotoxicidad de las
tiazolo[5,4b]quinolinas”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. José Carlos Páez Franco

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leticia Rocha Zabaleta
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)
Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera
[Instituto Nacional de Medicina Genómica](#)

Ciudad de México. Febrero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Reconocimientos

Jurado de Examen Asignado

Presidente: Dra. Massieu Trigo María de Lourdes.

Vocal: Dr. González Andrade Martín.

Vocal: Dra. González Arenas Aliesha Araceli.

Vocal: Dr. Valverde Ramírez Mahara Angélica.

Secretario: Dra. Robles Flores Martha .

El presente trabajo se realizó en los siguientes laboratorios:

- Laboratorio 115 del Edificio E del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química.
- Laboratorio 206 del Edificio F del Departamento de Biología de la Facultad de Química.

Bajo la tutoría del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo financiero de los siguientes proyectos:

Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPAPAPIIT, IN218910, IN221113, IN220315).

PAIP-FQ-UNAM-50009122.

CONACyT INFRA 2015-01-252123 y 2015-01-252001.

Beca CONACYT Doctorado (385852/253563).

Se contó con apoyo de parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

ASESORES

Dr. Alfonso Lira Rocha

Dra. Nora Andrea Gutiérrez Najera.

Dr. Cerbón Cervantes Marco Antonio

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, profesores, compañeros y amigos que ayudaron a la realización de la presente tesis.

Índice

Capítulo 1. Resumen	1
Capítulo 2 Antecedentes	2
2.1 Mecanismos de acción de fármacos quimioterapéuticos.....	2
2.2 Estrategias para la generación de nuevos fármacos anticancerígenos.....	4
2.3 Bioisosterismo.....	5
2.4 Tiazolo[5,4-b]quinolinas como bioisómeros de la m-AMSA.	7
2.5 D3CIP	9
2.6 Descubrimiento del mecanismo de acción de fármacos citotóxicos.....	11
2.7 Cambios en el proteoma de células tratadas con D3CIP	13
2.8 Cambios en el proteoma de células tratadas con D3CIP	13
2.9 Respuesta a proteínas desplegadas.....	15
Capítulo 3. Justificación	17
Capítulo 4. Planteamiento del problema	17
Capítulo 5 Hipótesis	18
Capítulo 6 Objetivo	18
6.1 Objetivos particulares.....	18
Capítulo 7. Estrategia Experimental	18
Capítulo 8. Materiales y Métodos	18
8.1 Cultivo celular y exposición a fármacos.....	19
8.2 Ensayos de MTT	19
8.3 Electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)	20
8.4 Edición del transcrito xbp1.....	20
Capítulo 9. Resultados	21
9.1 Ensayos de citotoxicidad.....	21
9.2 Inducción de la fosforilación en la histona γ H2AX y LC3B-II.....	22
9.3 Activación de IRE1 α	23
9.4 Producción de la proteína apoptótica GADD 153.....	24

9.5 Incremento de c-jun.....	25
9.6 Activación de ERK (fosforilación en residuo de tirosina 42).....	26
9.7 Inactivación de GSK3b (fosforilación residuo 9 de serina).....	26
9.8 Inactivación de PARP y corte de Ck-18.....	27
9.9 Efectos de N-acetil cisteína y 4-fenil butirato.....	29
Capítulo 10 Análisis de resultados.....	32
Capítulo 11 Conclusiones.....	34
Capítulo 12 Perspectivas.....	34
Capítulo 13 Bibliografía.....	35

Abreviaturas

4 Pb: 4 fenil butiraro

Ck-18: Citoqueratina 18

D3CIP: 9-[(3-cloro)fenilamina]-2-[3-(dietilamina)propilamina]tiazolo[5,4-b]quinolina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTi1: DNA topoisomerasa I

DTi2: DNA topoisomerasa II

DTT: Ditioneitol

GADD 153: DNA damage-inducible gene 153

GRP78: Glucose related protein 78

m-AMSA: m-Amsacrina

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NAC:N-acetil-L-cisteína

NAC- α : Nascent polypeptide associated complex

RE: Retículo endoplásmico

Tuny: Tunicamicina

UPR: Unfolded Protein Response

WB Western Blot

XBP-1: X Box Protein-1

sXBP1: spliced X Box Protein-1

uXBP1: unspliced X Box Protein-1

Resumen

La m-AMSA es un fármaco utilizado en eritroleucemias que actúa a través de la inhibición de la DNA topoisomerasa II (DTi2), enzima importante para la consecución del ciclo celular. Sin embargo, su empleo en la clínica no está excluido de reacciones adversas, como lo son la falta de selectividad hacia células tumorales, la generación de nuevos tumores y la resistencia al tratamiento. Las tiazoloquinolinas son compuestos que se asemejan en estructura a la m-AMSA y que buscan disminuir la resistencia al tratamiento y potenciar la actividad citotóxica. De los diversos compuestos generados, el D3CIP es uno de los más citotóxicos, sin embargo, en experimentos posteriores se determinó que este compuesto no inhibe a la DTi2 y por lo tanto no comparte el mismo blanco farmacológico que la m-AMSA, a pesar de su actividad citotóxica. Para identificar posibles mecanismos de acción que expliquen la actividad citotóxica, se utilizó una estrategia proteómica donde se identificaron proteínas que modificaron su expresión por el tratamiento con D3CIP. Las proteínas identificadas sugieren la participación de la Respuesta a Proteínas Desplegadas (UPR por sus siglas en inglés) la cual se activa por alteraciones a nivel de proteínas (desplegamiento, incremento exacerbado en su síntesis, daño estructural, etc), y promueve procesos para tratar de disminuir estas afectaciones (autofagia, síntesis de chaperonas, paro en la traducción), las cuales si no pueden controlar el estrés inicial, activa procesos apoptóticos. En este trabajo se evaluaron marcadores y proteínas clave en la activación de la UPR y la apoptosis y se demostró que se activa por el tratamiento con D3CIP, y esto explica en parte su citotoxicidad. Así también, se exploraron mecanismos de acción relevantes para tratar de delimitar el blanco farmacológico de las tiazoloquinolinas.

2 Antecedentes

2.1 Mecanismos de acción de fármacos anticancerígenos.

Los agentes anticancerígenos tanto en uso clínico como en desarrollo ejercen su actividad antitumoral a través de una variedad de mecanismos de acción que impiden o interfieren con ciertas características o procesos que tienen las células transformadas como lo son la metástasis, la angiogénesis, la inflamación los cambios en el metabolismo, la alta inestabilidad genómica, la evasión por el sistema inmune y la desregulación en los sistemas de crecimiento, muerte y proliferación celular (1).

Por su mecanismo de acción, los agentes quimioterapéuticos se pueden clasificar de la siguiente manera (Fig. 1) (2):

- Agentes que interactúan con el DNA.

Promueven daño al material genético ya sea induciendo entrecruzamientos (cisplatino) o intercalándose (mitoxantrona).entre las bases e inhibiendo procesos como la duplicación, la transcripción o la reparación del DNA

Así también, hay fármacos que inhiben enzimas claves en la estructuración del material genético como las DNA-topoisomerasas I (DTi1) (camptotecina, doxorubicina) y DTi2 (m-AMSA, VP16) o inhibidores de la DNA telomerasa (imetelstat).

- Antimetabolitos.

Interfieren con la síntesis de macromoléculas esenciales para la proliferación celular, como la síntesis de DNA (mercaptipurina), o interfiriendo con pasos claves de vías biosintéticas (metotrexato).

- Agentes antitubulina.

Alteran la dinámica del citoesqueleto, esencial en la mitosis y la citocinesis (vinblastina y taxol).

- Agentes que inhiben vías de señalización.

Necesarias para el crecimiento y proliferación celular como lo son los receptores tirosina cinasa (Iressa y Gleevec), el receptor de estrógenos (tamoxifen) o la síntesis de esteroides (anastrozol).

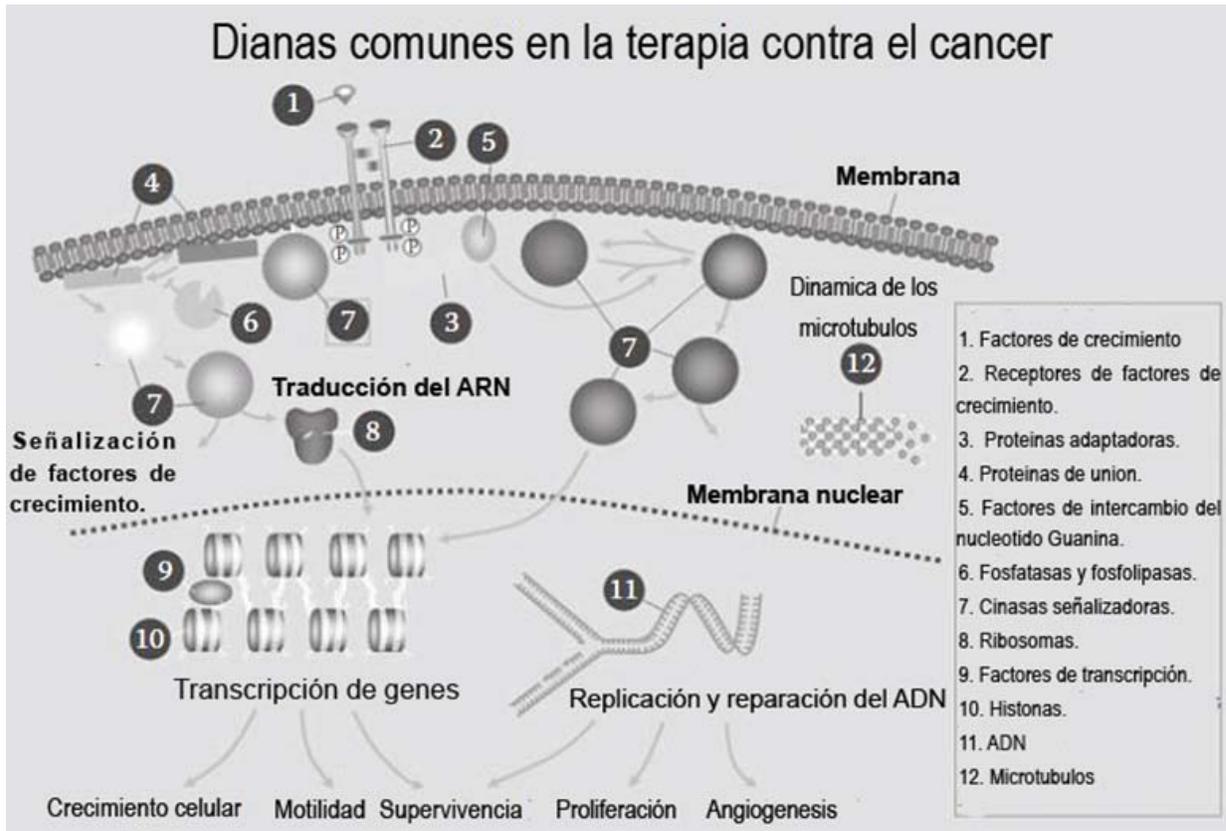


Figura 1. Mecanismos de acción de fármacos anticancerígenos.

