



**Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**

**Memoria para optar al Título de Bioquímico.**

**“Acción antitumoral mediada por 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxi-naftaleno- 1- ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA).”**

**Jorge Alberto Simon Carvelli**

**Profesor Patrocinante  
Dr. Dante Miranda W.**  
Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Director de Tesis  
Dr. Dante Miranda W.**  
Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular  
Facultad de Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Santiago de Chile  
Noviembre 2006**

## ÍNDICE GENERAL

		Página
	Índice general	i
	Índice de figuras	ii
	Índice de tablas	iv
	Abreviaturas	v
	Resumen	vi
	Summary	viii
<b>1</b>	Introducción	1
<b>2</b>	Hipótesis.	10
<b>3</b>	Objetivos.	10
<b>3.1</b>	Objetivos General.	10
<b>3.2</b>	Objetivos Específicos.	10
<b>4</b>	Materiales y Métodos.	12
<b>4.1</b>	Reactivos.	12
<b>4.2</b>	Cultivo Celular.	12
<b>4.3</b>	Viabilidad Celular.	12
<b>4.4</b>	Efecto Combinado de los compuestos DHN y DHA más antiinflamatorios sobre viabilidad de células U937 y K562.	13
<b>4.5</b>	Expresión de Ciclooxygenasa – 2.	13
<b>4.6</b>	Determinación Potencial Mitocondrial	14
<b>4.7</b>	Generación Especies Reactivas de Oxígeno.	15
<b>4.8</b>	Ensayo Citotoxicidad.	16
<b>4.8.1</b>	Obtención y tratamiento previo de Células Mononucleares.	16
<b>4.8.2</b>	Ensayo de Citotoxicidad.	16
<b>5</b>	Resultados	18
<b>5.1</b>	Efecto de DHN y DHA sobre la viabilidad de las líneas celulares U937 y K562.	18
<b>5.2</b>	Ensayos de Viabilidad sobre células mononucleares de sangre periférica. (PBMC)	22
<b>5.3</b>	Efecto Combinado de los compuestos DHN y DHA más antiinflamatorios sobre viabilidad de células U937 y K562	24
<b>5.4</b>	Expresión de Ciclooxygenasa-2	26
<b>5.5</b>	Determinación de Potencial Mitocondrial	29
<b>5.6</b>	Generación Especies Reactivas de Oxígeno	33
<b>5.7</b>	Actividad citotóxica de células NK - Inmunidad Innata	36
<b>6</b>	Discusión	40
<b>7</b>	Conclusiones	44
<b>8</b>	Bibliografía	45

## INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad de U937 a 48 horas	18
Figura 2	Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad de U937 a 72 horas	19
Figura 3	Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad de K562 a 48 horas	20
Figura 4	Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad de K562 a 72 horas	21
Figura 5	Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad de PBMC a 48 horas	22
Figura 6	Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad de PBMC a 72 horas	23
Figura 7	Efecto combinado antineoplásico DHN - antiinflamatorio	24
Figura 8	Efecto combinado antineoplásico DHA - antiinflamatorio	25
Figura 9	Muestra de Films obtenidos luego del revelado	26
Figura 10	Efecto de DHN sobre expresión de Cox-2	27
Figura 11	Efecto de DHA sobre expresión de Cox-2	28
Figura 12	DHN y DHA sobre potencial mitocondrial en K562	30
Figura 13	DHN y DHA sobre potencial mitocondrial en PBMC	31
Figura 14	Despolarización de Membrana Mitocondrial por DHN para células K562 y PBMC	32
Figura 15	Despolarización de Membrana Mitocondrial por DHA para células K562 y PBMC	32
Figura 16	Generación de ROS por DHN y DHA sobre células K562	33
Figura 17	Generación de ROS por DHN en células K562 y PBMC	34
Figura 18	Generación de ROS por DHA en células K562 y PBMC	35
Figura 19	Efecto de DHN 0,1µM sobre actividad NK	36
Figura 20	Efecto de DHN 1µM sobre actividad NK	37

Figura 21	Efecto de DHA 0,1 $\mu$ M sobre actividad NK	38
Figura 22	Efecto de DHA 1 $\mu$ M sobre actividad NK	38

## INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Cuadro resumen de valores $IC_{50}$ para DHN y DHA para células U937 y K562.	21
Tabla 2	Concentraciones y distribución de ellas en Gel de Electroforesis-SDS.	26

## Abreviaturas.

$\mu\text{M}$	Micromolar
AKT	Serina treonina quinasa
ATP	Adenosin trifosfato
CM-H2DCFDA	5,6-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato, acetil ester
Cox-2	Ciclooxigenasa tipo 2
DHA	9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno
DHN	4,4-Dimetil-5-8-dihidroinaftaleno-1-ona
FADH <sub>2</sub>	Flavin adenin dinucleótido
GM-CSF	Factor estimulante de colonia granulocito macrófago
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HIF-1	Factor inducido por hipoxia
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazina N-2-etanosulfónico
IFN- $\gamma$	Interferón gama
IL-1 $\beta$	Interlequina 1 beta
IL-12	Interlequina 12
IL-2	Interlequina 2
IL-6	Interlequina 6
ITAM	Motivos de activación basados en tirosina.
ITIM	Motivos de inhibición basados en tirosina.
LPS	Lipopolisacarido
MAPK	Kinasa de proteína activada por mitógeno
MIF-1	Factor inhibidor de migración de macrófago-1
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamina adenin di-nucleótido
NF- $\kappa$ B	Facto nuclear capa B
NK	Natural killer
nM	Nanomolar
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PG12	Prostaciclina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
PGHS	Prostaglandina endoperoxido H sintasa
PI-3K	Fosfatidilinositol-3 quinasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCR	Receptor células T
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	Activador tisular del plasminógeno
TxA2	Tromboxano A2

## Resumen

El cáncer es una patología que ha concentrado por muchos años, una gran atención y constante investigación en búsqueda de nuevos fármacos para su tratamiento. Con el objeto de desarrollar nuevas terapias contra esta enfermedad, analizamos el potencial antineoplásico de dos nuevos compuestos orgánicos: 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxinaftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA). En primera instancia estudiamos el efecto de estos compuestos sobre la proliferación de células tumorales humanas U937 y K562, mediante el método de exclusión del colorante azul de tripan. Los resultados mostraron en ambas líneas celulares que DHN y DHA provocaron una disminución de la viabilidad en forma dosis-dependiente, con selectividad sobre células tumorales y no sobre células normales (PBMC) con un  $IC_{50}$  a 72 horas de 7,96  $\mu$ M para DHA y 40,39  $\mu$ M para DHN en U937 y de 0,68  $\mu$ M para DHA y 32,10  $\mu$ M para DHN en K562. Sabiendo que señales proinflamatorias favorecen el proceso carcinogénico, se estudió el efecto que tendrían ambos compuestos sobre la expresión de Cox-2 en células U937, previamente diferenciadas a macrófago con TPA y estimuladas con LPS. Los inmunowesterblot mostraron una disminución de la inducción y expresión de dicha enzima por acción de DHA a una concentración de 10  $\mu$ M.

Mediante ensayos de viabilidad se observó que ambos compuestos en combinación con extractos naturales no exhiben mayor efecto inhibitorio sobre la viabilidad; sin embargo, con indometacina un antiinflamatorio conocido, se potencia el efecto inhibitorio que tiene DHA. Por otra parte, mediante citometría de flujo se midió el efecto de DHN y DHA sobre el potencial de membrana mitocondrial con rodamina 123 y la generación de ROS mediante CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Los resultados muestran una despolarización de la membrana por acción de ambos compuestos en especial por DHA y una baja generación de ROS por parte de ambos.

Dado que las células NK constituyen un importante mecanismo de defensa antitumoral, se evaluó el efecto de DHN y DHA sobre la actividad citotóxica mediada por células NK midiendo la liberación de <sup>51</sup>Cr desde células blanco K562. Los resultados indicaron que ambos compuestos no alteran la respuesta normal de las células NK.

De acuerdo a estos resultados podemos inferir que DHA y DHN ejercen una importante acción antitumoral inhibiendo la proliferación de células tumorales. Sin embargo el efecto de DHA es mayor al de DHN, esto podría explicarse probablemente debido a un efecto citotóxico mediado por la despolarización de la membrana mitocondrial, y/o inhibiendo la respuesta proinflamatoria mediada por Cox-2, sin generación de especies reactivas por parte de ningún compuesto y sin afectar la respuesta inmune innata.

## SUMMARY

### Anti-tumor action by 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxi-naftaleno-1-ona (DHN) and 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-anthraceno (DHA)."

Cancer is a pathology that has concentrated, a great deal of attention in biological research aimed principally to find new drugs for its treatment. For this reason we decided to study the antitumoral effects of two new organic compounds: 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxi-naftaleno-1-ona (DHN) and 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-anthraceno (DHA). In the first place we studied the effect of these compounds on the proliferation of two human tumor cells lines, U937 and K562, using the trypan blue dye exclusion method. Our data showed a decrease on the cell viability in a dose-dependent manner. Tumor cell lines resulted more sensitive to these compounds. Thus the IC<sub>50</sub> values were 7.96  $\mu$ M for DHA and 40.39  $\mu$ M for DHN in U937; 0.68  $\mu$ M for DHA and 32.10  $\mu$ M for DHN in K562. Interestingly PBMC viability was not affected by these compounds.

It has been shown that proinflammatory signals favor the carcinogenic process. Thus we evaluated the effect of DHN and DHA on the *in vitro* LPS-induced COX-2 expression. Our results showed that both compounds partially inhibited LPS-induced expression of COX-2. A 60 % and 80% suppressed expression of COX-2 were observed by DHN and DHA respectively. On the other hand, these compounds in combination with anti-inflammatory natural plants extracts did not shown any additive effect upon tumour cell viability. Nevertheless, indometacina a well known antiinflammatory drug, in combination with DHA increased the tumour cell citotoxicity effect. In order to understand the mechanism of action of these compounds we evaluated whether the mitochondrial membrane potential of K562 cells could change due to DHA and DHN. Our results showed that treatment with both compounds induced a depolarization of the mitochondrial membrane as assessed with rhodamine123. Moreover, the depolarization induced by DHA was higher than DHN. On the other hand, when we study the effects of DHA and DHN on the intracellular formation of reactive oxygen species no ROS generation was detectable by any of these compounds. Moreover our findings show that both compounds could protect from ROS at 25  $\mu$ M.

NK cells constitute an important mechanism of antitumor defense. For this reason it is desirable that DHN and DHA did not affect at all the NK cell function. Thus, NK cytotoxic activity was measured using the  $^{51}\text{Cr}$  release assay from the target cell K562. Our results indicated that neither DHA nor DHN affected NK cytotoxic activity.

According to these results we can conclude that DHA exerts an important antitumor upon U937 and K562 tumor cells, probably due to the depolarization of the mitochondrial membrane, and/or inhibiting the expression of Cox-2, without generation of reactive species and without affecting the innate immune response.

## 1.- Introducción

Cáncer se define como una patología caracterizada por la activación de genes específicos (oncogenes) e inactivación de genes que suprimen variables que finalmente desencadenan condiciones para activar una célula tumoral; la célula cancerígena adquiere una proliferación descontrolada, capacidad de metástasis y una alta capacidad de evasión del sistema inmune, características que dan a la célula tumoral una ventaja frente a una célula normal.

El desarrollo tumoral así como características de la respuesta inflamatoria, están muy relacionados (Balkwill F. et.al., 2001; Coussens L. et. al., 2002; PUNCHARD N. et. al., 2004; Sporn M. et. al., 1986). Muchas investigaciones hablan de la estrecha relación que existe entre una inflamación crónica y desarrollo tumoral, algunos ejemplos de esta relación se ve en patologías como: Virus papiloma, cáncer cérvico uterino, y esófago, infección por *Helicobacter Pílori*, adenocarcinoma gástrico, cirrosis hepática, algunos tipos de carcinoma y cáncer pulmonar (Munger K. et. al., 2002; Castle P. et.al., 2001; Syrjanen K. et. al., 2002; Hillerman M. et. al., 2004; Manninga C. et. al., 2002). Muchas propuestas señalan que la respuesta inflamatoria no solamente favorece el desarrollo de tumores, sino también una defensa frente a la respuesta del sistema inmune contra la presencia de células tumorales. Lo que nos lleva a concluir que muchos mediadores celulares y moleculares que participan activamente en la respuesta inflamatoria ejercen una función en el proceso oncogénico; un ejemplo de esto es que varias citoquinas inflamatorias tienen importancia en el crecimiento y viabilidad de éstas células tumorales (Meyer-Siegler K. et. al., 2004).