Sin embargo, el empleo de estos fármacos en la terapéutica actual no está libre de problemáticas, las cuales a menudo están asociadas a resistencia al tratamiento (intrínseca o adquirida) producto de diversas modificaciones a nivel genético o epigenético (3). Dentro de los principales mecanismos asociados a resistencia al tratamiento se encuentran:

- Incremento en los sistemas de detoxificación
- Incremento en los sistemas de transporte
- Decremento en los sistemas de activación

- Incremento en la actividad de los sistemas de reparación del DNA o proteínas.
- Inhibición de la muerte celular
- Mutaciones en el blanco terapéutico

Dadas estas dificultades, es evidente la importancia de generar nuevas moléculas con actividad antitumoral potenciada buscando mejorar sus características farmacológicas (selectividad, citotoxicidad, estabilidad metabólica,), fisicoquímicas (solubilidad o estabilidad) y/o para mejorar procesos de síntesis, formulación o administración.

2.2 Estrategias para la generación de nuevos fármacos anticancerígenos

De las estrategias que permiten incrementar el número de estructuras con actividad biológica en cáncer y en otras enfermedades se encuentran:

- El cribado con bibliotecas moleculares, en el cual se cuenta con miles de compuestos diferentes y con los cuales se busca identificar si un compuesto inhibe o activa un blanco previamente definido. Sin embargo, este proceso es muy costoso y ofrece pocas estructuras con actividad biológica a nivel clínico (4).
- El análisis computacional, en donde a partir de un blanco (proteínas, DNA, RNA, lípidos, etc) y de una fármaco con estructura tridimensional definida, se desarrollan análisis de acoplamiento y/o dinámica molecular para determinar si ambas moléculas pueden interactuar favorablemente (4). Sin embargo, esta aproximación se limita a una interacción bimodal, dejando fuera las posibles interacciones entre el organismo y el fármaco.
- El bioisosterismo. Esta aproximación utiliza un fármaco con actividad clínica conocida al cual se le realizan modificaciones dirigidas o al azar en busca de potenciar alguna de las características biológicas o fisicoquímicas del fármaco inicial (4). Se explicara más a fondo este concepto, ya que las tiazoloquinolinas se consideran bioisómeros del fármaco m-AMSA.

2.3 Bioisosterismo

El isosterismo en química se define como la semejanza estructural entre dos moléculas que comparten el mismo número de átomos y electrones de valencia y que tienen características fisicoquímicas similares (5). Por otro lado, el bioisosterismo, consiste en reemplazar componentes estructurales de una molécula bioactiva con componentes estructurales similares (como lo son cambios en elementos o grupos funcionales), en vías de mejorar o promover alguna de las características antes mencionadas (5).

Este esquema ha provocado el surgimiento de un número cada vez más grande de fármacos que, a partir de estructuras comunes, buscan potenciar el efecto de los fármacos “tradicionales”.

Por ejemplo, el cisplatino y sus derivados oxaliplatino y carboplatino, actúan generando aductos y entrecruzamientos sobre el DNA, sin embargo, estos últimos disminuyen la nefrotoxicidad asociada al empleo de cisplatino, aunque éste es más citotóxico. (Fig. 2) (6).

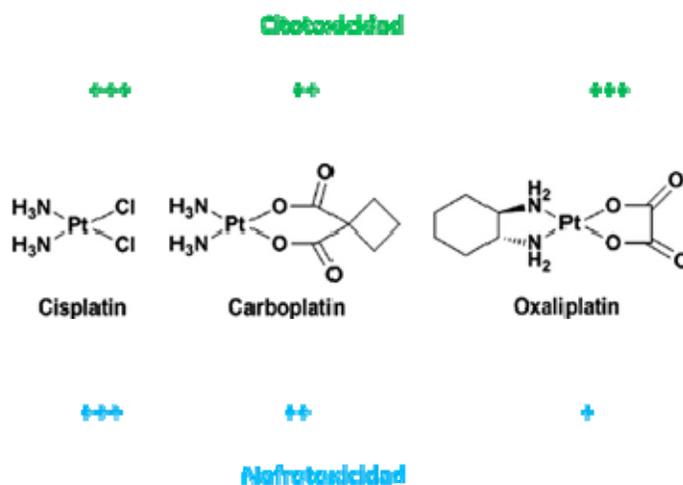


Figura 2. Estructuras del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino

Otro blanco farmacológico es la DNA topoisomerasa I, enzima importante para regular la topología del DNA durante la transcripción. Esta enzima es inhibida por

la camptotecina y sus derivados topotecan e irinotecan, sin embargo, estos últimos presentan mayor solubilidad que el fármaco modelo (7).

De la misma manera, la m-AMSA y su derivado más potente la m-AHMA, son compuestos inhibidores de la DTi2. La m-AMSA ha sido empleada desde los años 80's en el tratamiento de leucemia linfática y mieloide con buenos resultados en la clínica (8), sin embargo, presenta problemas en su uso, ya que tiene una elevada cardiotoxicidad, tiene posibles efectos carcinogénicos y cuenta con una alta promoción de resistencia al tratamiento (8), siendo este último aspecto compartido con la mayoría de los fármacos anticancerígenos de uso clínico (3).

Se profundizará en el mecanismo de acción de la DTi2.

El mecanismo es el siguiente: la enzima asocia dos dobles hélices del DNA, de las cuales, una es rota (verde en Fig. 3) y la otra transportada a través de esta apertura (rojo en Fig. 3) en función de disminuir la tensión en el superenrollamiento del DNA, derivado de la duplicación (8). El proceso de ruptura se lleva a cabo través de la formación de un enlace covalente entre el fosfato del fosfodiéster proveniente del DNA y una tirosina del sitio catalítico, formándose un intermediario covalente DNA-Proteína (8). Una vez transportada la segunda doble hélice, la enzima religa el corte (reformación del enlace fosfodiéster en el DNA) y finalmente libera las dos dobles cadenas.

La m-AMSA y sus derivados actúan inhibiendo a la enzima en el paso de religación, en el cual la DTi2, queda unida por un enlace fosfotirosilo al DNA y cuyo complejo formado entre la enzima, el fármaco y el DNA lleva el nombre de complejo covalente (8).

La formación y estabilización de estos complejos, genera rupturas en el DNA y detiene la duplicación y la mitosis, efectos que si no pueden ser reparados, desencadenan muerte celular vía apoptótica (8).

Mecanismo de Acción de la DNA topoisomerasa II

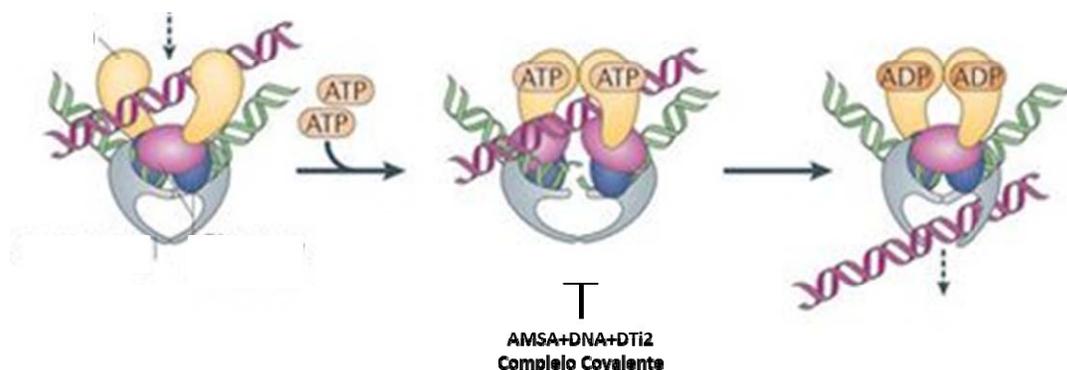


Figura 3. Mecanismo de acción de la DNA topoisomerasa II

Se han descrito mutaciones en el gen que codifica la DTi2 en células cancerosas de leucemia promielocítica HL60 que las hace insensibles a la m-AMSA (HL60/m-AMSA) (9). Sin embargo, cuando se emplean otros inhibidores de la DTi2 como el VP16 (el cual comparte el mismo mecanismo de acción que la m-AMSA), la resistencia al tratamiento desaparece (9). De ahí la importancia de generar nuevas estructuras que compartan el efecto citotóxico en células tumorales y que reduzcan sus efectos adversos.

En este aspecto, la m-AMSA es el punto de partida de una nueva serie de fármacos sintetizados por Lira y colaboradores que buscan potenciar la actividad citotóxica y disminuir la resistencia al tratamiento derivada de mutaciones en la DTi2 (10).

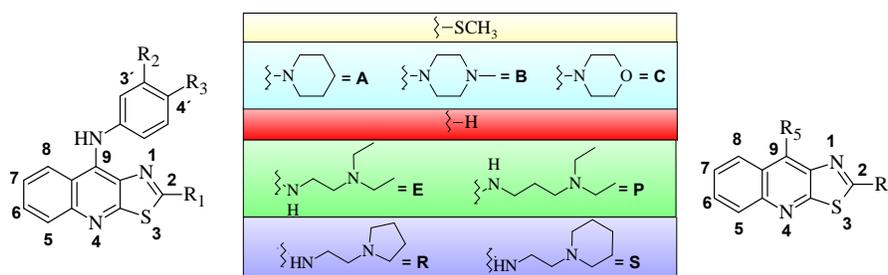
2.4 Tiazolo[5,4-b]quinolinas como bioisómeros de la m-AMSA.

Siguiendo el esquema del bioisosterismo, se sintetizaron tiazolo[5,4-b]quinolinas que son derivados de la estructura general de la m-AMSA. Estos compuestos tienen en común con la m-AMSA los grupos alquildiamino en la posición 2 y 9 y los grupos anilino en la posición 9 con sustituyentes en 3' y 4'. Se evaluó la citotoxicidad de los nuevos derivados en líneas celulares de cáncer de cérvix (HeLa) y cáncer de colón primario y secundario (SW480 y SW620). (Tabla 2) (10). En estos compuestos se observó que:

La presencia en la posición 2 de cadenas de N',N'-dietilaminoalquilamino y el aumento en la longitud de la cadena alifática de este grupo eleva la actividad citotóxica. Así también, la citotoxicidad de los compuestos que poseen un átomo de cloro en la posición 3' ó 4' del anillo de anilina aumenta en comparación con compuestos que carecen de este tipo de átomo.

Los derivados que poseen en la posición 2 grupos heterocíclicos saturados con restricciones conformacionales tienen poca o nula actividad citotóxica.

Tabla 1. Actividad citotóxica de algunos derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina obtenidos por el grupo de trabajo de Lira-Rocha a 48 horas de tratamiento



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	Cl ₅₀ (μM)		
				HeLa	SW480	SW620
1	SCH ₃	H	H	>80	>80	>80
2	SCH ₃	Cl	H	69.37	>80	>80
3	SCH ₃	H	Cl	>80	>80	>80
4	SCH ₃	CN	H	7.75	28.68	43.75
5	SCH ₃	H	CN	>80	>80	>80
6	SCH ₃	OCH ₃	H	25.34	66.65	26.58
7	SCH ₃	H	OCH ₃	>80	>80	>80
8	SCH ₃	(CO)E	H	21.69	13.6	19.72
9	SCH ₃	NMe	H	46.22	>80	>80
10	SCH ₃	CF ₃	H	43.34	65.13	62.28
11	H	OCH ₃	H	27.2	n.d.	76.6
12	H	CH ₃	H	85.8	n.d.	83.2
13	H	H	OCH ₃	30.8	n.d.	>80
14	H	CH ₃	H	>80	>80	>80
15	A	H	H	>80	>80	>80
16	B	H	H	60.70	41.80	>80
17	C	H	H	>80	>80	>80
18	E	H	H	15.96	37.7	21.6
19	E	Cl	H	9.12	14.33	17.78

20	E	H	Cl	10.16	12.56	12.20
21	E	CN	H	13.33	13.10	14.62
22	E	H	CN	15.18	14.18	16.49
23	E	OCH ₃	H	19.2	11.5	20.0
24	E	H	OCH ₃	13.60	12.04	16.38
25	P	H	H	6.27	6.90	16.56
26	P	Cl	H	7.46	7.91	10.17
27	P	H	Cl	8.82	4.92	7.48
28	P	CN	H	19.21	11.53	19.65
29	P	H	CN	24.81	22.70	29.15
30	R	H	H	27.81	29.1	31.58
31	R	Cl	H	14.64	15.42	14.37
32	R	H	Cl	17.46	26.51	13.47
33	S	H	H	32.28	26.7	20.13
34	S	Cl	H	12.06	12.75	18.12
35	S	H	Cl	14.42	18.42	11.6
	R₄	R₅		HeLa	SW480	SW620
36	E	Cl		12.86	19.48	15.22
37	SCH ₃	E		12.97	27.97	16.87
<i>Amsacrina</i>				9.50	27.70	16.70

2.5 D3CIP - 9-[(3-cloro)fenilamina]-2-[3-(dietilamina)propilamina]tiazolo[5,4-b]quinolina

De las tiazoloquinolinas sintetizadas, la más estudiada es el compuesto denominado D3CIP (tabla 1, en rojo y negritas), el cual es una tiazolo[5,4-b]quinolina con alta capacidad citotóxica cuyo grupo sustituyente es la 3-(dietilamina)propilamina (Fig. 4) y que comparte la misma citotoxicidad que la m-AMSA aunque con diferente estructura (11).

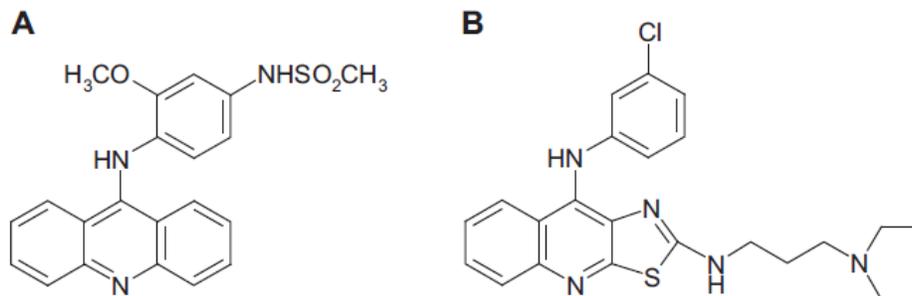


Figura 4. Estructuras químicas de (A) m-AMSA y (B) D3CIP.

Este compuesto tiene actividad citotóxica contra varias líneas tumorales, tales como líneas de cáncer cervical, colorrectal, mama y leucemia (11).

Adicionalmente, se ha evaluado su actividad citotóxica relativa en células tumorales frente a células no tumorales, siendo cuatro veces más citotóxico en células tumorales que en células monocíticas de sangre periférica de individuos sanos (PBMC).

Por otra parte, induce muerte celular sin detener el ciclo celular en células K562, como se observa en ensayos de citometría de flujo después de 12 h de exposición a este compuesto (11).

Los signos de apoptosis también son evidentes a nivel histoquímico, pues se detectan células TUNEL positivas, que coinciden con condensación de la cromatina y más tarde hay evidencia de fragmentación nuclear en células K562 (11).

Todos los datos son consistentes con la inducción de muerte celular mediada por apoptosis en células K-562. En concordancia, mediante el uso del sustrato de Ac-DEVD-AMC se confirmó la activación específica de las caspasas 3 y 7 (11).

Así también en células HeLa y K562, induce la fosforilación en la serina 153 de la histona γ H2Ax, la cual es un marcador de daño y reparación de la doble hélice (12).

Sin embargo, todos estos efectos en conjunto no están relacionados con la inhibición de la DTi2, ya que al emplear el ensayo ICE que permite cuantificar los complejos covalentes, no se observaron estos en células HeLa y K562 tratadas con D3CIP (Fig. 5) (12).

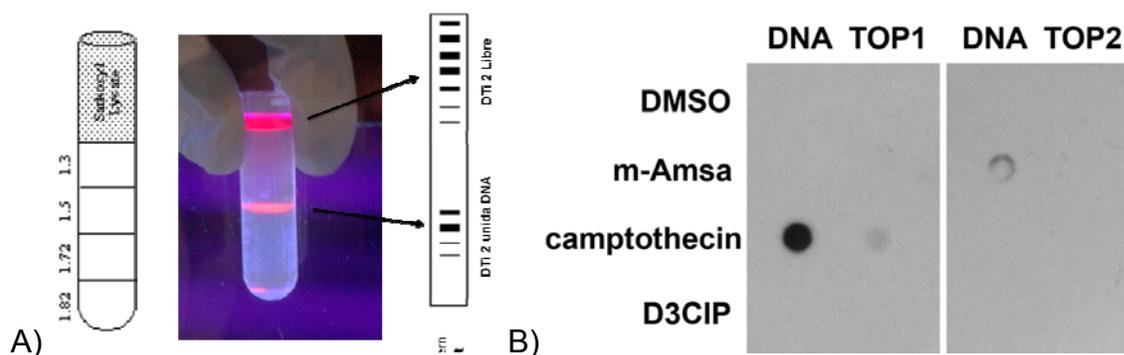


Figura 5. A) El método implica la separación del DNA genómico de las proteínas que no estén unidas covalentemente al DNA empleando gradientes de Cloruro de Cesio. Posteriormente se utilizan anticuerpos anti-DTi2 para determinar la presencia de los complejos covalentes (DTi2-Fármaco-DNA) en las fracciones purificadas del DNA. B) Fracciones purificadas de DNA e identificación de los complejos covalentes de DTi1 y DTi2 en células HeLa tratadas con DMSO (vehículo), D3CIP (15 μ M), m-AMSA (15 μ M Control positivo DTi2), camptotecina (Control positivo DTi1) durante 1 hora de incubación.

Con este ensayo se descartó que el D3CIP, actúa como bioisómero de la m-AMSA, sin embargo, todos los efectos fenotípicos y moleculares observados dejan en duda el mecanismo por el cual se activa la muerte celular del D3CIP.

2.6 Estrategias para el descubrimiento del mecanismo de acción de fármacos citotóxicos

Las estrategias pueden ser muy variadas pero comparten la evaluación de cambios fenotípicos (morfología, citotoxicidad, proliferación) y/o moleculares (expresión de genes o proteínas marcadoras) a fin de identificar cambios asociados al tratamiento e inferir posibles mecanismos o dianas farmacológicas.

Un ejemplo de una aproximación fenotípica es el panel NCI-60, el cual permite identificar mecanismos de acción desconocidos de fármacos citotóxicos a través de la generación de patrones de citotoxicidad en 60 tipos de celulares tumorales diferentes (leucemia, melanoma, pulmón, colon, cerebro, ovario, mama, próstata y riñón) para después compararlos con una librería con datos de citotoxicidad de compuestos con actividad conocida. Esta aproximación se basa en la sensibilidad particular de los distintos tipos celulares utilizados a cada fármaco, derivado de sus diferencias genotípicas y fenotípicas. Se busca que por homología, el fármaco problema comparta el patrón de citotoxicidad con alguno de los fármacos ya conocidos y, si este no es el caso, se propone como un mecanismo novedoso de citotoxicidad (14).

Otras aproximaciones utilizan la genómica y la proteómica para identificar cambios a nivel expresión de genes o proteínas respecto a un control, a fin de correlacionar los cambios observados con la literatura y proponer un mecanismo de acción para el fármaco problema.

En este sentido, en el trabajo de Muroi y colaboradores, se empleó un esquema proteómico (geles en 2D y espectrometría de masas) donde se identificaron los perfiles de expresión de proteínas de células HeLa sin tratar o tratadas con alguno de 42 compuestos diferentes con relevancia clínica. Se generó una base de datos en la que se agrupaban los mecanismos de acción de fármacos ya conocidos, con el perfil de expresión de cada uno de estos compuestos (14).

Posteriormente, se determinó el perfil de expresión de proteínas de células HeLa que fueron tratadas con el compuesto BNS-22, el cual es un compuesto aislado de un extracto natural citotóxico del árbol *Calophyllum brasiliense*, y cuyo blanco terapéutico era desconocido. Posteriormente se comparó con la base de datos generada anteriormente y este derivado se catalogó como un inhibidor de la DTi2 (15).

De esta manera, el empleo de análisis de proteómica ha permitido la identificación de mecanismos de muerte celular para diversos compuestos con citotoxicidad probada (16, 17, 18).

En el caso del D3CIP, se utilizó una aproximación proteómica para identificar los principales cambios a nivel de proteínas y correlacionarlos con posibles vías de citotoxicidad a fin de elucidar el mecanismo de acción de esta tiazoloquinolina citotóxica (12).

2.7 Cambios en el proteoma de células tratadas con D3CIP

Las proteínas identificadas están vinculadas con estrés de retículo endoplásmico y con procesos apoptóticos (tabla 2).

Tabla 2. Proteínas detectadas como sobre o subreguladas en 2D-PAGE e identificadas por espectrometría de masas en extractos solubles de células tratadas con D3CIP (15µM) y vehículo (DMSO) a 9 y 12 horas de tratamiento.

Proteína identificada	Nº de acceso	Cobertura (%)	Masa (Kda)	pI	Calificación	Nº de péptidos	Función molecular (GO)	Cambio
GRP78	P11021	38.2	72333	5.07	131	8	Respuesta a proteínas desplegadas	Incremento
NAC-α	Q9H009	46.5	23370	4.68	157	9	Tránsito de proteínas	Reducción
Calumenina	Q6IAW5	62.5	37084	4.47	259	47	Unión a Calcio	Reducción
Protimosina	Q15204	56.2	12065	3.62	319	13	Remodelado de cromatina	Reducción
Citoqueratina 18	P05783	22.8	47897	5.34	546	35	Reorganización de citoesqueleto	Incremento
Paratimosina	P20962	22.0	11392	4.14	61	2	Duplicación del DNA	Reducción

Una de las proteínas que se ven aumentadas por el tratamiento con D3CIP es la proteína GRP78. Esta proteína con actividad de chaperona es el regulador principal de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés) iniciada en el retículo endoplásmico (RE) y cuya finalidad es disminuir la cantidad de proteínas desplegadas en el RE producto de diversas condiciones, tales como: concentraciones aberrantes de proteínas, falta de nutrientes, hipoxia, estrés oxidativo, infecciones virales, etc. Si estas afectaciones no pueden ser controladas, la UPR activa apoptosis (19, 20).

La proteína NAC- α (Nascent polypeptide associated complex) disminuyó por el tratamiento con D3CIP. Su función principal consiste en evitar la translocación incorrecta de péptidos recién sintetizados hacia RE (21). Así también, la disminución en NAC- α ha sido relacionada con el inicio de la UPR derivada de un estrés en el RE (22, 23).

En este sentido el tratamiento con D3CIP produjo la disminución de la proteína calumenina, la cual está vinculada con la regulación de la actividad de diversas proteínas y con la homeostasis de Ca^{2+} en el RE (24). La movilidad de este ion entre diferentes regiones celulares (retículo-citoplasma-mitocondria), además de estar conectada con procesos apoptóticos, también tiene relación con el inicio y progresión de la UPR (25).

Se detectó también la disminución de la proteína protimosina, cuya función es inhibir la apoptosis evitando la formación del apoptosoma (26, 27). Este dato correlaciona con resultados previos en los que se determinó que células HeLa y K-562 tratadas con D3CIP mueren por vía apoptótica (11).