La inflamación es una respuesta fisiológica localizada y protectora de los tejidos vascularizados frente a algún daño, en donde mediadores solubles y celulares cumplen una importante función, tanto en la respuesta aguda como en el establecimiento de una inflamación crónica. La respuesta inflamatoria se caracteriza principalmente por la activación de procesos mediados por células tales como: el reclutamiento de leucocitos al sitio dañado y la activación de células del sistema inmune y células propiamente inflamatorias. Los procesos inflamatorios también están regulados por mediadores solubles tales como citoquinas, quimioquinas, componentes

del complemento, mediadores lipídicos e intermediarios reactivos de oxígeno y de nitrógeno y moléculas de adhesión que participan en la comunicación célula-célula (Ward C. et. al., 2000). En el caso en que la inflamación alcanza su grado crónico, puede producirse un desequilibrio en el fino balance de componentes que participan e inducen la respuesta, llegando a provocar por ejemplo: proliferación celular, adhesión celular, neovascularización, diferenciación celular, todos estos eventos de la respuesta inflamatoria pueden a su vez favorecer el desarrollo de células malignas (tumoraes) (Park C. et. al., 2003; Felty Q. et. al., 2005). El proceso inflamatorio requiere de una serie de pasos de señalización caracterizado por la aparición de mediadores celulares como son las Interleuquinas, que son captadas por receptores específicos de la célula en donde se desarrolla una vía transduccional en donde participan mediadores moleculares como MAPK, TNF- $\alpha$  (Herlaar E. et. al., 1999) y la activación del factor transcripcional NF-kB; factor responsable de la regulación de genes de IL-6, IL-12, MIF-1, TNF-a y Cox-2 (Poynter M. et. al., 1998; Liang M. et. al., 2006). Se sabe que la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  estimula la expresión del factor transcripcional HIF-1a, involucrado en el desarrollo metastásico y que esta estimulación es dependiente de la activación de NF-kB un factor activado por la acción de PI-3K y también por AKT. Tanto IL-1 $\beta$ , como TNF- $\alpha$  están involucrados en la activación de NF-kB relacionado directamente con la activación y expresión celular de la isoforma 2 de la enzima ciclooxigenasa (Cox-2) (Jung Y. et. al., 2003; Barrios M. et. al., 1999; Berg D. et. al., 2002).

La Ciclooxigenasa-2 (Cox-2) es una enzima que se ha visto altamente expresada en cáncer esofágico, cáncer pulmonar, gástrico, colon, próstata, mama y mesotelioma, y se sabe que su expresión favorece la tumorigénesis así como su inhibición se relaciona con un efecto antineoplásico; lo que nos permite establecer un puente de unión importante entre lo que es la respuesta inflamatoria y el desarrollo de un tumor. Como responsable de la biosíntesis de las prostaglandinas inflamatorias, los niveles de Cox-2 se pueden incrementar de diez a veinte veces durante la inflamación; especialmente en macrófagos, monocitos, membrana sinovial, condrocitos, fibroblastos y células endoteliales (Romano M. et. al., 2003; Hong-Ping Y. et. al., 2005; Williams C. et. al., 2000). Por esta razón se ha abordado recientemente el estudio de posibles inhibidores de la expresión o activación de Cox-2 para inhibir el crecimiento tumoral.

Algunos de estos inhibidores se han aislado de plantas medicinales como la *Scutellaria baicalensis* (Zhang D. et. al., 2003) usada en la medicina tradicional china por sus efectos antiinflamatorios por ejemplo; demostrando eficacia para inhibir el crecimiento de células de cáncer de cabeza y cuello.

La Ciclooxygenasa es una enzima bi-funcional, con actividad dioxigenasa (formación de PGG<sub>2</sub>) y actividad peroxidasa (transformación de PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub>). Es esta actividad enzimática global la que se denomina ciclooxygenasa (COX) o PGH sintetasa (PGHS). La PGH<sub>2</sub> es inestable y puede ser transformada en productos biológicamente activos, tales como PGs primarias (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>), tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), dependiendo del tipo celular comprometido. La ciclooxygenasa existe en dos isoformas conocidas, una constitutiva Cox-1 y otra inducible Cox-2. Cox-2 cataliza la formación de prostaglandina E (PGE<sub>2</sub>) a partir de ácido araquidónico (Romano M. et. al., 2003; Barrios M. et. al., 1998; Mifflin R. et. al., 2001). Las prostaglandinas cumplen una importante función fisiológica como inductores en la agregación plaquetaria y hemostasis. La principal diferencia entre las 2 isoenzimas está en la regulación de su actividad enzimática. Son codificadas por genes separados localizados en distintos cromosomas 9 y 1 para Cox-1 y 2 respectivamente, que son regulados en forma diferente en las células. Sin embargo, presentan ciertas características comunes ya que su estructura es similar, presentando una homología del 60% y que conservan regiones importantes para la función enzimática (Romano M. et. al., 2003).

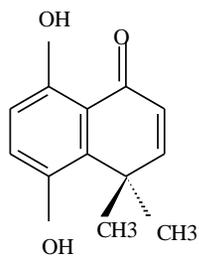
Se puede considerar a Cox-1 como una enzima constitutiva, presente en la mayoría de los tejidos y que estaría involucrada en la mantención de las funciones fisiológicas, tales como la regulación del metabolismo renal del H<sub>2</sub>O y sodio Na<sup>+</sup>, la secreción de ácido gástrico y la hemostasis. Cox-2 de 604 aminoácidos, y de peso molecular cercano a 70 Kda. Es inducida principalmente por estímulos mitogénicos o inflamatorios como citoquinas (especialmente IL-1  $\alpha$  y  $\beta$ ), factores de crecimiento, hormonas o factores tumorales (Romano M. et. al., 2003). La inducción de Cox-2 es muy rápida, transitoria y puede ser cuantitativamente muy importante (Hillerman M. et. al., 2003; Nagano S. et. al., 2001; Suo-Lin F. et. al., 2005; Berg D. et. al., 2002; Tegeder I. et. al., 2001; Wang T. et. al., 2004). El estudio de terapias antitumorales está abordando la factibilidad de detener el crecimiento de células tumorales mediante la

inhibición de señales proinflamatorias, en especial inhibir Cox-2 (Rigas B. et. al., 2005); ya que como se mencionó anteriormente está sobreexpresada en distintos tipos de tumores.

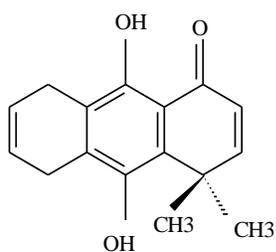
La destrucción selectiva de células tumorales sin afectar a células normales es un punto importante. Muchos compuestos sintetizados y aislados de la naturaleza tienen como objetivo atacar principalmente procesos de carcinogénesis. En general las drogas antitumorales se clasifican en agentes que dañan el DNA, antimetabolitos, inhibidores del ciclo celular, análogos de nucleótidos e inhibidores de topoisomerasas (Herr I. et. al., 2001 ; Alderden R. et. al., 2006). También hay formas de inducir apoptosis de la célula tumoral mediando daño al DNA, falla en componentes de membrana y desbalance de proteínas celulares que provocan un stress celular (Opipari A. et. al., 2004; Park J. et. al., 2003; Castello L. et. al., 2005). Así, el mecanismo apoptótico de la célula constituye un blanco de acción farmacológica, y donde el conocimiento de la función mitocondrial resulta vital en este proceso. La mitocondria es un organelo que juega un papel fundamental en la síntesis de ATP, metabolismo oxidativo y particularmente apoptosis (Modica J. et. al., 2002; Lizard G. et. al., 1995). Este organelo es capaz de llevar a cabo complejas reacciones metabólicas que llevan a la formación de energía en forma de ATP, mediante el desarrollo de reacciones de óxido reducción, mediante la relación de procesos como Ciclo de Krebs desarrollado en la matriz mitocondrial y fosforilación oxidativa en donde aparece la cadena transportadora de electrones realizada en la membrana interna en donde intervienen los principales transportadores electrónicos NADH y FADH<sub>2</sub>. Mediante la cadena transportadora de electrones donde participan los complejos enzimáticos (I, II, III, IV) la mitocondria crea las condiciones necesarias de potencial de transmembrana mitocondrial (traducidos en la concentración de cargas positivas y negativas a ambos lados de la membrana mitocondrial), mediante la acción de los complejos I, III y IV capaces de trasladar protones hacia el espacio intermembrana; logrando formar la gradiente de protones (fuera de la membrana interna). Esta diferencia provoca una diferencia de potencial necesaria para la formación de ATP mediante el accionar de un quinto complejo (ATP sintasa) (Modica J. et. al., 2002; Lizard G. et. al., 1995; Tan S. et. al., 2006). En células tumorales se ha visto que el metabolismo mitocondrial está altamente activo, ya que como estas células están en constante crecimiento y

proliferación, demanda una alta actividad metabólica (Modica J. et. al., 2002; Falchi A. et. al., 2005; Scaduto R. et. al., 1999). La apoptosis mediada por la mitocondria esta gatillada por distintas señales como: especies reactivas de oxígeno, daño al DNA nuclear, cambios en el potencial transmembrana con la consecuente liberación de citocromo c (Krysko D. et. al., 2001; Falchi A. et. al., 2005; Kiritoshi S. et. al., 2003; Sánchez-Alcázar J. et. al., 2001); éstas promueven señales proapoptóticas como Bax y Bcl-2, proteínas que activan cascadas de señalización donde participan caspasas donde finalmente la Caspasa-3 inicia un proceso degradativo del material genético, el comienzo del proceso apoptótico. (Modica J. et. al., 2002; Pallis M. et. al., 2001)

La investigación en quimioterapia busca compuestos que destruyan la célula maligna mediante la intervención de su metabolismo. Algunos de origen sintético y otros de origen natural atacan distintos blancos dentro de la célula tumoral. La síntesis de nuevos compuestos que sirvan para inhibir el crecimiento de células tumorales es la tarea. Muchos compuestos químicos como las antraquinonas son conocidos por actuar a nivel del DNA, intercalándose en él, provocando la muerte celular (Alderden R. et. al., 2006). Estas moléculas (antraquinonas) también conocidos como: “agentes intercalantes derivados de antraquinonas”; son descritos también como inhibidores de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, inhibidores de la respiración celular, desacopladores de la fosforilación oxidativa o causantes del déficit de ATP que provoca una serie de eventos que conllevan a la célula a la muerte (Falchi A. et. al., 2005; Kiritoshi S. et. al., 2003; Araya R. et. al., 2006; Araya R., Delgado T. et.al., 2002). A partir de esta idea se han sintetizado dos compuestos con esperable y deseable características antineoplásicas: 4,4-Dimetil-5,8-dihidroxi-naftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA). Estos compuestos fueron estudiados sobre líneas celulares: carcinoma de ratón (TA3), una variante resistente a drogas TA3-MTX-R (Araya R. et. al., 2006; Araya R., Delgado T. et.al., 2002).



4,4-Dimetil-5-8-dihidroinaftaleno-1-ona (DHN)



9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA)

Por otro lado estudios químicos y farmacológicos han demostrado la existencia de muchas moléculas nuevas en especies naturales (o plantas), un ejemplo de esto es la especie *Mullinum*, en donde se ha encontrado mediante la extracción con éter de petróleo un diterpenoide denominado Mulinano (Loyola et. al., 1990), el Acido mulin-11,13-dien-20-oico (M2). Este compuesto fue extraído de especies nativas de la Cordillera de los Andes y algunos resultados experimentales señalan a este como compuesto con propiedades antiinflamatorias presentando un efecto inhibitorio sobre el ácido araquidónico cercano a un 56 %, lo que se consideró como una alta actividad antiinflamatoria (Salinas J., 2004; Calderón J., 2003; Gutierrez P., 2005). Otro extracto extraído de *Buddleja Globosa* (Matico), usado folclóricamente para curar heridas, presenta alta capacidad antioxidante y antiinflamatoria, y con capacidad estimuladora en el crecimiento de fibroblastos (Mensah A., 2001; Houghton P., 2005).

Por estas razones se decidió estudiar en la presente memoria las características antineoplásicas y antiinflamatorias de los compuestos 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxi-naftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA); además mediante viabilidad; evaluar su efecto en combinación con extractos naturales: Matico y Acido mulin-11,13-dien-20-oico (M2) (diterpenoide extraído de *Mullinum crossifolium*) (Loyola et. al., 1990; Mensah A. et. al., 2001; Houghton P. et. al., 2005) ambos con un efecto antiinflamatorio observado experimentalmente. Lo descrito permite iniciar la investigación, observando, evaluando y analizando en definitiva, que efecto poseen sobre dos líneas celulares: leucemia mieloide humana U937 y línea celular de eritroleucemia derivada de leucemia mieloide crónica K562; los compuestos 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxi-naftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) observando el comportamiento de éstos sobre: viabilidad celular, potencial mitocondrial, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), expresión de Cox-2; y evaluando además sobre la viabilidad, que efecto provoca la combinación de ambos compuestos, con M2, Matico y un antiinflamatorio conocido (Mei Li D. et. al., 2000; Eli Y. et. al., 2001).