En este contexto, se identificó la proteólisis de la proteína estructural Ck-18, efecto que ha sido es propuesto como un marcador de apoptosis y de buen pronóstico en el tratamiento de cáncer de mama y de pulmón (28, 29). Por último, la hidrólisis de Ck-18 se ha relacionado también con la activación temprana de la UPR en un estudio realizado en células apoptóticas de fibrosis idiopática pulmonar (28).

Las proteínas identificadas por proteómica, y en especial, el incremento en GRP78, guardan relación con la activación de la UPR, por lo que se describirá a fondo esta vía.

2.9 Respuesta a proteínas desplegadas

En condiciones normales, la proteína GRP78 inhibe la UPR a través de la interacción con los receptores transmembranales ATF6, IRE1 α y PERK los cuales se encuentran en la membrana del RE. El incremento en el desplegamiento de proteínas en este compartimento, promueve la separación de GRP78 de los receptores antes mencionados, activándolos. Una vez activas ATF6, IRE1 α y PERK prenden vías de señalización que regulan procesos como la traducción, el ciclo celular y la autofagia en vías de disminuir el estrés inicial, el cual si no puede ser aliviado, promueve apoptosis, (Fig. 6) (19, 20).

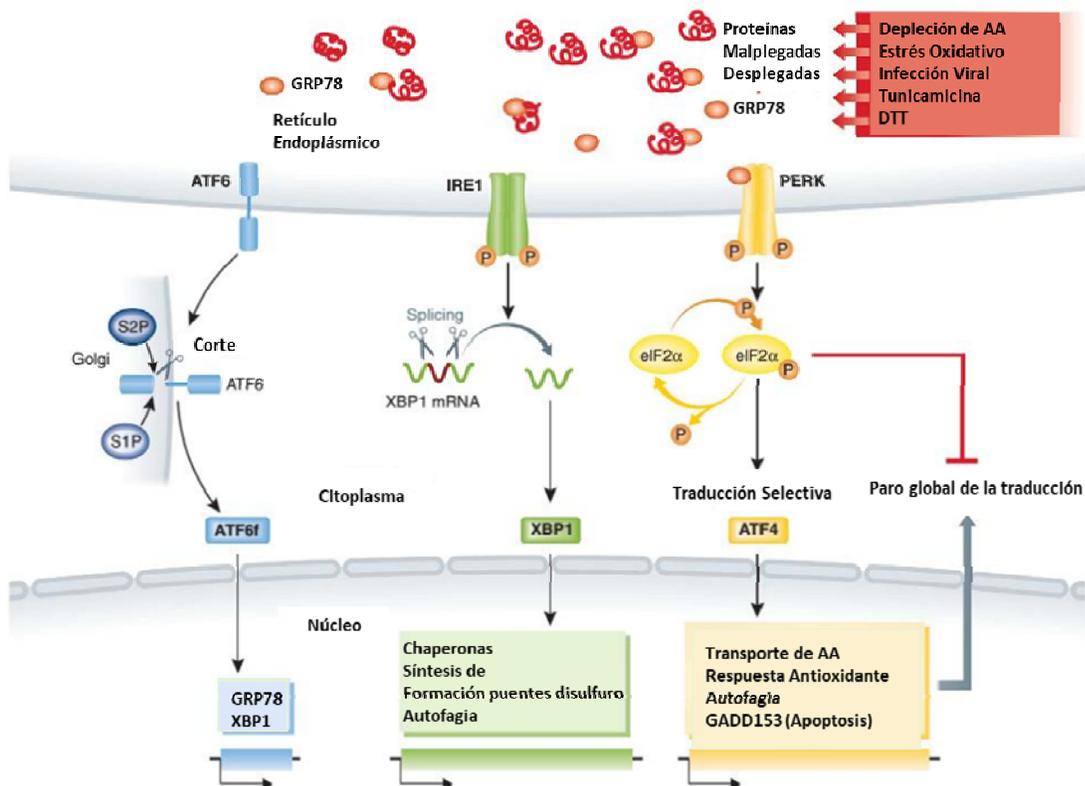


Figura 6. Principales moléculas activadoras y efectos de la activación de la UPR en las moléculas señalizadoras.

IRE1 α es una cinasa/endoribonucleasa unida a la membrana del retículo endoplásmico, que en su forma activa escinde miRNAs que están asociados a la producción de proteínas claves en el inicio de la UPR. De entre ellos XBP1, el cual una vez editado, activa genes asociados con la producción de chaperonas, el crecimiento del retículo endoplásmico y la autofagia (30).

PERK es una proteína cinasa que una vez activa, fosforila a eIF2 α inhibiéndola y promoviendo un paro general en la traducción, a fin de disminuir la carga total de proteínas en el RE. Así también, se induce la traducción selectiva de genes que son independientes de eIF2 α , como lo es el factor de transcripción ATF4, el cual transcribe genes relacionados con el aumento en la capacidad de plegamiento como son las chaperonas y de proteínas relacionadas con autofagia (30).

Este último es un mecanismo ampliamente conservado en los Eucariontes, que se encarga de eliminar y reciclar organelos y proteínas en función de las necesidades celulares, ayudando a contender con afectaciones metabólicas y diversas condiciones de estrés, de entre ellas, la UPR (31).

Finalmente, ATF6 libre de GRP78 migra al Golgi donde es escindido por proteasas. Una vez cortada, la región citosólica de este receptor es libre para actuar como factor de transcripción de genes inherentes a la expresión de chaperonas como los son GRP78, GRP94 y la proteína disulfuro isomerasa (30).

Sin embargo, si la homeostasis no es alcanzada, las tres vías pueden señalar hacia la muerte celular por apoptosis.

IRE1 α recluta a la proteína TRAF2 promoviendo la activación de la apoptosis vía JNK (32).

La activación de PERK y la producción de ATF4, inicia procesos apoptóticos vía la inducción del factor de transcripción GADD153, el cual favorece la producción de la proteína BIM y el apagamiento transcripcional de BCL-2 (32).

ATF6 promueve apoptosis a través de la disminución de la proteína Mcl-1, miembro con actividad antiapoptótica de la familia BCL-2 (33)

Con los datos obtenidos por proteómica, y en especial, el aumento en la expresión de la proteína GRP78, evaluar si la UPR está activa cuando se tratan células HeLa con D3CIP explicaría uno de los probables mecanismos de citotoxicidad mediados por esta tiazoloquinolina.

3 Justificación

En el tratamiento contra el cáncer se requieren de nuevas moléculas que ayuden a disminuir o sobrepasar efectos adversos derivados del tratamiento como los antes mencionados. Sin embargo, la integración de nuevas moléculas en la clínica requiere el claro conocimiento de las dianas moleculares a los cuales está dirigido el tratamiento.

Adicionalmente, el entendimiento del mecanismo de acción y la determinación de la diana farmacológica permite la implementación de nuevas estrategias en el tratamiento clínico. Un ejemplo de esto son las terapias de combinación donde se emplean múltiples medicamentos ayudando a disminuir la resistencia al tratamiento y aumentando la citotoxicidad hacia células tumorales (1).

Identificar el mecanismo de acción y el blanco farmacológico del D3CIP es importante ya que permitirá promover su uso en la clínica y se podrán identificar características deseables a nivel estructural que potencien parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de las tiazoloquinolinas citotóxicas.

4 Planteamiento del problema

La activación de la UPR es una respuesta general a diversos tipos de estrés, que como se ha mencionado, puede conducir a la activación de procesos apoptóticos (35). Dadas las proteínas identificadas por proteómica, evaluar si el tratamiento con D3CIP activa una posible y si esta activación correlaciona con la muerte celular vía apoptótica, puede aportar evidencia para identificar la diana molecular primaria de dicho fármaco.

5 Hipótesis

El D3CIP a concentraciones citotóxicas activa la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y esta activación promueve procesos apoptóticos en células HeLa.

6 Objetivo

“Determinar en células HeLa, si el tratamiento con D3CIP a concentraciones citotóxicas induce una respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y promueve apoptosis derivado de la activación de la misma”

6.1 Objetivos particulares

Determinar los cambios en marcadores asociados al inicio y progresión de la UPR y correlacionar estos cambios con datos de citotoxicidad y marcadores de apoptosis cuando se tratan células HeLa con D3CIP.

7 Estrategia Experimental

En células HeLa y empleando ensayos Western blot y PCR se evaluaron marcadores asociados a la activación de la UPR y se correlacionaron con datos de citotoxicidad y marcadores de apoptosis a distintos tiempos de tratamiento (3, 6, 9 y 12 horas).

8 Materiales y métodos

Compuestos a evaluar

- DMSO - Control Negativo
- m-AMSA - Fármaco inhibidor de la DTi2
- D3CIP – Compuesto a evaluar.
- DTT - Molécula activadora de la UPR a través de la reducción de puentes disulfuro.
- Tunicamicina - Molécula activadora de la UPR a través de la inhibición de la

glucosilación de proteínas.

8.1 Cultivo celular y tratamientos

Se cultivaron células HeLa (células epiteliales humanas procedentes de un adenocarcinoma cervical, en cajas Petri (una por tratamiento) de 100 mm (aproximadamente 1.25×10^7 células) en medio Eagle modificado de Dulbecco + 10 % de suero fetal bovino. Se permitió el crecimiento celular durante 24 horas y posteriormente, se añadieron los compuestos: m-AMSA 15 μ M, D3CIP 15 μ M, Ditioteitol (DTT) 5 mM, tunicamicina 10 μ M, N-acetil-L-cisteína (NAC) 5 mM, 4 fenil butiraro (4Pb) 2mM y se incubaron a 37°C, a 3, 6, 9 o 12 h. Posteriormente, las células se lisaron con buffer de extracción (TRIS 30 mM, urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 10 mM, IPG Buffer 0.5%, EDTA 1 mM, pH 8.5, inhibidores de proteasas Complete (Roche)). Se homogenizó por sonicación 3 veces durante 20 segundos en baño de hielo. El lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante evitando desprender el botón viscoso (DNA-ARN) y se cuantificó la proteína por el Método Bradford (Biorad).

8.2 Ensayos de MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. La producción de formazán a partir de MTT, produce un compuesto de color que es cuantificable a 540 nm, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir viabilidad y proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (40).

En placas de 96 pozos, se cultivaron un promedio de 7×10^3 células por pozo, a las cuales se añadió el D3CIP y la m-AMSA a 10 y 15 μ M en un volumen final de 200 μ L de medio DMEM. La viabilidad celular se determinó a 9 horas. Al cumplirse el tiempo, se añadieron 20 μ L de la disolución de MTT 2.5 mg/ml (SIGMA) y se incubó durante 90 minutos. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se

agregaron 200 μ L de DMSO para disolver el formazán. Finalmente, se determinó la absorbencia a 540nm (Epoch-Biotek) y se determinó el % de viabilidad

8.3 Electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)

Se realizaron geles de electroforesis SDS-PAGE al 12% con 25 μ g de proteína de los extractos totales y se separaron las proteínas durante 2 h a 90 V. Posteriormente, se electrotransfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Biorad) durante 90 min a 25 V.