En la búsqueda de nuevas moléculas con potencial acción antineoplásica es fundamental evaluar sus posibles efectos adversos. En este sentido es deseable que una terapia antitumoral no afecte la respuesta inmune. En relación a las células tumorales, una importante arma defensiva la constituyen las células NK.

Pertencientes a una subpoblación de linfocitos que ejercen una acción citotóxica contra células tumorales. Fenotípicamente identificadas por la expresión de moléculas de adhesión CD56 (Chace J.H., et. al., 1997; García P. et. al., 1999; Xian-Song W. et. al., 2005); las células NK son capaces de reconocer antígenos definidos y también se ha descrito que las Células NK reconocen a las células tumorales por que éstas son capaces de no expresar el MHC (Montelli T. et.al., 2000). Pueden responder a distintos estímulos y pueden además expresar receptores de tipo activador como inhibidor (Steven G. E. et. al., 2003). La estructura de estos tipos de receptores es muy similar, sin embargo a nivel intracelular los componentes de cada uno pueden ser diferentes, por ejemplo: a través de aminoácidos, el receptor puede estar asociado a moléculas como ITAM (motivos de activación basados en tirosina). Cuando estos son activados se provoca la producción de IFN- $\gamma$ . Por el contrario receptores inhibitorios contienen estructuras ITIM que son de tipo inhibitorio. Algunos tipos de receptores son miembros de la familia de inmunoglobulinas; en humanos por ejemplo un importante receptor de este tipo es KIR (killer Ig-like receptor), cuyos genes están codificados en el cromosoma 6 en el sector conocido como Natural Killer Complex. (Mahajan S. et. al., 2003 ; Tliba O. et. al., 2002; Steven G. E. et. al., 2003; Sandor F. et. al., 2005).

La función primaria es de tipo efectora. Las células NK son capaces de producir y secretar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF y perforinas; activando así otras poblaciones celulares y distintas vías de respuesta frente a las células tumorales que presentan marcadores antes mencionados que las NK son capaces de reconocer; fenómeno que es apoyado por la funcionalidad de los "Lipid raft"; reconocidos lugares que son como el "puerto celular" en donde se desarrolla una "sinapsis" entre células NK y células blanco; en los "Lipid Raft" hay receptores específicos TCR; proteínas de anclaje estructurales, proteínas tirosina kinasas (PTKs), proteínas G; lo que permite realizar, por ejemplo un proceso de transducción de señales a través de fosfolipasa C; Zap70, entre otros intermediarios (Zhenkun L. et. al., 2000; Jordan S. et. al., 2000; Chace J.H., et. al., 1997). Se ha descrito que la activación de células NK está mediada también por citoquinas como IL-2, se ha propuesto también que células NK expresan al ser expuestas a agentes patógenos marcadores celulares de superficie asociados con la activación (receptores) y que desencadenan la producción de IFN- $\gamma$ ; también se sabe que hay células NK maduras e inmaduras que están en una subpoblación de células

que esperan ser activadas. Sin dejar de lado la importancia del IFN- $\gamma$  se debe decir que su producción permite la activación de otras poblaciones celulares que tendrán como objetivo destruir células patógenas, en este caso tumorales. Estas poblaciones pueden ser células como: macrófagos y neutrófilos, que pueden aparecer en pequeñas cantidades pero con notable actividad específica. (Steven G. E. et. al., 2003; Yun C. et. al., 2005; Junkera A. et. al., 2003 ; Garcia-Peñarrubia P. et. al., 1998; Jordan S. et. al., 2000).

## **2.- Hipótesis**

Los compuestos 4,4-Dimetil-5-8-dihidroinaftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) ejercen un efecto antitumoral (acción citotóxica) sobre las líneas celulares humanas: U937 (leucemia mieloide humana) y K562 (línea celular de eritroleucemia derivada de leucemia mieloide crónica) mediante alguno de los siguientes mecanismos: generando especies reactivas de oxígeno, alterando la cadena transportadora de electrones y/o inhibiendo además la expresión de la enzima Cox-2; sin afectar el potencial citotóxico propio del sistema inmune innato.

## **3.- Objetivos**

### **3.1.- Objetivo General:**

Analizar y evaluar el efecto citotóxico de los compuestos antineoplásicos 4,4-Dimetil-5-8-dihidroinaftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) sobre las líneas tumorales humanas U937 y K562.

### **3.2.- Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de los compuestos DHN y DHA, sobre la viabilidad celular de líneas tumorales (leucemia mieloide humana U937, eritroleucemia derivada de leucemia mieloide crónica K562) y de células normales PBMC (células mononucleares de sangre periférica).
2. Analizar el efecto citotóxico de la acción combinada de: Indometacina, Mulinano (M2), un diterpenoide derivados de *Azorella yareta* y un extracto de alcohólico de *Buddleja globosa*, (Matico); con los compuestos antineoplásicos DHN y DHA, sobre las líneas celulares U937 y K562.

3. Evaluar el efecto sobre la expresión de Ciclooxygenasa-2 (Cox-2), en células U937 previamente diferenciadas con TPA, por parte de los compuestos DHN y DHA.
4. Medir la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los compuestos DHN y DHA, sobre células K562 y células normales, mediante citometría de flujo utilizando Diclorofluorecina diacetato (CM-H<sub>2</sub>DCFDA).
5. Evaluar el efecto de DHN y DHA, sobre el potencial mitocondrial de células de eritroleucemia derivada de leucemia mieloide crónica K562, mediante citometría de flujo utilizando Rhodamina123.
6. Analizar el efecto de los compuestos DHN y DHA, sobre la actividad de células Natural Killer (NK), de sangre periférica de donantes normales.

## **4.- Materiales y Métodos**

### **4.1.- Reactivos**

Los compuestos: 4,4-Dimetil-5-8-dihidroinaftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA); fueron proporcionados por el Dr. Ramiro Araya, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Mulinano (M2), un diterpenoide derivados de *Azorella yareta* (Proporcionados por la Dra. Carla Delporte) y un extracto de alcohólico de *Buddleja globosa* (Matico), (Proporcionado por la Dra. María E. Letelier).

### **4.2.- Cultivo celular.**

Las líneas celulares (leucemia mieloide humana) U937, (eritroleucemia derivada de leucemia mieloide crónica) K562 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC); fueron cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 10% suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor; Glutamina 2 mM; penicilina-estreptomicina 50 U/mL, gentamicina 50 µg/mL; mantenidas a 37° C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **4.3.- Viabilidad celular.**

La viabilidad celular para las líneas celulares K562, U937 y PBMC fue medida mediante la exclusión del colorante azul de tripan, cuantificando las células viables utilizando placa de Neubauer. Los experimentos de viabilidad se llevaron a cabo sembrando  $8,0 \times 10^5$  células en placas de 24 pocillos de fondo plano, utilizando los compuestos 4,4-Dimetil-5-8-dihidroinaftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) en concentraciones: 0,1; 1; 10; 50 y 100 µM, preparadas a partir de una solución stock de 100 mM. La viabilidad celular se evaluó a las 48 y 72 horas.

#### **4.4.- Efecto Combinado de los compuestos DHN y DHA más antiinflamatorios sobre viabilidad de células U937 y K562.**

Para ver el efecto combinado antiinflamatorio-antineoplásico, evaluamos la viabilidad celular usando la línea celular U937, mediante el método de exclusión del colorante azul de tripan, cuantificando las células viables utilizando placa de Newbauer. Se sembraron  $8,0 \times 10^5$  células en placas de 24 pocillos de fondo plano, utilizando los compuestos 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxi-naftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) a concentraciones cercanas al  $IC_{50}$  obtenido a 72 horas, en presencia o ausencia de un antiinflamatorio conocido como la Indometacina ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) (Eli Y. et. al., 2001; Li D. et. al., 2005; Forslund C. et. al., 2003), un compuesto diterpenoide derivados de *Azorella yareta*, denominado M2 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ); al cual en estudios preliminares se le ha observado efecto inhibitorio sobre la expresión de Cox-2 a esta concentración y un extracto de alcohólico de *Buddleja globosa* (Matico), (en dilución  $1 \times 10^{-6}$ ) también descrito previamente con un efecto antiinflamatorio a esa concentración. La viabilidad celular se evaluó a las 48 y 72 horas.

#### **4.5.- Expresión de Ciclooxygenasa-2 (COX-2).**

Para estudiar el efecto sobre la expresión de la enzima Ciclooxygenasa-2 (Cox-2) se utilizó la línea celular U937 diferenciadas a macrófago. Para ello  $2,5 \times 10^6$  células por placa, se cultivan por 3 días con TPA en una concentración de 10 nM, luego se cambió el medio dejando las placas por 24 horas sin TPA. Posteriormente las células U937 diferenciadas fueron estimuladas con LPS (100nM) y colocadas en presencia de los compuestos 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxi-naftaleno-1-ona (DHN) o 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) por 24 horas a concentraciones de: 0,1; 1 y 10  $\mu\text{M}$ . Pasadas 24 horas, las células se lavan 3 veces con PBS frío. Luego las células se resuspenden en 1 mL de PBS frío más una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF, OVA). En seguida se centrifuga a  $5000 \times g$  por 1 minuto, se extrae el sobrenadante y al precipitado se agrega 100  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis RIPA, con inhibidores de proteasas (PMSF, OVA). La lisis de las células se hizo por sonicación y posteriormente la cuantificación de proteínas se hizo utilizando el método de Bradford

(Bradford MM., 1976). Finalmente las muestras fueron diluidas en buffer de carga 2X, en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente las muestras, fueron analizadas mediante electroforesis en condiciones desnaturalantes (SDS – PAGE) con un gel separador al 10 % y uno concentrador al 4%, preparados con acrilamida al 40 % (proporción 29:1 de acrilamida – bisacrilamida). La electroforesis se realizó a 60 voltios constante. Una vez separadas las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa por una hora quince minutos a 110 voltios constante. La membrana de nitrocelulosa se tiñó con rojo Ponceau al 5% para determinar la eficiencia de la transferencia de proteínas. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con leche al 5% por 30 minutos. Una vez bloqueada la nitrocelulosa fue lavada con PBS para luego dejar incubando la membrana con anticuerpo anti Cox-2 a una dilución 1:200 y para  $\beta$ -actina a 1:5000 toda la noche a 4° C, en cámara fría. Una vez terminado el tiempo de incubación las membranas son lavadas con PBS en presencia de Tween, PBS-T 0,05% para Cox-2 y PBS-T 0,1% para Actina. Una vez hecho los lavados se incubaba con el segundo anticuerpo anti Cox-2, Anti-Mouse una dilución 1:2500 y Anti-Rabbit para  $\beta$ -actina a 1:3000 durante 1 hora. Luego de lavar la nitrocelulosa se cuantifican las proteínas mediante quimioluminiscencia por cinco minutos y se expuso a una película fotográfica (Kodak). La intensidad de la señal capturada se midió densitométricamente con el programa USI y la cantidad de Cox-2 se expresó de manera relativa a la intensidad de  $\beta$ -actina para cada muestra.

#### **4.6.- Determinación del Potencial Mitocondrial.**

El efecto de los compuestos 4,4-Dimetil-5-8-dihidroinaftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) sobre el potencial de membrana mitocondrial fue medido utilizando Rodamina123. La incorporación de la sonda depende principalmente de dos características: su carácter catiónico y lipofílico, que permite a la Rodamina123 situarse en la mitocondria debido a su potencial de membrana (debido a su carga). El potencial interno de la mitocondria es 2 a 3 veces más elevado que el de la membrana plasmática, por lo que la acumulación de la sonda (Rodamina123) es mayoritariamente mitocondrial. La sonda se fija también en una menor medida en función de su solubilidad en la membrana interna de la mitocondria y

en la matriz. Esta fijación de potencial dependiente se acompaña de un quenching de fluorescencia y de un ligero desplazamiento de los espectros de excitación y emisión, se aprovecha este fenómeno para efectuar medidas cuantitativas del potencial de membrana. La Rodamina123 posee la propiedad de suprimir la respiración mitocondrial por inhibición del complejo V o ATPasa. (Juan G. et. al., 1994; Ferlini C. et. al., 1995; Shapiro Hm. et.al., 1995; Modica J. et.al., 2002; Falchi A. et. al., 2005; Scaduto R. et. al., 1999). Células K562 desde una placa de cultivo petri (70% confluencia) fueron resuspendidas en HEPES y luego marcadas con rodamina123 por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente estas células fueron lavadas y luego incubadas con concentraciones 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 y 10  $\mu\text{M}$  de DHN o de DHA durante 2 horas cuantificando los cambios de fluorescencia utilizando un Citómetro de Flujo (Becton - Dickinson). Los resultados es decir la disminución del potencial mitocondrial que se traduce con la disminución de fluorescencia fue comparada, analizados y graficados porcentualmente en función de Azida de Sodio ( $\text{NaN}_3$ ) un inhibidor del complejo IV de la cadena respiratoria de la membrana mitocondrial que afecta el transporte de protones a través de la membrana, a una concentración de 10 mM. El mismo ensayo se realizó en Células Mononucleares de Sangre periférica (PBMC) realizado como control de células normales.