La membrana se equilibró en TBST 1X conteniendo 5% de leche en polvo sin grasa (BLOTTO) a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación, seguido por tres lavados con TBST 1X (10 minutos por lavado). Se incubó la membrana con los anticuerpos primarios p γ H2Ax (phospho S139, Abcam ab11174), LC3B (Abcam ab51520), G3PDH (FL-335 sc25778, Santa Cruz), PARP-1 (sc1562, Santa Cruz), Citoqueratina-18 (12140322001 Cytodeath Roche), y GADD153 (sc7351, Santa Cruz) todos diluidos 1:5000 en TBST durante toda la noche.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados de diez minutos con TBST 1X (10 minutos por lavado) y se incubó la membrana con anticuerpos Anti IgG de conejo (Jackson technologies), Anti IgG de cabra (sc2020, Santa Cruz), o Anti IgG de ratón (sc2005, Santa Cruz) según sea el caso, a una dilución 1:10000 durante toda la noche. Posterior al lavado del anticuerpo secundario, se reveló la reacción por quimioluminiscencia (Millipore) y se analizaron en el fotodocumentador Licor (Licor). Se realizaron los análisis densitométricos con el software Image Studio (Licor).

8.4 Edición del transcrito xbp1

Se incubaron células HeLa con D3CIP (15 μ M), m-AMSA (15 μ M) o DTT (5 mM) por 3, 6 o 9 horas. Después de la incubación, se extrajo el RNA total con TRIZOL (Life Technologies) y se cuantificó con un espectrofotómetro EpochTM (Biotek) obteniéndose muestras con absorbancias a 260/280 nm iguales o arriba de 1.8. El RNA mensajero se retrotranscribió usando el sistema *SuperScript1 III First-Strand SynthesisTM* para RT-PCR (*ThermoFisher Scientific*) de acuerdo a las instrucciones

del fabricante. El mensajero que codifica para (s)xbp1 se amplificó con los siguientes cebadores:

GAAACTGAAAAACAGAGTAGCAGC (forward)

GCTTCCAGCTTGGCTGATG (reverse).

El producto de PCR se resolvió en geles de agarosa al 4 % teñido con EtBr y se visualizó en un fotodocumentador Chemidock (Biorad). El experimento se hizo por triplicado y se analizaron los geles por densitometría empleando el software Image J.

9 Resultados

9.1 Ensayos de citotoxicidad

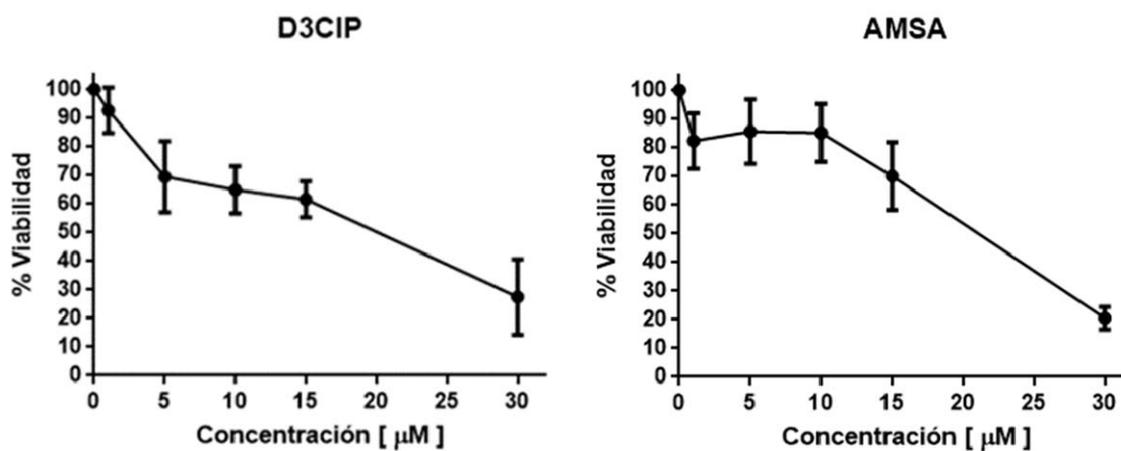


Figura 7. Viabilidad de células HeLa por efecto del tratamiento con D3CIP o m-AMSA a 1, 2, 10, 15 y 30 µM a 9 horas de tratamiento.

Se determinó la viabilidad de células HeLa tratadas con D3CIP y la m-AMSA a diferentes concentraciones (1, 2, 10, 15 y 30 µM) a 12 horas de tratamiento (Fig. 7). Se utilizaron las concentraciones de 15 µM ya que ambos tratamientos cuentan con una citotoxicidad similar a esta concentración y para poder correlacionar los resultados de la presente tesis con los datos obtenidos por proteómica a las mismas condiciones (12).

9.2 Inducción de la fosforilación en la histona γ H2AX y LC3B-II

El D3CIP promueve la fosforilación en la serina 139 de la histona γ H2AX, a 9 horas de tratamiento, sin embargo, no se observó este efecto con tunicamicina ni con ditiotreitól (Fig. 8), lo que nos indicaría que se presentan diferencias en los efectos intracelulares del D3CIP y de sus contrapartes activadores de la UPR.

Así también, se observó la acumulación de LC3b-II en todos los tratamientos a excepción del vehículo. Esta proteína es importante en la estructuración del autofagosoma y ha sido propuesta como marcador de la activación de la autofagia (31). Así también, es una respuesta importante para contender con muchos tipos de estrés, de entre ellos la UPR y la DDR (31).

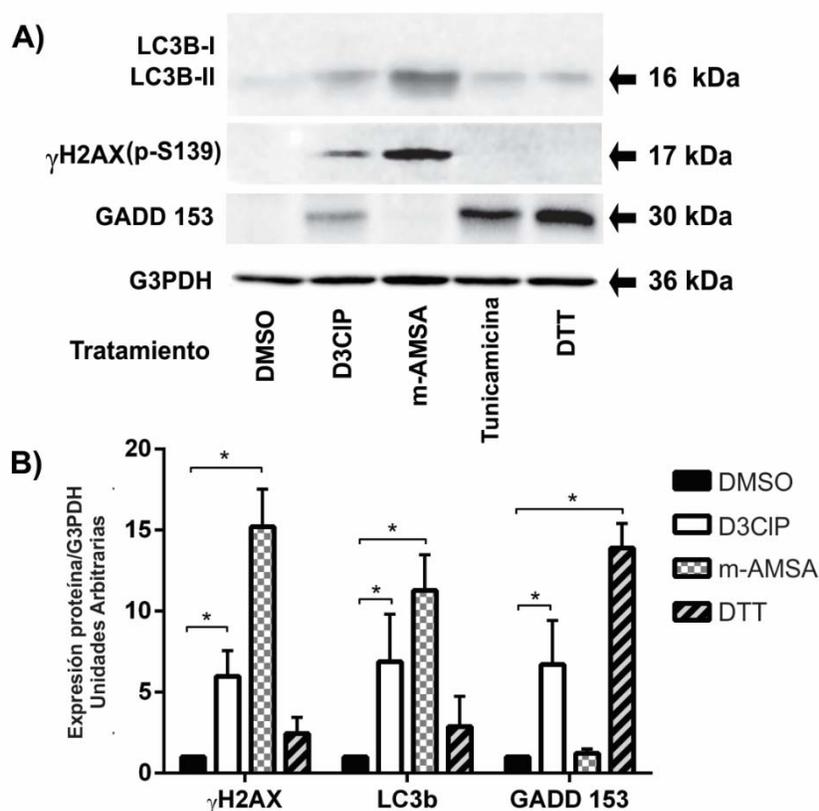


Figura 8. A) Niveles de LC3B-I, LC3B-II, GADD 153, y fosfo-S139 γ H2AX en células HeLa tratadas con vehículo (DMSO), D3CIP (15 μ M), m-AMSA (15 μ M), tunicamicina (70 μ g) o DTT (5 mM) por 9 horas. B) análisis densitométrico de las bandas. La Glicerinaldehído-3-fosfato deshidrogenasa como control de carga.

*** Diferencias estadísticamente significativas (ANOVA dos vías y Tukey's HSD, $P < 0.05$) al comparar con el control DMSO (vehículo a los tiempos correspondientes), $n=3$.**

9.3 Activación de IRE1 α

El splicing alternativo mediado por IRE1 α sobre el mensajero de XBP1, produce una mensajero 26 nucleótidos más pequeño (spliced xbp-1 o sxbp-1), el cual, una vez traducido actúa como factor de transcripción de genes que aumentan la capacidad de replegamiento y reciclaje de proteínas dentro del RE (35). Esta reducción de 26 bases del transcrito inicial, se detectó en los tratamientos con D3CIP y DTT mediante los productos de RT-PCR en geles de agarosa al 3%, como se muestra en la figura 9. A diferencia del D3CIP, la m-AMSA no activó IRE1 α , pues no se detectó la disminución de la banda pesada y la acumulación de la banda ligera. Cabe hacer mención que el mecanismo de acción de la m-AMSA (inhibición de la DTi2) no se asocia con la activación de la UPR (35).

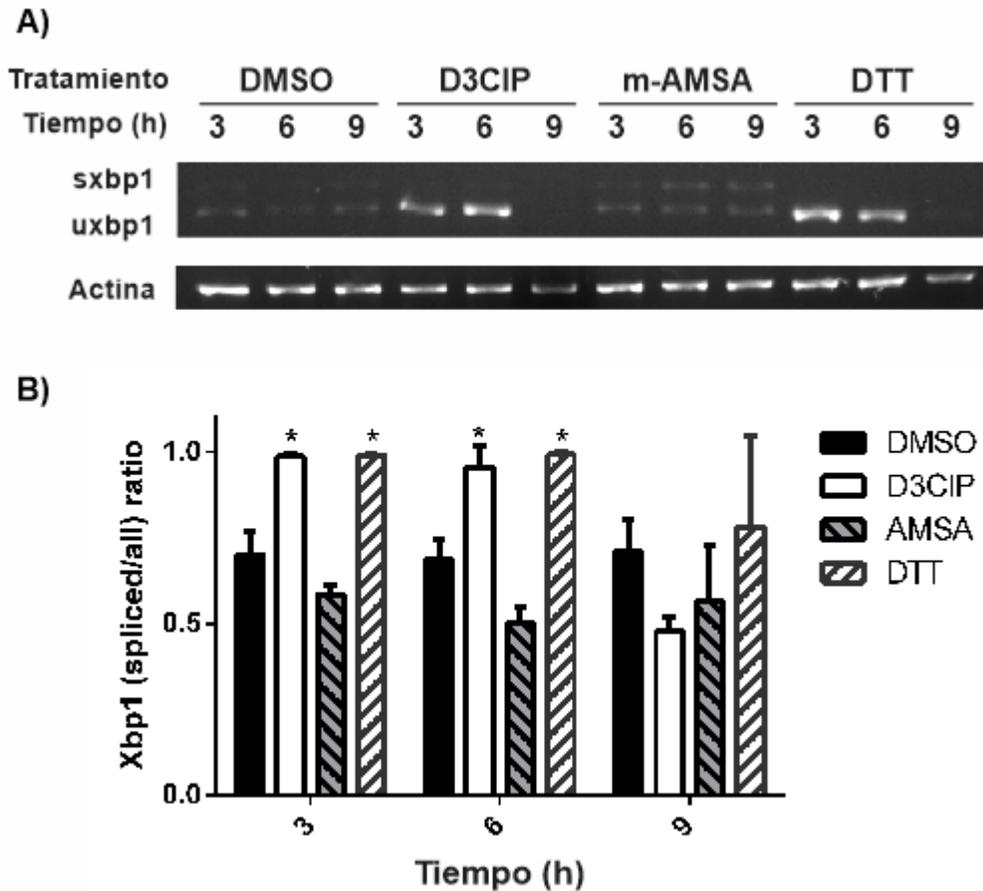


Figura 9. A) Identificación de la activación de IRE1 α a tres, seis y nueve horas de tratamiento con D3CIP y m-AMSA (15 μ M) y DTT (5 mM). **B)** análisis densitométrico de las bandas. La Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa como control de carga. * Diferencias estadísticamente significativas (ANOVA dos vías y Tukey's HSD, $P < 0.05$) al comparar con el control DMSO (vehículo a los tiempos correspondientes), $n=3$.