#### **4.7.- Generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).**

La generación de ROS inducida por los compuestos 4,4-Dimetil-5,8-dihidroxi-naftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) fue medida por citometría de flujo, utilizando Diclorofluorecina diacetato ( $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$ ), este marcador ingresa a la célula, donde es catalizado por la acción de una enzima Esterasa, convirtiéndose en Diclorofluoresceina que se mantiene localizada en el espacio intracelular donde al interactuar con una especie reactiva de oxígeno se modifica generando fluorescencia; la cual es detectada y cuantificada mediante citometría de flujo. Un número de células (70% confluencia) K562 fueron marcadas con  $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$  por 30 minutos, lavadas con medio HEPES. Luego fueron incubadas durante 4 horas con los compuestos a concentraciones de: 1; 10; 25  $\mu\text{M}$ . Posteriormente se cuantificó la generación de ROS mediante la generación de

fluorescencia, expresando los datos en función de la fluorescencia emitida por el control (situación normal) asignándole un valor unitario; se efectuó además un control positivo para comprobar la generación de ROS por parte de las células por acción de  $H_2O_2$  y poder tener así una referencia en el citómetro y poder observar diferencias. Este ensayo también se hizo en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), como control de respuesta a estos compuestos por parte de células normales.

#### **4.8.- Ensayos de citotoxicidad NK**

##### **4.8.1.- Obtención y tratamiento previo de células Mononucleares.**

Para realizar este ensayo primero fue necesario aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante la siguiente metodología. 15 mL de sangre se depositan lentamente sobre 7 mL de Ficoll-Histopaque y se centrifuga por 30 minutos a 1500 rpm. Luego, se extrae la interfase correspondiente a las células mononucleares y se diluyen en PBS estéril. Luego se lava tres veces centrifugando por 5 minutos a 1500 rpm. Las células son mantenidas en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SBF). Posteriormente  $1 \times 10^7$  PBMC se siembran en placas de 24 pocillos en presencia del compuesto 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxinaftaleno-1-ona (DHN) o 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) en concentraciones de 0,1 y 1  $\mu$ M, diluidas a partir de una solución stock de 10 mM. Luego de 24 horas en cultivo se evalúa la citotoxicidad mediada por células NK.

##### **4.8.2.- Ensayo de Citotoxicidad.**

Este ensayo cuantifica la cantidad de  $^{51}Cr$  liberado desde una célula blanco (K562) por contacto directo con una célula efectora (NK). Por lo tanto, previo al ensayo, se procedió a marcar células K562, incubándolas con medio RPMI-1640 suplementado con Suero bovino fetal (SBF) al 10%, en presencia de  $Na_2^{51}CrO_4$  (100  $\mu$ C/mL) durante 1 h. a 37° C. Las células marcadas fueron lavadas tres veces en PBS, y resuspendidas en medio RPMI-1640/10% SBF. El ensayo de citotoxicidad se inició incubando 5000 células marcadas en placa de 96 pocillos y sobre ellas se adicionan

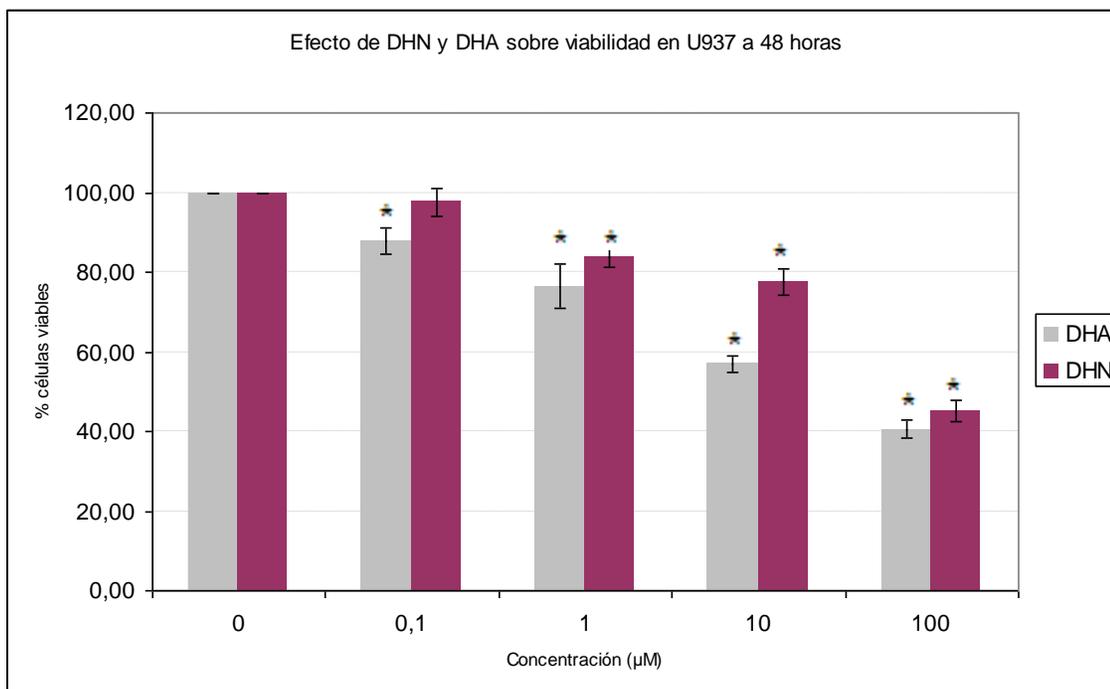
PBMC manteniendo las siguientes relación efector:blanco 30:1 y 50:1, durante 4 horas a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente la placa de cultivo se centrifuga a 1500 rpm por 10 minutos, luego se toma una alícuota de 100 µL del sobrenadante y se mide el <sup>51</sup>Cromo liberado utilizando un contador γ-Packard. Para la cuantificación de la citólisis se determinó la lisis total (cpm<sub>t</sub>) que corresponde a las cpm liberadas al agregar 100 µL de Tritón-X100 al 10% sobre 100 µL de células K562 y la lisis espontánea (cpm<sub>e</sub>) que corresponde a las cpm liberadas por las células K562 durante el ensayo en presencia de 100 µL de medio de cultivo. La actividad citotóxica se expresó como el % de lisis específica de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lisis Específica} = (\text{cpm}_x - \text{cpm}_e / \text{cpm}_t - \text{cpm}_e) \times 100$$

## 5.- Resultados

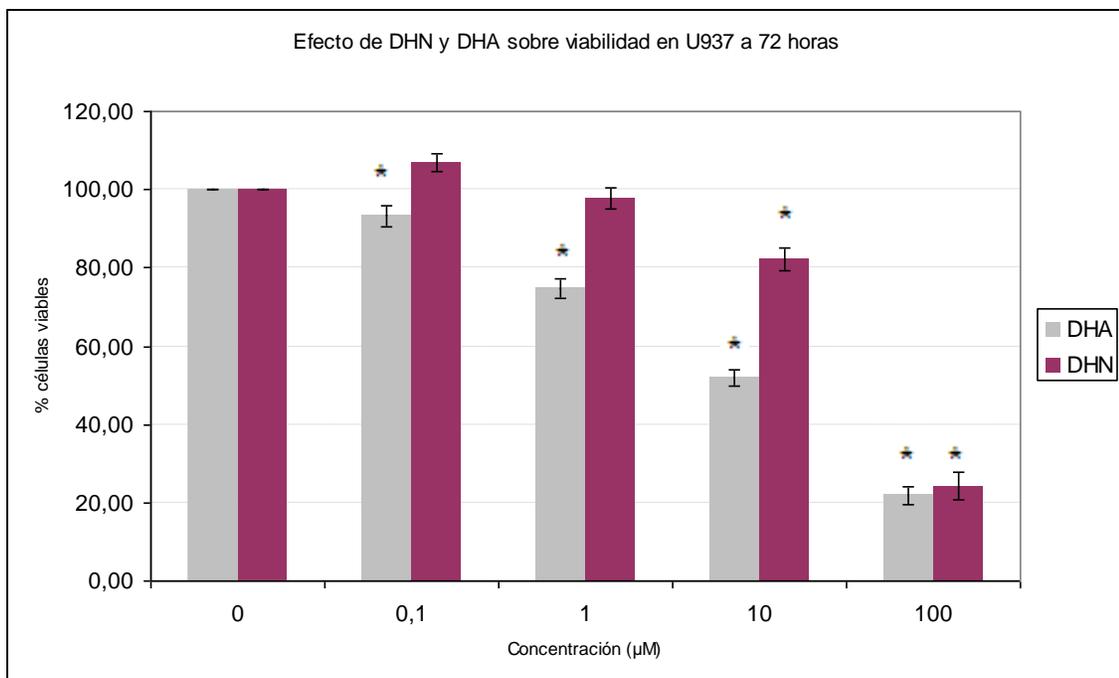
### 5.1.- Efecto de DHN y DHA sobre la viabilidad de las líneas celulares U937 y K562.

Para evaluar el efecto de 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxinaftaleno-1-ona (DHN) y 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA) sobre la viabilidad de células tumorales, abordamos el estudio *in vitro* de estos dos compuestos sobre las líneas celulares U937 y K562. Las células viables fueron cuantificadas mediante el método de exclusión del colorante azul de tripan. En la Fig. 1 se observa que ambos compuestos inducen una disminución de las células viables en la línea celular U937 a las 48 horas de cultivo. Este efecto resultó ser dependiente de la concentración de los compuestos, observándose claramente un mayor efecto por acción de DHA, donde el  $IC_{50}$  fue de 5,14  $\mu$ M en comparación con el  $IC_{50}$  de DHN que fue de 28,20  $\mu$ M, este efecto en la viabilidad de la línea celular U937 es dosis-dependiente.



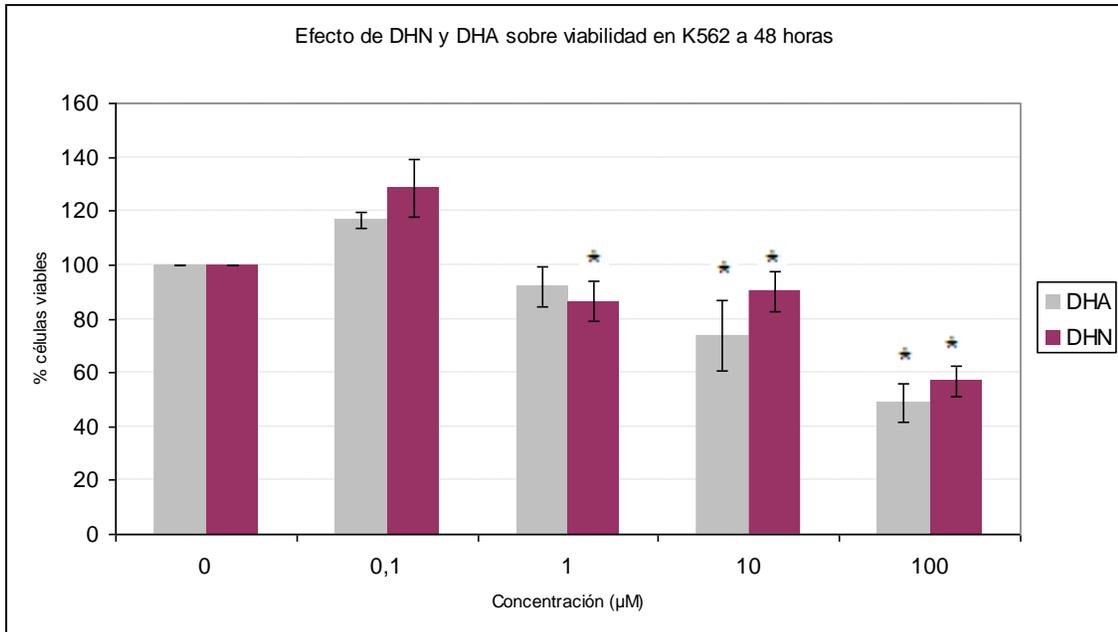
**Fig. 1: Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad celular de U937 a 48 horas.** Los datos presentados corresponden a porcentajes de células viables U937 (%  $\pm$  error SD) respecto al control en función de la concentración del compuesto DHN y DHA a 48 horas. Los resultados graficados corresponden al promedio de 5 experimentos independientes, (\*  $p \leq 0,05$ ; calculado respecto al control).

El efecto de ambos compuestos sobre la viabilidad de las células U937 también es dependiente del tiempo. De hecho, a las 72 horas de cultivo se aprecia una mayor disminución de las células viables particularmente a altas concentraciones de ambos compuestos (Fig. 2). En estas condiciones DHA exhibe un  $IC_{50}$  de 7,96  $\mu M$  en comparación al valor obtenido con DHN que es de  $IC_{50}$  40,39  $\mu M$ .

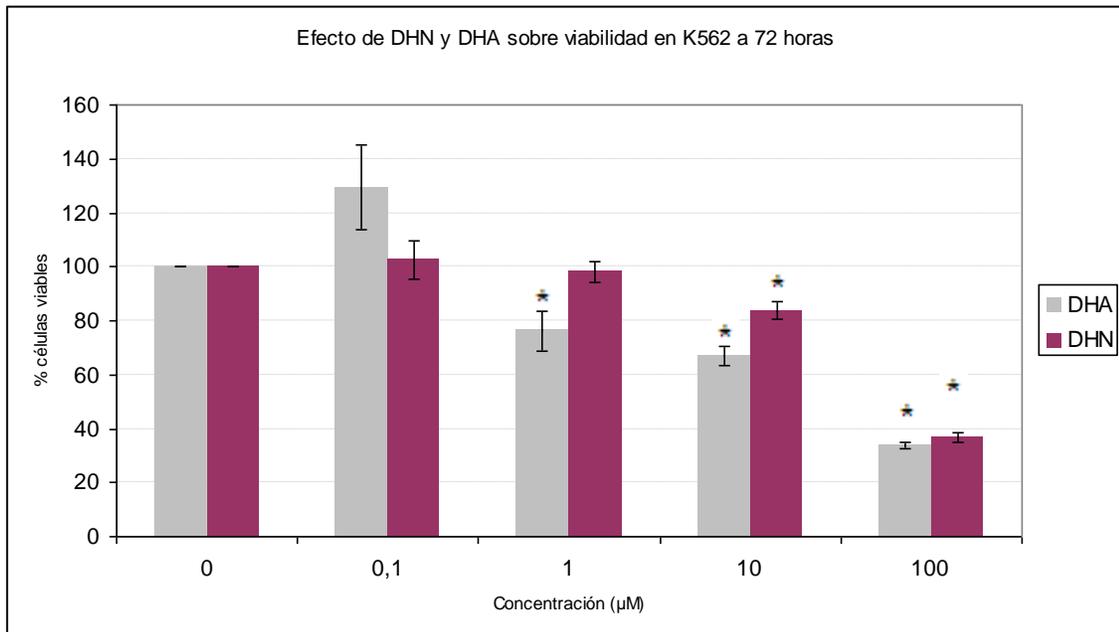


**Fig. 2: Efecto de DHN y DHA sobre la viabilidad celular de U937 a 72 horas.** Los datos presentados son porcentajes de células viables U937 ( $\% \pm$  error SD) respecto al control en función de la concentración del compuesto DHN y DHA a 72 horas. Los resultados graficados corresponden al promedio de 5 experimentos independientes, (\*  $p \leq 0,05$ ; calculado respecto al control).

Posteriormente se estudió el efecto sobre la viabilidad de la línea celular tumoral de origen hematopoyetico K562. Podemos observar un efecto análogo al observado en la línea celular U937. Sin embargo los valores de  $IC_{50}$  calculados a las 48 horas son de 0,51  $\mu M$  para DHN, mientras que para DHA 1,92  $\mu M$ . A las 72 horas los valores de  $IC_{50}$  son de 32,10  $\mu M$  para DHN y 0,68  $\mu M$  para DHA, demostrando también un efecto dependiente de la concentración y del tiempo. (Fig. 3 y 4)



**Fig. 3: Efecto DHN y DHA sobre viabilidad en K562 a 48 horas.** Los datos presentados son porcentajes de células viables K562 (% ± error SD) respecto al control en función de la concentración del compuesto DHN y DHA a 48 horas. Los resultados graficados corresponden al promedio de 5 experimentos independientes, (\*  $p \leq 0,05$ ; calculado respecto al control).



**Fig. 4: Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad en K562 a 72 horas.** Los datos presentados son porcentajes de células viables K562 (% ± error SD) respecto al control en función de la concentración del compuesto DHN y DHA a 72 horas. Los resultados graficados corresponden al promedio de 5 experimentos independientes, (\* p ≤ 0,05; calculado respecto al control).

El siguiente cuadro resume los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para las líneas celulares U937 y K562 obtenidos a 48 y 72 horas de incubación con los compuestos DHN y DHA.

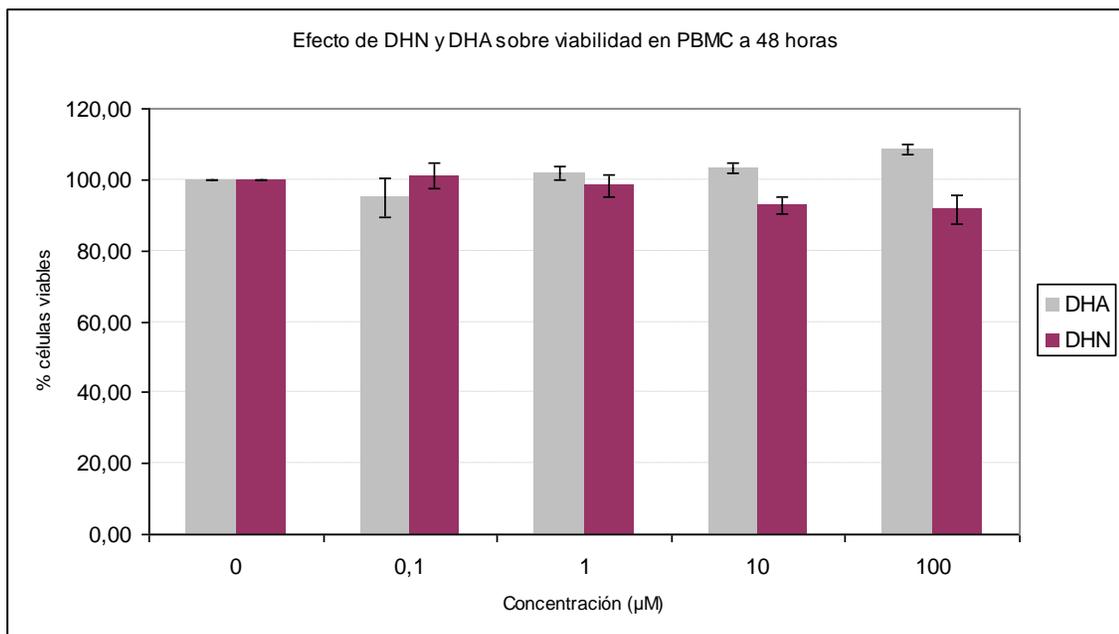
**Tabla 1: Resumen de valores de IC<sub>50</sub> obtenidos por tipo de línea celular tumoral.**

Línea celular	Compuesto	IC <sub>50</sub> (µM) 48 hrs	IC <sub>50</sub> (µM) 72 hrs
<b>U937</b>	DHN	28,20	40,39
	DHA	5,14	7,96
<b>K562</b>	DHN	0,51	32,10
	DHA	1,92	0,68

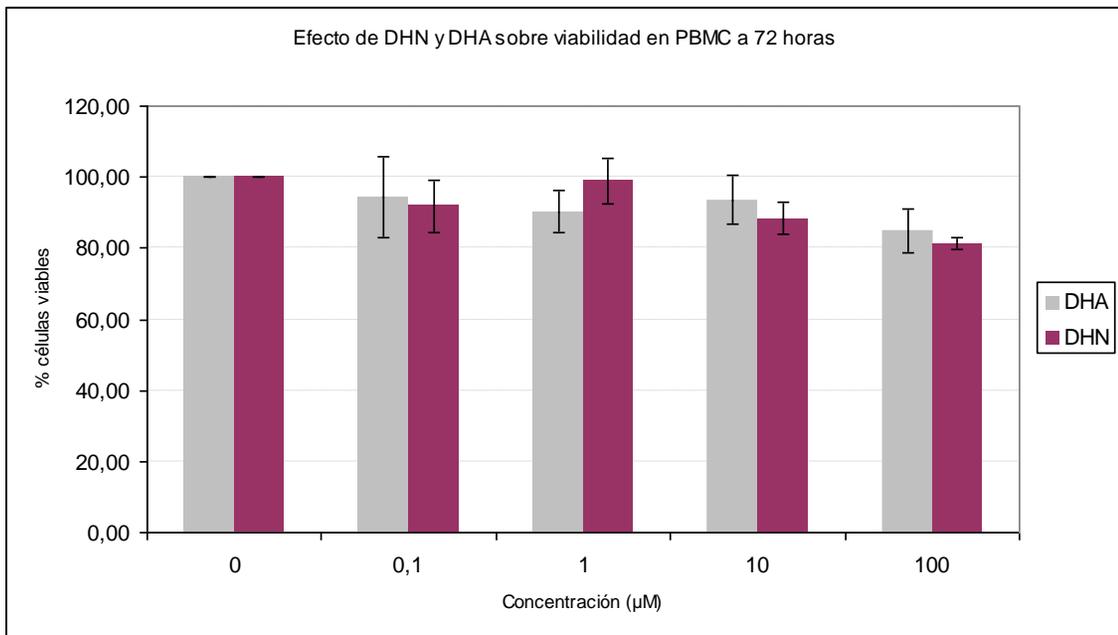
Los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos representan la concentración a la que se alcanza el 50% del efecto inhibitorio máximo obtenido a 100µM.

## 5.2.- Ensayos de Viabilidad sobre células mononucleares de sangre periférica. (PBMC)

Para poder mostrar la especificidad de los compuestos sobre células tumorales y no sobre células normales, se evaluó el efecto de DHN y DHA sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica de donantes normales. Los resultados muestran que ambos compuestos actúan principalmente sobre células tumorales ya que la viabilidad de las células mononucleares no cambia significativamente a 48 (Fig. 5). A las 72 horas (Fig. 6) solo se puede observar un mínimo efecto sobre la viabilidad celular, más de un 80% de las células mononucleares se mantienen viables luego de 72 horas con ambos compuestos. En cambio en las mismas condiciones, a medida que aumenta la concentración de compuestos, se observa un descenso en el porcentaje de células U937 y K562 viables, lo que nos dice que las células tumorales son más sensibles a estos compuestos.



**Fig. 5: Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad en PBMC a 48 horas.** Los datos presentados son porcentajes de células viables PBMC (%  $\pm$  error SD) respecto al control en función de la concentración del compuesto DHN y DHA a 48 horas. Los resultados graficados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

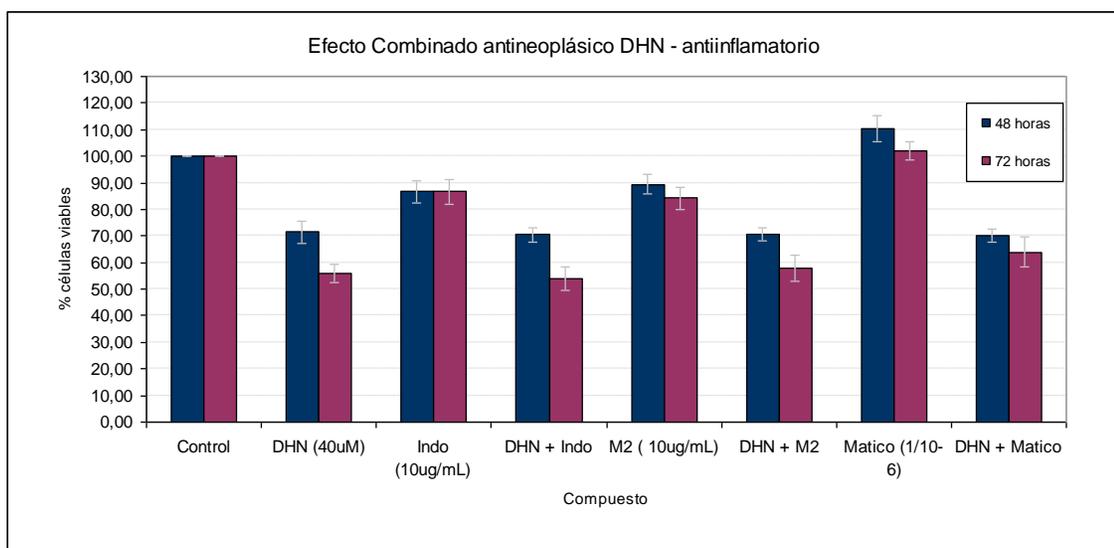


**Fig. 6: Efecto de DHN y DHA sobre viabilidad en PBMC a 72 horas.** Los datos presentados son porcentajes de células viables PBMC (%  $\pm$  error SD) respecto al control en función de la concentración del compuesto DHN y DHA a 72 horas. Los resultados graficados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