9.4 Producción de la proteína apoptótica GADD 153

Se observó la producción del factor de transcripción GADD153, al incubar células HeLa con D3CIP a 15 μ M durante 9 horas (Fig. 8), lo que nos indicaría que la muerte celular vía apoptótica ya reportada (11), podría ser activada por la exacerbación de la UPR (36). Como controles positivos de la inducción de UPR y de la producción de GADD 153, se utilizó el compuesto tunicamicina, el cual inhibe la glucosilación de proteínas dentro del retículo endoplásmico provocando una acumulación de proteínas dentro de este compartimento y el ditiotreitól, molécula

que reduce puentes disulfuro en las proteínas, provocando su desplegamiento (Fig. 8).

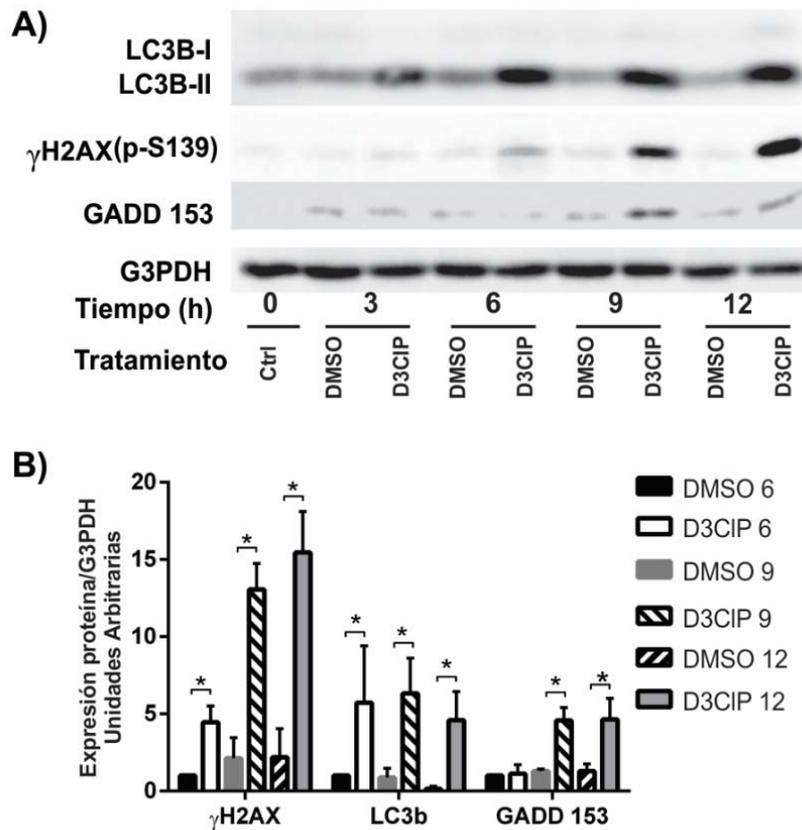


Figura 10. A) Niveles de LC3B-I, LC3B-II, GADD 153, y fosfo-S139 γ H2Ax en células HeLa tratadas con vehículo (DMSO) o D3CIP (15 μ M) a 3, 6, 9 y 12 horas de tratamiento. B) Análisis densitométrico de las bandas. La Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa como control de carga. * Diferencias estadísticamente significativas (ANOVA dos vías y Tukey's HSD, $P < 0.05$) al comparar con el control DMSO (vehículo a los tiempos correspondientes), $n=3$.

Adicionalmente, se evaluaron proteínas clave en sistemas de transducción de señales relacionadas con la UPR, principalmente las MAPK.

9.5 Incremento de c-jun.

La incubación con D3CIP produjo un incremento (3 h de incubación) de la proteína c-JUN (Fig. 11), la cual, actúa como factor de transcripción al unirse a c-FOS para formar el complejo AP-1 y cuya dimerización activa genes como c-myc, p73 y el

propio c-jun (37). Su autoinducción está relacionada con la activación de la vía de señalización MAPK, en específico, a través de la fosforilación mediada por p-JNK. En la UPR, IRE1- α promueve la fosforilación y activación de p-JNK y el posterior incremento de transcripción de c-jun (38), lo cual correlaciona con la activación de IRE1- α a las 3 horas (Fig. 9).

9.6 Activación de ERK (fosforilación en residuo de tirosina 42)

A pesar de que ERK es totalmente activa cuando presenta otra fosforilación en treonina 202, la fosforilación en tirosina 204 podría ser resultado de la activación de la vía clásica de MAPK por el tratamiento con D3CIP. Entre los sustratos que son fosforilados por ERK, se encuentran C-myc y c-FOS (complejo AP-1) importantes en proliferación y el control de la apoptosis (38). Cuando se incuban células HeLa con D3CIP, se observó la fosforilación de ERK en el residuo 42 (Fig. 11) a las 9 horas de tratamiento, correlacionando con la inducción de la proteína pro-apoptótica GADD 153 (Fig. 8 y 10).

9.7 Inactivación de GSK3b (fosforilación residuo 9 de serina)

La inactivación por fosforilación de la proteína GSK3B promueve la acumulación de varias proteínas, entre ellas b catenina (39). La acumulación de b catenina (por la inhibición de las cinasas como GSK3b y PKC) promueve procesos apoptóticos vía UPR a través de c-jun (39). La inactivación de GSK3b por el tratamiento con D3CIP (Fig. 11), correlaciona con la inducción de GADD 153 y de c-jun a 9 horas (Fig. 8 y 10), a través de un probable incremento de b-catenina.

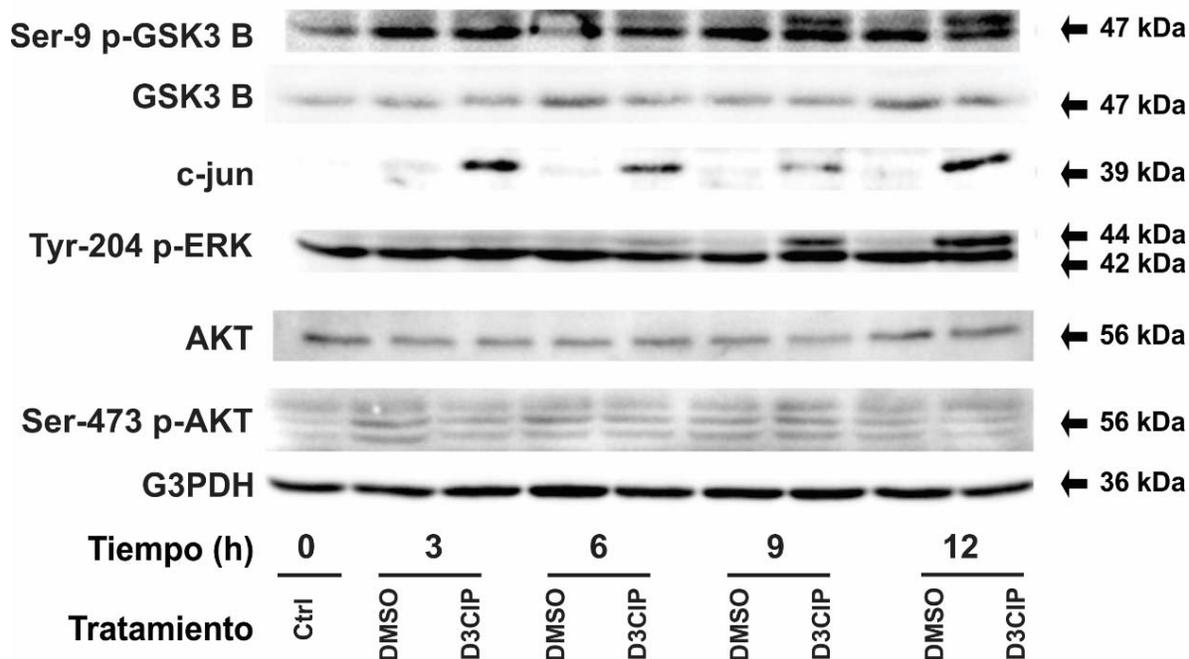


Figura 11. Fosforilación de GSK3b en la serina 9, incremento de la proteína c-jun y fosforilación de ERK en la tirosina 204 en células HeLa tratadas con DMSO (vehículo) o D3CIP a 3, 6, 9 y 12 horas de tratamiento. Se utilizó la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa como control de carga.

9.8 Inactivación de PARP y corte de Ck-18.

PARP es una enzima con actividades esenciales en reparación del DNA y necrosis. La actividad de poli-ADP-ribosilación en los sitios de ruptura de una sola cadena en el DNA (*Single Strand Breaks*) promueve el reconocimiento del sitio dañado por diversas proteínas que permiten los procesos de reparación (45). Puesto que la actividad de ADP ribosilación recae en el uso de NAD^+ , (el cual es una molécula importante para mantener activa la oxidación de azúcares), si la concentración de éste decae, el metabolismo en general decae, conduciendo a una muerte celular tipo necrótica por déficit de energía, lo que además impide la correcta consecución de la apoptosis (40). La inactivación de PARP mediada por caspasas, impide el agotamiento del NAD^+ y asegura la progresión de la muerte celular tipo apoptótica (45). El tratamiento con D3CIP induce la hidrólisis de PARP a las 9 horas de tratamiento (Fig. 12), lo cual, correlaciona también con los datos

de hidrólisis de la proteína Ck-18, la cual también es escindida por las caspasas 3, 6 y 9 durante la apoptosis celular (28, 29).(Fig. 12).

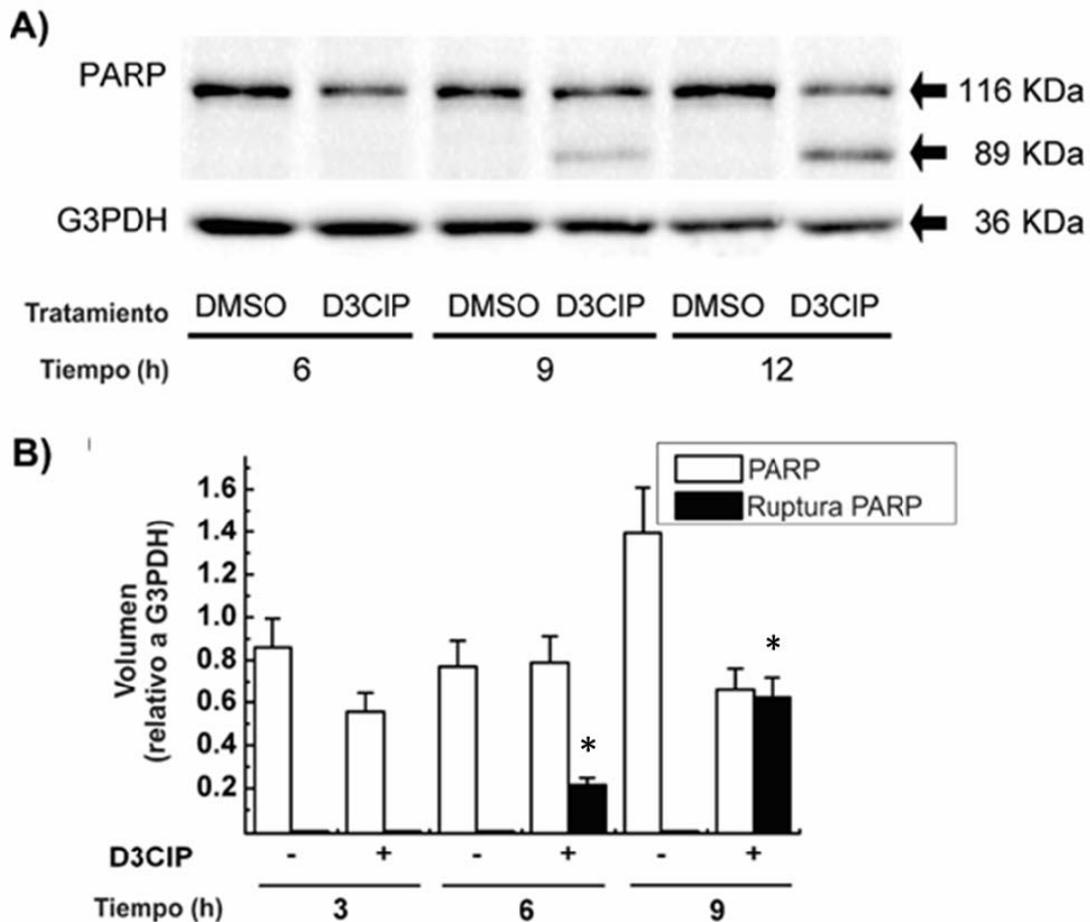


Figura 12. A) Corte de PARP en células HeLa tratadas con vehículo (DMSO) o D3CIP (15 μ M) a 3, 6 y 9 horas de tratamiento. B) Análisis densitométrico de las bandas. La Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa como control de carga. * Diferencias estadísticamente significativas (ANOVA dos vías y Tukey's HSD, $P < 0.05$) al comparar con el control DMSO (vehículo a los tiempos correspondientes), $n=3$.