### 5.3.- Efecto Combinado de los compuestos DHN y DHA más antiinflamatorios sobre viabilidad de células U937 y K562.

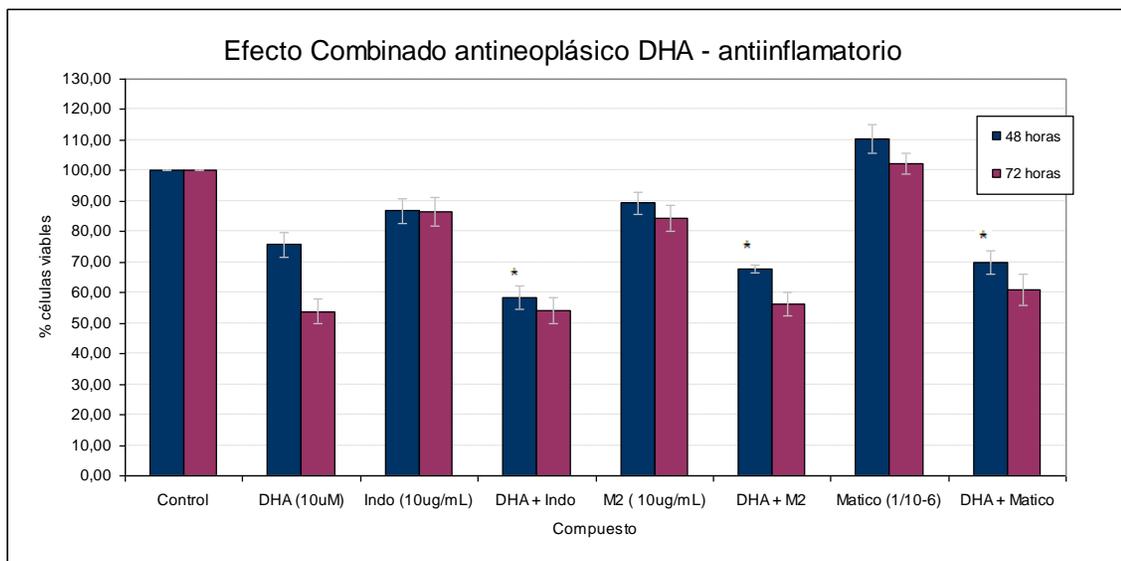
Dado que la expresión de algunos intermediarios proinflamatorios favorecen el crecimiento de células tumorales (Park C. et. al., 2000; Felty Q. et. al., 2005), se estudió el efecto de la acción combinada de los compuestos DHN y DHA con compuestos con actividad antiinflamatoria descrita previamente. Ambos compuestos fueron estudiados a concentraciones cercanas al IC<sub>50</sub> a las 72 horas de experimentos de viabilidad con U937 (10 µM para DHA y 40 µM para DHN). Los compuestos antiinflamatorios usados fueron: indometacina (10 µg/mL) (Eli Y. et. al., 2001); M2 (10 µg/mL) (Gutiérrez P., 2005) y por último extracto de Matico en concentración 1x10<sup>-6</sup>.

En la Fig. 7 se puede observar que a 48 y a 72 horas no hubo inhibición de forma significativa de la viabilidad celular por parte de DHN en combinación con indometacina, M2 y Matico sobre las células tumorales. DHN, indometacina y M2 son capaces de inhibir por si solos la viabilidad celular.



**Fig. 7: Efecto combinado de DHN con indometacina, M2 y Matico a 48 y 72 horas.** Los valores corresponden a porcentajes de viabilidad obtenidos frente a la concentración de cada compuesto (% ± error SD), utilizando a DHN (40 µM) valor cercano al IC<sub>50</sub> a 72 horas previamente obtenido experimentalmente. Los resultados graficados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes.

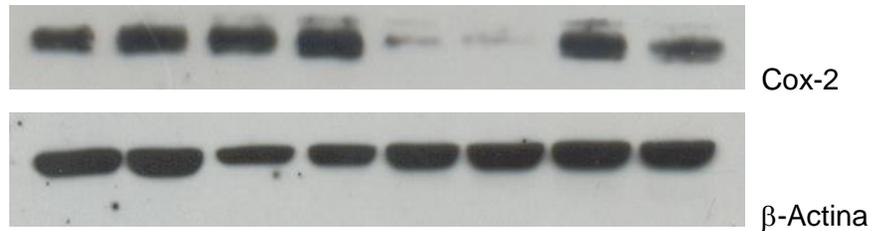
Cuando observamos la combinación (Fig. 8) de DHA con indometacina, M2 y Matico vemos que el efecto inhibitorio es potenciado, este efecto sólo se ve a 48 horas; ya que a 72 horas el efecto combinado no es significativo sobre la viabilidad celular. Según lo observado indometacina y M2 por si solos son capaces de inhibir la viabilidad. Por el contrario se observa que matico podría tener un efecto protector.



**Fig. 8: Efecto combinado de DHA con indometacina, M2 y Matico, a 72 horas.** Los valores corresponden a porcentajes de viabilidad celular frente a la concentración de cada compuesto (% ± error SD), utilizando a DHA (10 µM) valor cercano al IC<sub>50</sub> a 72 horas previamente obtenido experimentalmente. Los resultados graficados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. (\* p ≤ 0,05; diferencia significativa calculada a partir de efecto combinado respecto a la acción de DHA solo).

#### 5.4.- Expresión de Ciclooxygenasa-2.

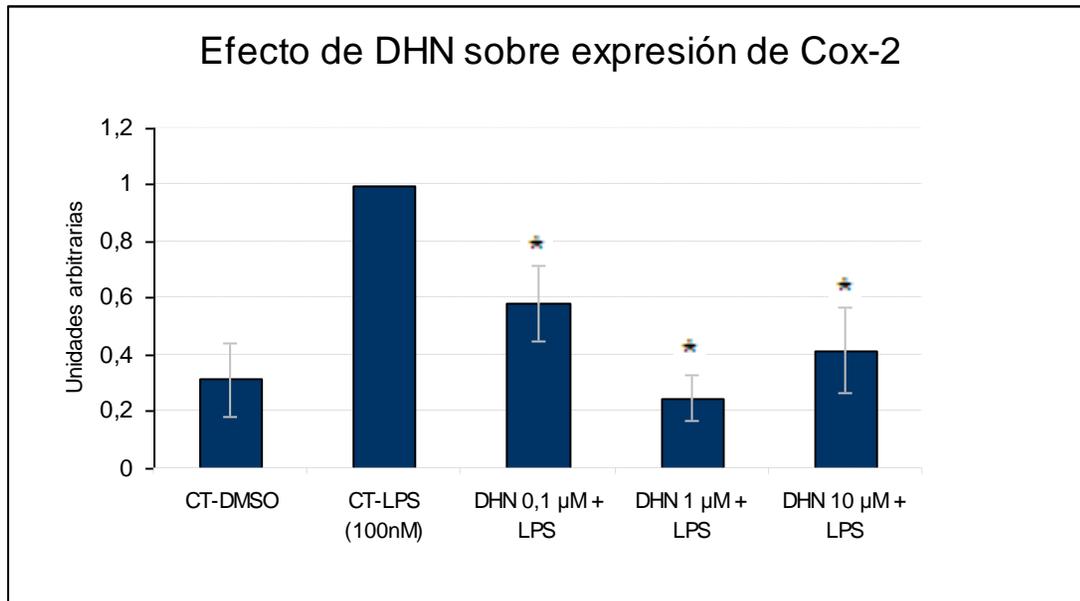
Se sabe que señales proinflamatorias favorecen el proceso carcinogénico. De hecho la expresión de la enzima (Cox-2) está aumentada en algunos tipos de tumores (Jung Y. et. al., 2003; Barrios M., Chadee K. et. al., 1998; Berg D. et. al., 2002). Por este motivo estudiamos el efecto de DHN y DHA sobre la respuesta inflamatoria. Evaluamos el efecto de ambos compuestos sobre la expresión de Cox-2 a concentraciones 0,1; 1 y 10  $\mu\text{M}$  en células U937, previamente diferenciadas con TPA y estimuladas con LPS (100nM).



Compuesto	DHN	DHN	DHN	LPS	DMSO	DHA	DHA	DHA
Concentración ( $\mu\text{M}$ )	0,1	1	10			10	1	0,1

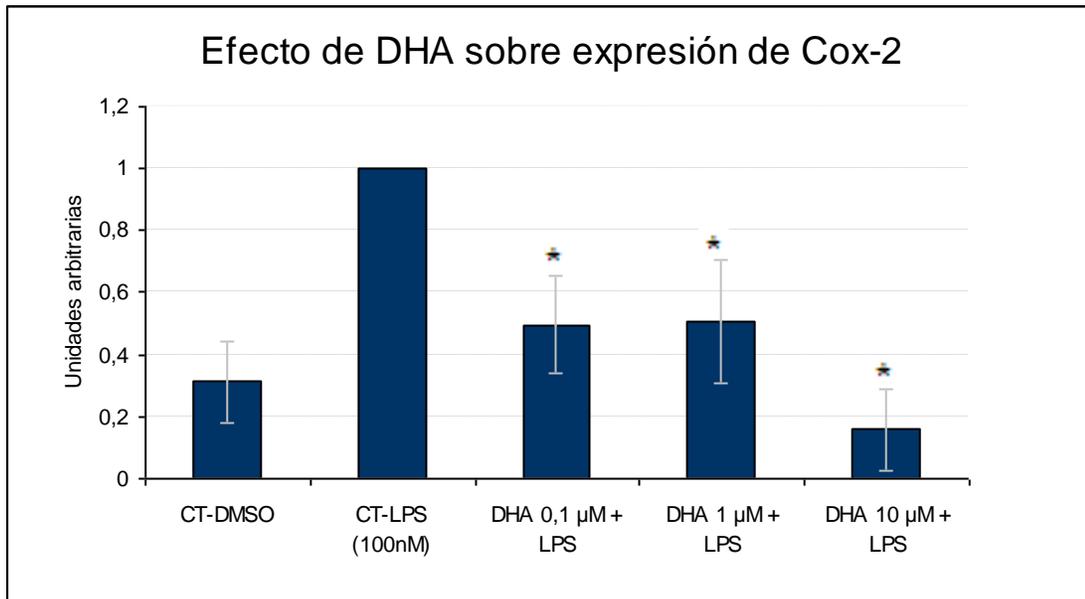
**Figura 9 y tabla 2:** En la Fig. 9 se observa un ejemplo de los films obtenidos luego del revelado de la nitrocelulosa. La tabla 1 muestra las concentraciones utilizadas para ambos compuestos y como fueron distribuidas las muestras en la electroforesis (según imagen superior).

La Fig. 9 muestra inmunowesterblot de Cox-2 de un experimento representativo, observamos la inducción de LPS para todas las muestras a excepción del control sin inducción (control DMSO, control en que están diluidos los compuestos), y el efecto que tienen las distintas concentraciones de DHN y DHA. Al observar la Fig. 10 vemos que el efecto que tiene DHN sobre la expresión de Cox- 2 es una inhibición de la expresión que no es dependiente de la concentración, por lo menos en el rango estudiado en este experimento, sin embargo las diferencias respecto al control de LPS son significativas. Datos obtenidos del promedio de 5 experimentos independientes.



**Fig. 10: Efecto de DHN sobre la expresión de Ciclooxygenasa-2.** La gráfica representa la relación Cox-2/ $\beta$ -actina establecida por el análisis densitométrico realizado con el programa USI para las bandas de Cox-2 y  $\beta$ -actina para el compuesto DHN (Unidades arbitrarias  $\pm$  error SD). Resultados corresponden al promedio de 5 experimentos independientes (\*  $p \leq 0,05$  respecto al control LPS).

Por otro lado, en las mismas condiciones observamos que DHA inhibe la expresión de Cox-2 inducida por LPS en las células U937 diferenciadas (Fig. 11). Esta inhibición es significativa y el mayor efecto se observa a la concentración de 10  $\mu$ M de DHA ( $p = 0,001$ ).



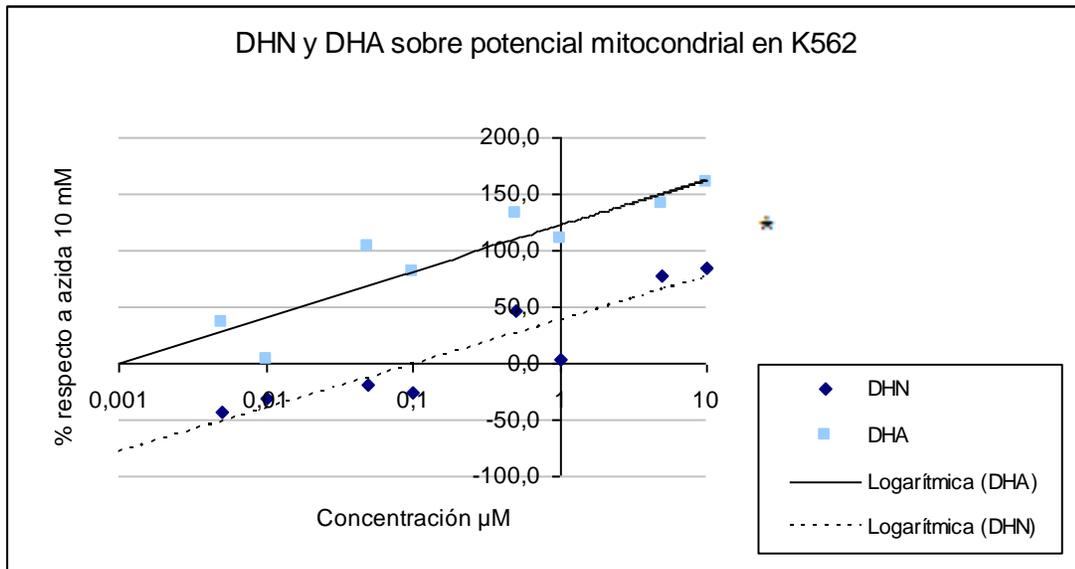
**Fig. 11: Efecto de DHA sobre la expresión de Ciclooxygenasa-2.** Esta grafica representa la relación Cox-2/ $\beta$ -actina establecida por el análisis densitométrico realizado con el programa USI para las bandas de Cox-2 y  $\beta$ -actina, para el compuesto DHA (Unidades arbitrarias  $\pm$  error SD). Resultados corresponden al promedio de 5 experimentos independientes (\*  $p \leq 0,05$  respecto al control LPS).

### **5.5.- Determinación del Potencial Mitocondrial.**

Antecedentes sugieren que el efecto antitumoral de este tipo de compuestos podría estar relacionado a la función mitocondrial, inhibiendo la cadena transportadora de electrones y/o provocando apoptosis. (Araya R. et. Al., Delgado T. et. al., 2002; Krysko D. et. al., 2001; Falchi A. et. al., 2005; Kiritoshi S. et. al., 2003)

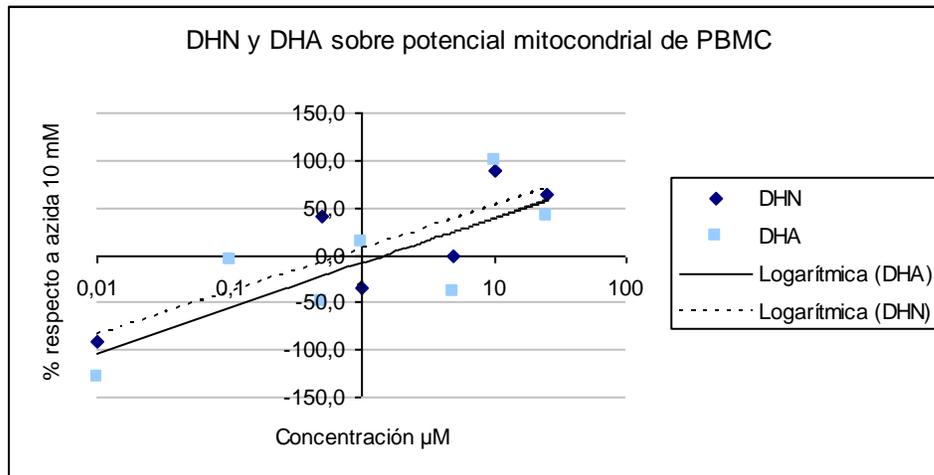
Por esta razón se decidió evaluar el efecto de DHN y DHA sobre el potencial de membrana mitocondrial de células K562 de acuerdo a materiales y métodos. Los cambios en la fluorescencia representan cambios en el potencial mitocondrial y estos fueron cuantificados mediante citometría de flujo. Las siguientes gráficas representan los resultados de 3 experimentos independientes en que se mide el potencial de membrana Mitocondrial, representado en función de Azida de Sodio; donde la curva resultante fue colocada de forma lineal (logaritmo) para poder observar aun mejor las diferencias.

En la Fig. 12 observamos el efecto despolarizante que ejercen los compuestos DHN y DHA sobre el potencial mitocondrial en células K562, respecto a la acción Azida de sodio (considerado como un 100% de despolarización del potencial de membrana mitocondrial). Podemos observar que el compuesto DHA produce una importante despolarización del potencial mitocondrial siendo aún mayor a los valores observados para Azida. Por otro lado el compuesto DHN también ejerce un efecto despolarizante. Sin embargo, en menor grado que el inducido por DHA, donde la diferencia entre ambos es significativa ( $p \leq 0,05$ ).



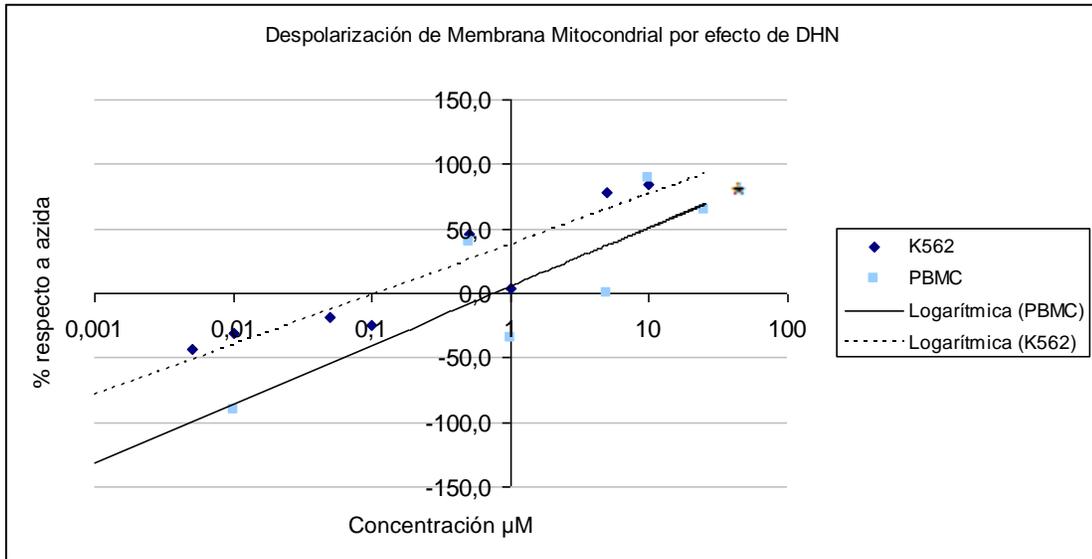
**Fig. 12: Efecto de DHN y DHA sobre potencial mitocondrial en K562.** La gráfica representa porcentajes relativos (eje Y) en función de un despolarizante o inhibidor de cadena transportadora de electrones conocido como es la Azida de Sodio, versus la concentración del Compuesto DHN y DHA (μM) (eje X), sobre células K562. Datos obtenidos de 3 experimentos independientes; (\*  $p \leq 0,05$ ; comparación hecha entre ambos compuestos).

Teniendo en cuenta este resultado fue interesante evaluar el efecto de ambos compuestos sobre el potencial mitocondrial de células normales, por lo cual se utilizaron células PBMC. En la Fig. 13 observamos que ambos no tienen diferencia entre si que sea significativa; sin embargo, ambos son capaces de despolarizar la membrana mitocondrial a valores altos de concentración, pero con un valor cercano al 50 % lo que permite resaltar la sensibilidad que poseen las células tumorales sobre las normales.

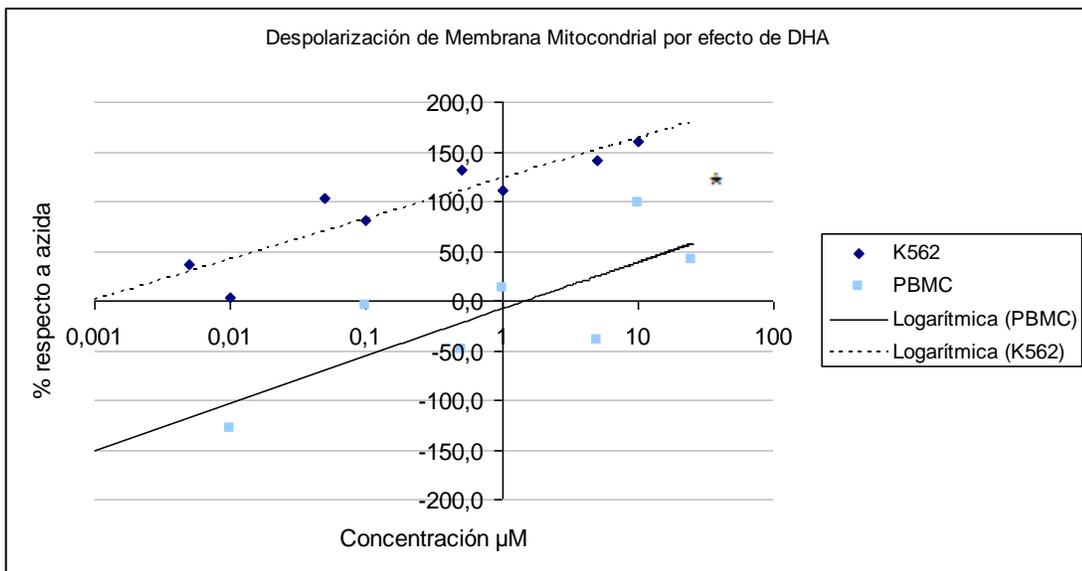


**Fig. 13: Efecto de DHN y DHA sobre potencial mitocondrial de PBMC.** La gráfica representa porcentajes relativos (eje Y) en función de un despolarizante o inhibidor de cadena transportadora de electrones conocido como es la Azida de Sodio, versus la concentración del Compuesto DHN y DHA ( $\mu\text{M}$ ) (eje X), sobre células PBMC. Datos obtenidos de 3 experimentos independientes.

A continuación se presentan dos gráficos comparativos de cada compuesto sobre células K562 y Células Mononucleares de sangre periférica (PBMC), (Fig. 14) para DHN y (Fig. 15) para DHA. Los gráficos muestran que comparando la modificación del potencial mitocondrial entre las células tumorales K562 con las células normales PBMC por acción de ambos compuestos, en la fig. 14 se observa que DHN tiene la capacidad de despolarizar células tumorales en mucho mayor grado que a células normales y esta diferencia es significativa al ser comparadas. En la fig.15 es posible apreciar que DHA tiene un efecto aún mayor de despolarización sobre células tumorales que sobre PBMC, incluso esta diferencia es mucho mayor a la que se ve por acción de DHN (Fig. 14). K562 muestra mayor sensibilidad frente a ambos compuestos en comparación a PBMC y que la sensibilidad por DHA es mucho mayor que la mostrada por acción de DHN,



**Fig. 14: Despolarización de Membrana mitocondrial por efecto de DHN.** La gráfica representa porcentajes relativos (eje Y) en función de un despolarizante o inhibidor de cadena transportadora de electrones conocido como es la Azida de Sodio, versus la concentración del Compuesto. DHN ( $\mu\text{M}$ ) (eje X), comparando células K562 y PBMC. (\*  $p \leq 0,05$ ; comparación hecha entre ambos tipos celulares frente a DHN)

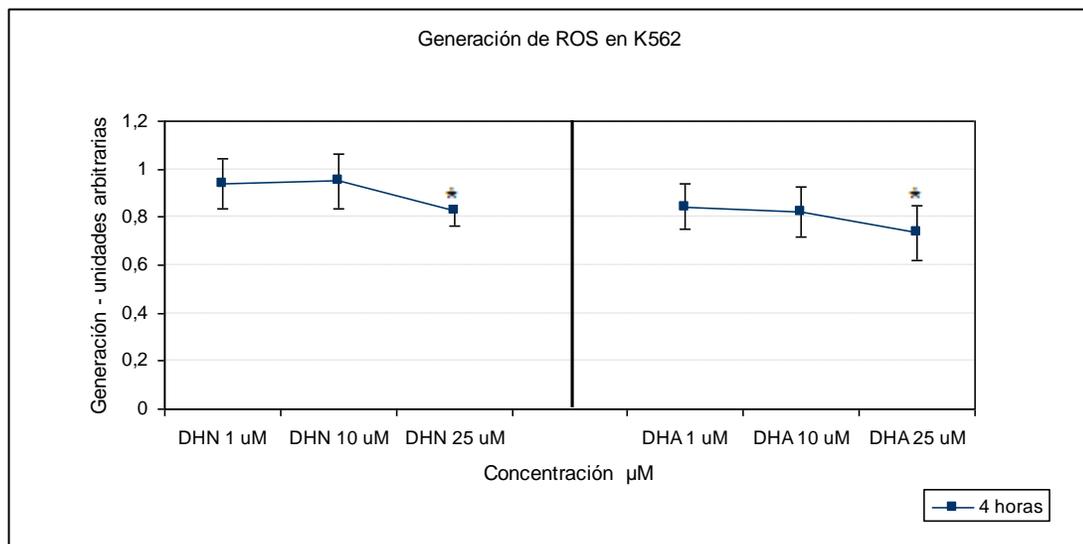


**Fig. 15: Despolarización de Membrana mitocondrial por efecto de DHA.** La gráfica está de acuerdo a porcentajes relativos (eje Y) en función de un despolarizante o inhibidor de cadena transportadora de electrones conocido como es la Azida de Sodio, versus la concentración del Compuesto DHA ( $\mu\text{M}$ ) (eje X),

comparando células K562 y PBMC. (\*  $p \leq 0,05$ ; comparación hecha entre ambos tipos celulares frente a DHA)