Empleando la técnica de western blot y utilizando el anticuerpo M30, el cual reconoce un nuevo epítipo generado por la hidrólisis en el residuo 396 (29), se confirmó que con los tratamientos con m-AMSA y D3CIP se genera el fragmento que correspondería al corte por caspasa 6 en el aminoácido 238 y por las caspasas 3, 6 y 9 en el residuo 396, generándose un fragmento de 158 aminoácidos (18.3 kDa). Así también, se observa la presencia de otro fragmento,

el cual correspondería a los aminoácidos 1 a 396 (44.4 kDa). Se utilizó el programa Protein Molecular Weight Calculator (Science Gateway) para calcular los pesos moleculares teóricos para las especies propuestas. Ambos marcadores de apoptosis, correlacionan con la inducción de la proteína proapoptótica GADD 153 a 9 horas de tratamiento (Fig.8 y 10) y con el aumento en la citotoxicidad (Fig. 7)

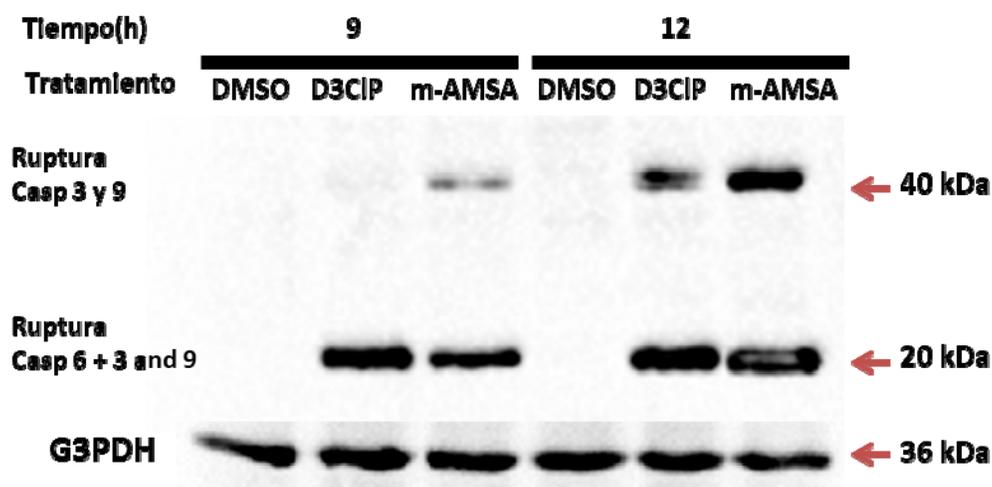


Figura 13. Identificación de los fragmentos de corte de la proteína Ck-18. Western blot de proteínas de células HeLa tratadas con D3CIP y m-AMSA a 15 μ M.

9.9 Efectos de N-acetil cisteína y 4-fenil butirato

Aún queda por elucidar cuál es el blanco terapéutico del D3CIP que promueve la activación de la UPR y el daño al DNA, por lo que es de especial interés profundizar en los posibles mecanismos o blancos de estrés vinculados a ambos procesos.

Hay reportes que asocian la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) con la activación de la UPR y con daño al material genético, por ejemplo, se ha observado la presencia de células TUNEL positivas y la activación de la UPR en ratones expuestos a condiciones hipóxicas (42).

Así también, la incubación de neuronas dopaminérgicas con 6-hidroxidopamina (compuesto que sufre una rápida oxidación en solución, generando especies

reactivas diversas), genera daño al DNA y activa marcadores específicos de la UPR, de entre ellos GADD 153 (42).

Con base en esto, se evaluó el efecto de un pretratamiento con el antioxidante N acetil cisteína (NAC) sobre la fosforilación de la histona γ H2AX. La NAC es un inductor de la generación de glutatión reducido, que actúa como un importante antioxidante intracelular (43). El resultado no da evidencia de una disminución en la acumulación de γ H2AX en células pretratadas con NAC (Fig.14), por lo que en apariencia, la producción de ROS no es el proceso desencadenante del daño al material genético, sin embargo, hace falta medir si se producen estas especies.

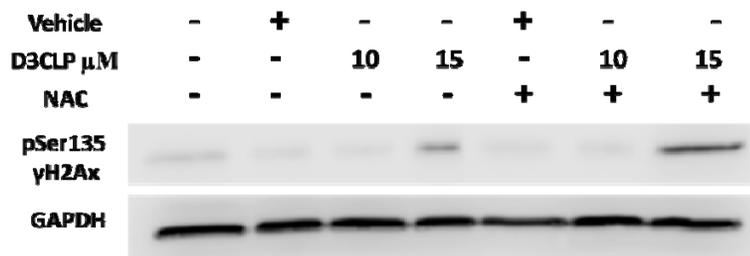


Figura 14. Inducción de la fosforilación en la serina 153 de la histona γ H2AX en células HeLa tratadas con DMSO (vehículo), D3CIP 15 μ M, N acetil cisteína (5 mM) o D3CIP + NAC a 9 horas de incubación.

Así también, se evaluó si el pre-tratamiento con el antioxidante NAC (5mM) y la chaperona química 4-fenilbutirato (4PB 2mM) retrasaba o eliminaba la producción de GADD 153, en células HeLa tratadas con D3CIP. Sin embargo, tampoco se observaron cambios en la producción de la proteína pro-apoptótica (Fig. 15), por lo que presumiblemente, las afectaciones que observamos no están relacionadas por un efecto directo del D3CIP en la producción de ROS o en el aumento en el desplegamiento o mal plegamiento de las proteínas.

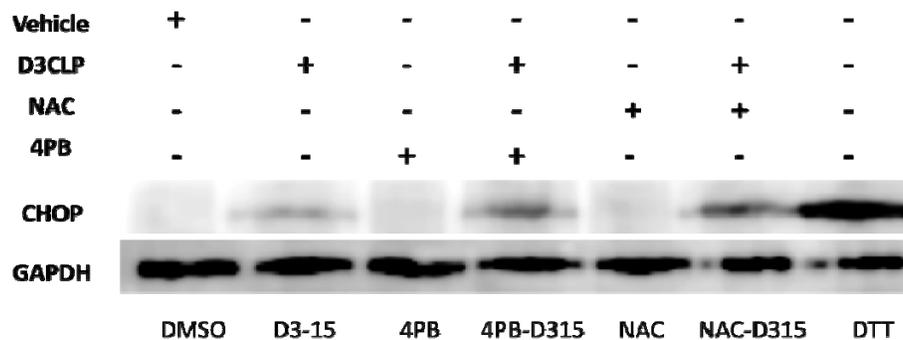


Figura 15. Inducción de la proteína GADD 153 en células HeLa tratadas con DMSO (vehículo), D3CLP (15 μ M, N acetil cisteína (5 mM), 4PB (2 mM) o DTT (5 mM) a 9 horas de incubación.

Finalmente, se determinó si la incubación con el antioxidante N-acetil-L-cisteína presentaba algún efecto sobre la viabilidad celular (medida a través de ensayos de MTT). Sin embargo, el pretratamiento con este antioxidante no mejoró la viabilidad celular de células expuestas a D3CIP (Fig. 16). Estos resultados indican que la citotoxicidad mediada por D3CIP no está mediada a través de especies reactivas de oxígeno.

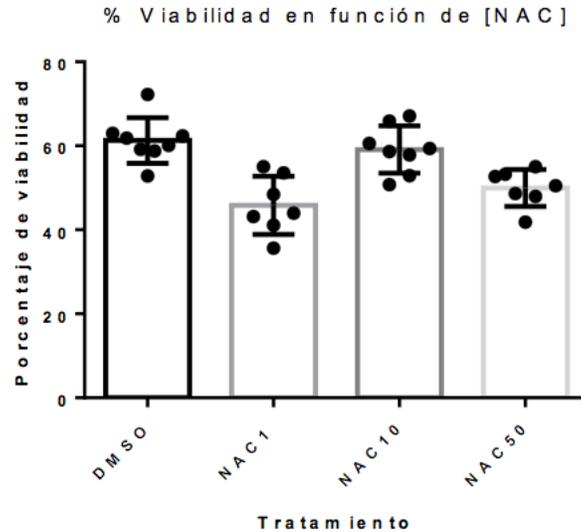


Figura 16. Efecto del pre-tratamiento con NAC a 0, 1, 10 y 50 μ M en el porcentaje de viabilidad de células HeLa tratadas con 15 μ M de D3CIP a 9 horas de incubación. ANOVA dos vías y Tukey's HSD, $P < 0.05$ al comparar con el control DMSO (vehículo), $n=3$.

10 Análisis de resultados.

A pesar de ser considerados isómeros y de presentar un potencial citotóxico semejante sobre células HeLa en cultivo, el D3CIP no actúa de la misma manera que la m-AMSA. Ambos compuestos son capaces de provocar la respuesta de daño al DNA (DDR) induciendo la fosforilación de γ H2AX, sin embargo, el mecanismo por el cual D3CIP la activa se desconoce. Por otro lado, m-AMSA no induce la acumulación del marcador de apoptosis GADD153, en tanto que D3CIP sí lo hace.

La UPR se activa por el tratamiento con D3CIP, efecto que podría estar relacionado con afectaciones a nivel de proteínas y/o a procesos que ayuden a mantener la homeostasis de las mismas.

Con los datos obtenidos experimentalmente, se planteó el siguiente modelo (Fig. 17), en el cual, el tratamiento con D3CIP promueve la activación de la UPR, aumentando la concentración de la proteína GRP78, disminuyendo NAC- α y la proteína calumenina. Los datos indican que muy posiblemente GRP78 es liberado de su unión a IRE1a y PERK activando la UPR, lo que se detectó midiendo la

inducción de *xbp1* y *GADD 153*, respectivamente. La estabilización de *xbp1* promovería su traducción y su actividad como factor de transcripción, llevando a la transcripción de genes importantes para la eliminación y recambio de proteínas (tales como *atg4*), y de proteínas importantes en la activación de la autofagia, como lo es la acumulación de la proteína LC3B-II, la cual ha sido descrita como un marcador de la inducción de la autofagia o de inhibición de la misma (44). El incremento de *GADD 153* a través de la traducción diferencial de ATF4 derivado de la activación de PERK, promovería la disminución de la proteína anti-apoptótica Bcl2 y la inducción de Bax y Bak, favoreciendo la liberación del citocromo C y la formación del apoptosoma. El tratamiento con D3CIP disminuye la cantidad de protimosina, un conocido inhibidor de la formación de este complejo pro-apoptótico. Una vez activo, el apoptosoma activaría las caspasas 3, 6 y 9 y promovería el corte de Ck-18 y PARP y la consecución final de la apoptosis.

A pesar de que no se identificó el blanco farmacológico del D3CIP, se demostró que este compuesto actúa de una forma peculiar, ya que puede activar la DDR (vía *gh2ax*) y la UPR (activación de IRE1alpha y *GADD153*). Estas señales de estrés pueden promover apoptosis por vías compartidas o independientes (45), sin embargo, el hecho de no depender de un solo estrés para activar la muerte celular, hace al D3CIP un fármaco potencial interesante, ya que esta característica podría reducir considerablemente la resistencia al tratamiento (3, 45).

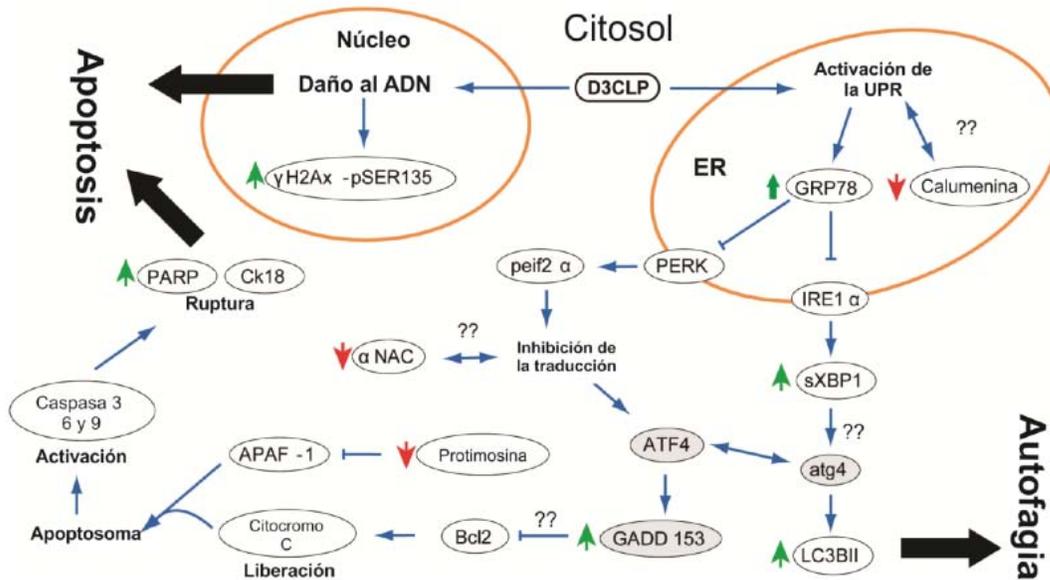


Figura 17. Modelo de la activación de la UPR por D3CIP. Con flechas rojas y verdes, las proteínas y transcritos que han sido determinados experimentalmente por WB, espectrometría de masas o PCR.

11 Conclusiones

El tratamiento con D3CIP en células HeLa activa la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y genera el marcador de muerte celular derivado de la UPR GADD153.

Se observó la hidrólisis de las proteínas marcadoras de apoptosis PARP y Ck-18. Estos datos correlacionan con la disminución de la viabilidad celular y con la dinámica de activación de GADD 153.y el decremento de la proteína antiapoptótica protimosina.

12 Perspectivas

La principal derivación de este trabajo será identificar cómo se lleva a cabo la activación de la UPR mediada por D3CIP

Una posibilidad es que el D3CIP se una directamente a las proteínas, afectando su estructura y/o plegamiento y de esta forma activando la UPR.

Así también, podría estar incidiendo directamente sobre procesos elementales en la homeostasis de las proteínas, por ejemplo, inhibiendo chaperonas o afectando sistemas de señalización que derivan en los sistemas de recambio de proteínas, por ejemplo, la autofagia.

Al incubar con D3CIP a las células HeLa, se observaron respuestas al daño al material genético y la activación de la UPR, dos respuestas a estrés para dos componentes esenciales en cualquier célula: el DNA y las proteínas. Sería interesante investigar cómo podrían estar ligadas ambas respuestas y analizar los dos efectos por separado (empleando inhibidores específicos para cada una de las dos vías) e identificar hasta qué punto cada una de estas vías contribuye a la activación de la apoptosis.

Adicionalmente, se buscaría analizar si las demás tiazoloquinolinas citotóxicas activan la UPR y el daño al DNA de manera similar al D3CIP.

13 Bibliografía

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4; 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Review. PubMed PMID: 21376230.
2. Avendaño C., Menéndez J.C. *Medicinal Chemistry of anticancer drugs*, 1a Ed. 200-205. Elsevier Science Publishing Company. 2008.
3. Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*. 2014 Sep 5;6(3):1769-92. doi: 10.3390/cancers6031769.
4. D.E. Thurston, *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, ed. CRC Press SA. 2007.
5. *New Developments in Medicinal Chemistry, Volumen 2*
6. Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1993 Dec;15(3):191-219. Review. PubMed PMID: 8142057.
7. Martino E, Della Volpe S, Terribile E, Benetti E, Sakaj M, Centamore A, Sala A, Collina S. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Feb 15;27(4):701-707. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.12.085. Epub 2016 Dec 31. Review. PubMed PMID: 28073672.
8. Malonne H, Atassi G. DNA topoisomerase targeting drugs: mechanisms of action and perspectives. *Anticancer Drugs*. 1997 Oct;8(9):811-22. Review. PubMed PMID: 9402307.

9. Hinds M, Deisseroth K, Mayes J, Altschuler E, Jansen R, Ledley FD, Zwelling LA. Identification of a point mutation in the topoisomerase II gene from a human leukemia cell line containing an amsacrine-resistant form of topoisomerase II. *Cancer Res.* 1991 Sep 1;51(17):4729-31. PubMed PMID: 1651812.
10. Rodríguez-Loaiza P, Quintero A, Rodríguez-Sotres R, Solano JD, Lira-Rocha A. Synthesis and evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as potential antitumorals. *Eur J Med Chem.* 2004 Jan; 39(1):5-10. PubMed PMID: 4987829.
11. González-Sánchez I, Solano JD, Loza-Mejía MA, Olvera-Vázquez S, Rodríguez-Sotres R, Morán J, Lira-Rocha A, Cerbón MA. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur J Med Chem.* 2011 Jun;46(6):2102-8. doi:10.1016/j.ejmech.2011.02.063. Epub 2011 Mar 3. PubMed PMID: 21420205.
12. Paez Franco. JC. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. 2012.
13. Shoemaker RH. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer.* 2006 Oct;6(10):813-23. Review. PubMed PMID: 16990858.
14. Muroi M, Kazami S, Noda K, Kondo H, Takayama H, Kawatani M, Usui T, Osada H. Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action. *Chem Biol.* 2010 May 28;17(5):460-70. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.03.016. PubMed PMID: 20534344.
15. Kawatani M, Takayama H, Muroi M, Kimura S, Maekawa T, Osada H. Identification of a small-molecule inhibitor of DNA topoisomerase II by proteomic profiling. *Chem Biol.* 2011 Jun 24;18(6):743-51. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.03.012. PubMed PMID: 21700210.
16. Bandow JE, Brötz H, Leichert LI, Labischinski H, Hecker M. Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Mar;47(3):948-55. PubMed PMID: 12604526; PubMed Central PMCID: PMC149304.
17. Le Roch KG, Johnson JR, Ahiboh H, Chung DW, Prudhomme J, Plouffe D, Henson K, Zhou Y, Witola W, Yates JR, Mamoun CB, Winzeler EA, Vial H. A systematic approach to understand the mechanism of action of the bithiazolium compound T4 on the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics.* 2008 Oct 30;9:513. doi: 10.1186/1471-2164-9-513.
18. Wang Y, He QY, Che CM, Chiu JF. Proteomic characterization of the cytotoxic mechanism of gold (III) porphyrin 1a, a potential anticancer drug. *Proteomics.* 2006 Jan;6(1):131-42. PubMed PMID: 16287165.
19. Shore GC. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Apr;23(2):143-9.
20. Glimcher LH. Protein homeostasis networks in physiology and disease. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Apr;23(2):123-5.
21. Panasenko OO. Ribosome association and stability of the nascent polypeptide-associated complex is dependent upon its own ubiquitination. *Genetics.* 2009 Feb;181(2):447-60.

22. Hotokezaka Y. alphaNAC depletion as an initiator of ER stress-induced apoptosis in hypoxia. *Cell Death Differ.* 2009 Nov;16(11):1505-14.
23. Arsenovic PT. Depletion of the *C. elegans* NAC engages the unfolded protein response, resulting in increased chaperone expression and apoptosis. *PLoS One.* 2012;7(9):e44038.
24. Expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease. *Bioessays.* 2009 Mar;31(3):262-77.
25. Orrenius S. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552-65.
26. Evstafieva AG. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res.* 2003 Apr 1;284(2):211-23.
27. Riedl SJ. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 May;8(5):405-13.
28. Cha SI. Cleaved cytokeratin-18 is a mechanistically informative biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res.* 2012 Nov 20;13:105.
29. Olofsson MH. Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007 Jun 1;13(11):3198-206.
30. Li Z. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J Hematol Oncol.* 2011 Feb 23;4:8.
31. Benbrook DM, Long A. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol.* 2012 Oct;34(3):286-97. PubMed PMID: 23070014.
32. Shore GC. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Apr;23(2):143-9.
33. Morishima N, Nakanishi K, Nakano A. Activating transcription factor-6 (ATF6) mediates apoptosis with reduction of myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1) protein via induction of WW domain binding protein 1. *J Biol Chem.* 2011 Oct 7;286(40):35227-35. doi: 10.1074/jbc.M111.233502. Epub 2011 Aug 13. PubMed PMID: 21841196; PubMed Central PMCID: PMC3186435.
34. Kohno K. Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Apr;23(2):135-42.
35. Gray MD. Activation of the unfolded protein response is necessary and sufficient for reducing topoisomerase IIalpha protein levels and decreasing sensitivity to topoisomerase-targeted drugs. *Mol Pharmacol.* 2005 Dec;68(6):1699-707.
36. Gorman AM. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther.* 2012 Jun;134(3):306-16.
37. Darling NJ. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Oct;1843(10).
38. Zhao Y. Subtilase cytotoxin activates MAP kinases through PERK and IRE1 branches of the unfolded protein response. *Toxicol Sci.* 2011 Mar;120(1):79-86.
39. Raab MS. Targeting PKC: a novel role for beta-catenin in ER stress and apoptotic signaling. *Blood.* 2009 Feb 12;113(7):1513-21

40. Surova O. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2012 Dec 3.
41. Tagliavacca L. In vivo up-regulation of the unfolded protein response after hypoxia. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jul;1820(7):900-6.
42. Bernstein AI. 6-OHDA generated ROS induces DNA damage and p53- and PUMA-dependent cell death. *Mol Neurodegener*. 2011 Jan 6;6(1):2.
43. Aruoma OI. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*. 1989;6(6):593-7.
44. Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem*. 2004 Aug;263(1-2)
45. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2603-14. Review. PubMed PMID: 11675328.