### 5.6.- Generación Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

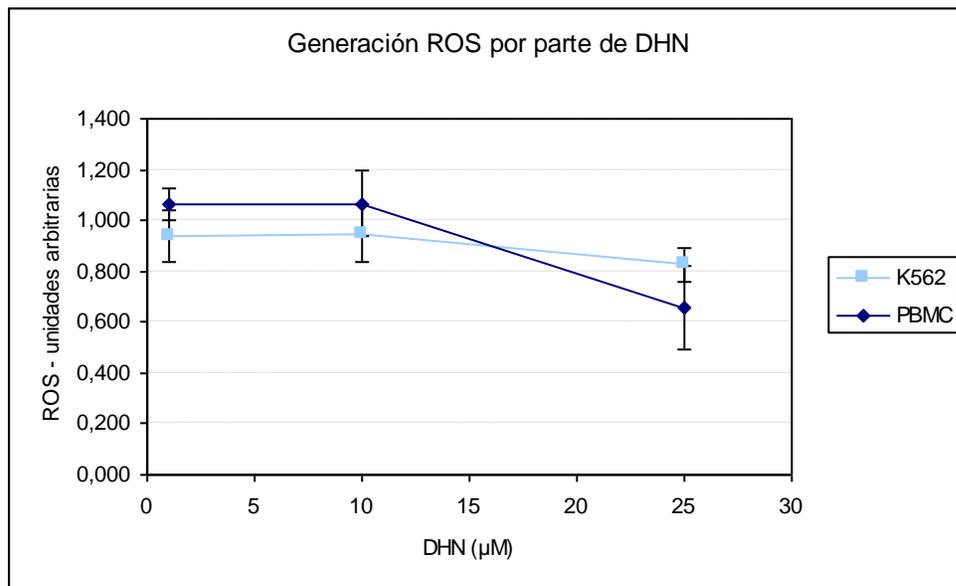
Otro mecanismo mediante el cual se puede provocar un efecto citotóxico en la célula lo constituye la generación de ROS. Por ello se decidió evaluar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por los compuestos DHN y DHA. Esta fue medida por citometria de flujo, utilizando Diclorofluorecina diacetato (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) como sonda. En la fig. 16 se puede ver que ambos compuestos a concentraciones 1, 10 y 25  $\mu\text{M}$ , no generaron durante el tiempo de incubación generación especies reactivas de oxígeno. Más aún tanto DHN como DHA mostraron una disminución en los niveles de ROS generados a la concentración de 25  $\mu\text{M}$ , donde la diferencia es significativa respecto del control (\*  $p \leq 0,05$ ). Esto nos permite concluir que ninguno de los dos compuestos generan especies reactivas de oxígeno y contrastando con esto, es probable que ambos compuestos puedan tener propiedades atrapadoras (antioxidantes) de ROS.



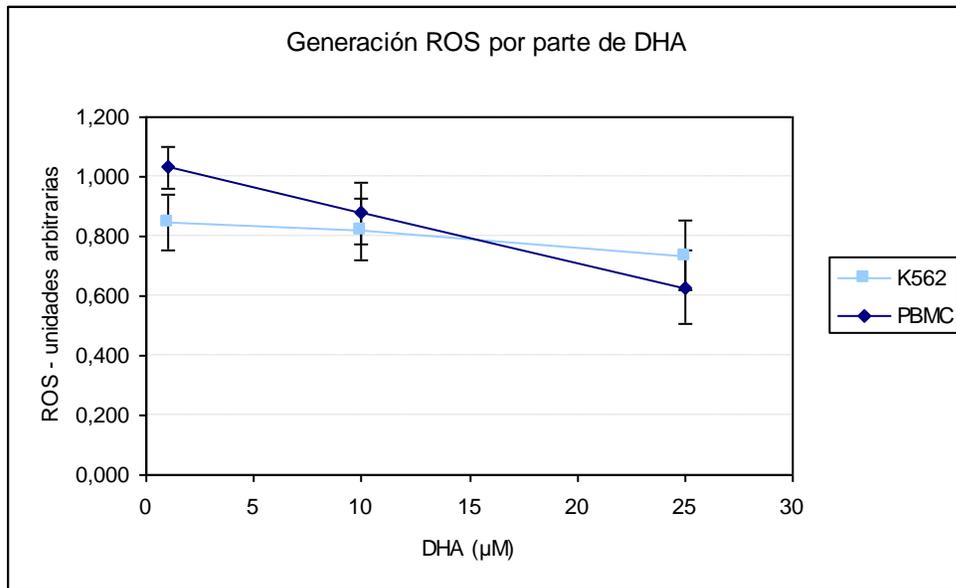
**Fig. 16: Generación de Especies Reactivas de Oxígeno en Células K562.** Los valores obtenidos están representados como el número de veces de generación de ROS respecto a un control normal de valor unitario, versus la concentración de cada compuesto, al cabo de 4 horas, (unidades arbitrarias  $\pm$  error SD).

Datos obtenidos del promedio de 3 experimentos independientes; (\*  $p \leq 0,05$ ; comparación hecha en base al control de valor unitario)

Cuando observamos comparativamente la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) entre células tumorales K562 y células normales PBMC por parte de DHN y DHA (Fig. 17 y 18), vemos que hay una tendencia a la disminución en la generación de ROS en especial a concentraciones altas del compuesto en ambos tipos de células.



**Fig. 17: Generación de Especies Reactivas de Oxígeno en Células K562 y PBMC por DHN.** Los valores obtenidos están representados como el número de veces de generación de ROS respecto a un control de valor unitario, versus la concentración del compuesto DHN; (unidades arbitrarias  $\pm$  error SD).

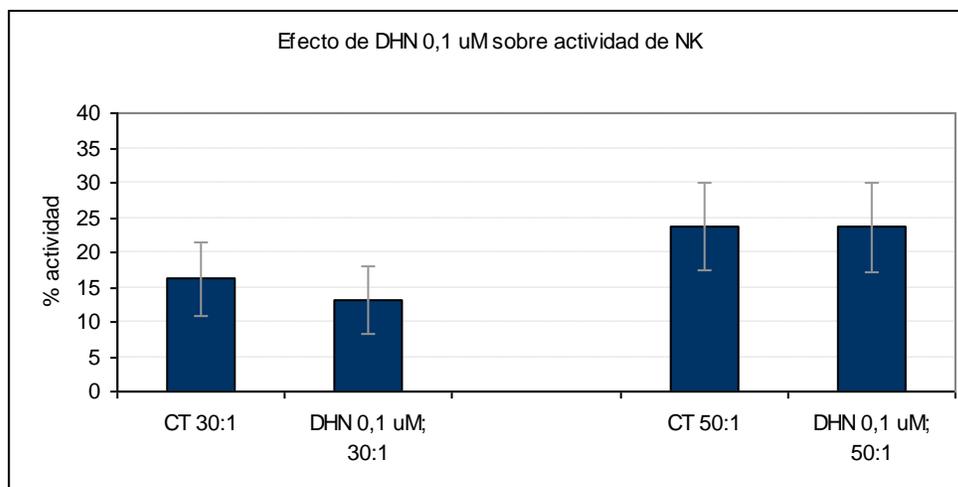


**Fig. 18: Generación de Especies Reactivas de Oxígeno en Células K562 y PBMC por DHA.** Los valores obtenidos están representados como el número de veces de generación de ROS respecto a un control de valor unitario, versus la concentración del compuesto DHA; (unidades arbitrarias  $\pm$  error SD).

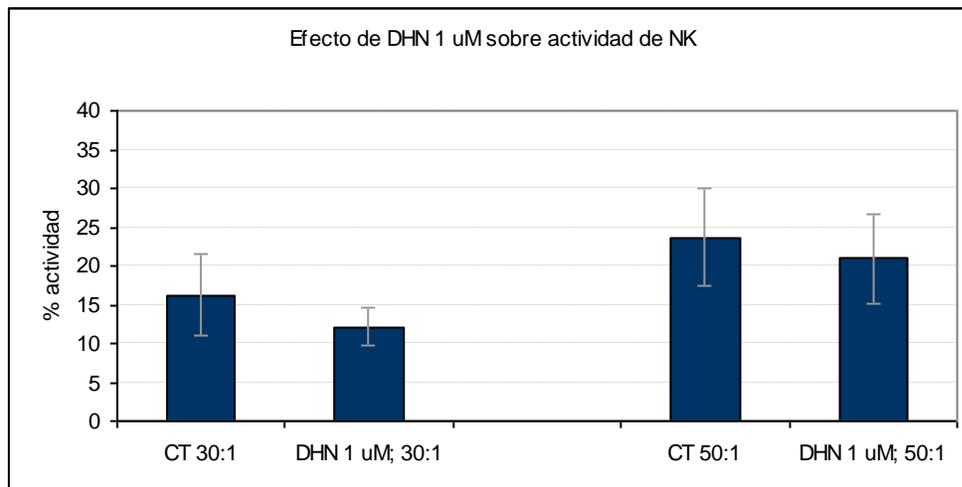
### 5.7.- Actividad Citotóxica de Células NK.

Un importante mecanismo de defensa antitumoral lo constituyen las células Natural Killer (NK). Las células NK corresponden a linfocitos granulares que ejercen una acción citotóxica sobre células tumorales que carecen de MHC-I. Cuando se buscan compuestos con eventual capacidad antitumoral resulta conveniente que esta acción no afecte de manera secundaria la función defensiva normal del organismo. Por ello, se quiso estudiar si los compuestos DHN y DHA afectaban la actividad citotóxica de las células NK. Para este efecto se utilizaron células K562 de acuerdo al método descrito en materiales y métodos. Evaluamos el efecto de DHN y DHA a concentraciones 0,1 y 1  $\mu\text{M}$  sobre la actividad citotóxica mediada por células NK extraída de sangre periférica de 6 donantes sanos. En el ensayo se mide la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  desde células blanco K562 mediante un contador gama, graficando valores porcentuales (% Lisis Específica) calculados a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lisis Específica} = (\text{cpm}_x - \text{cpm}_e / \text{cpm}_t - \text{cpm}_e) \times 100$$

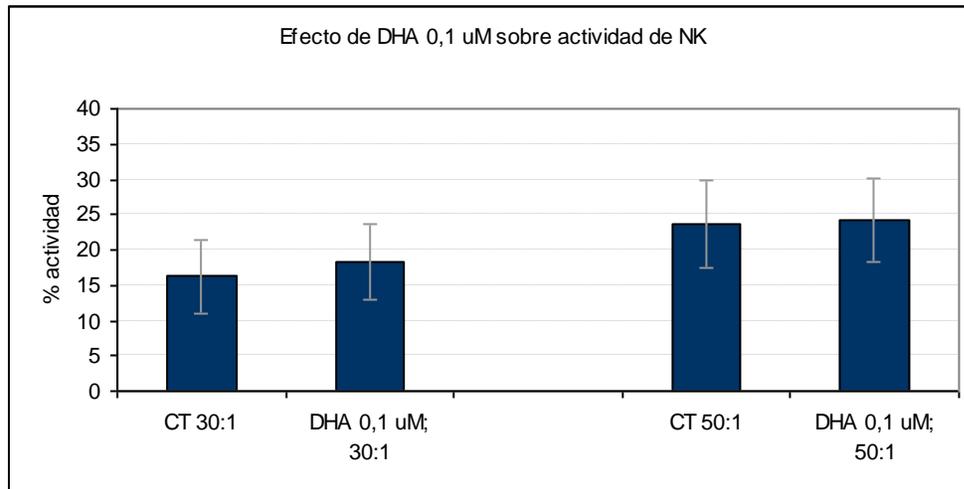


**Fig. 19: Efecto de DHN 0,1  $\mu\text{M}$  sobre actividad de células NK.** La gráfica muestra el porcentaje de actividad (Lisis específica) ( $\% \pm$  error SD), respecto a una situación normal o control, para el compuesto DHN a concentración 0,1  $\mu\text{M}$ , en relación 50:1 y 30:1. Representación del promedio obtenido de 6 experimentos independientes.

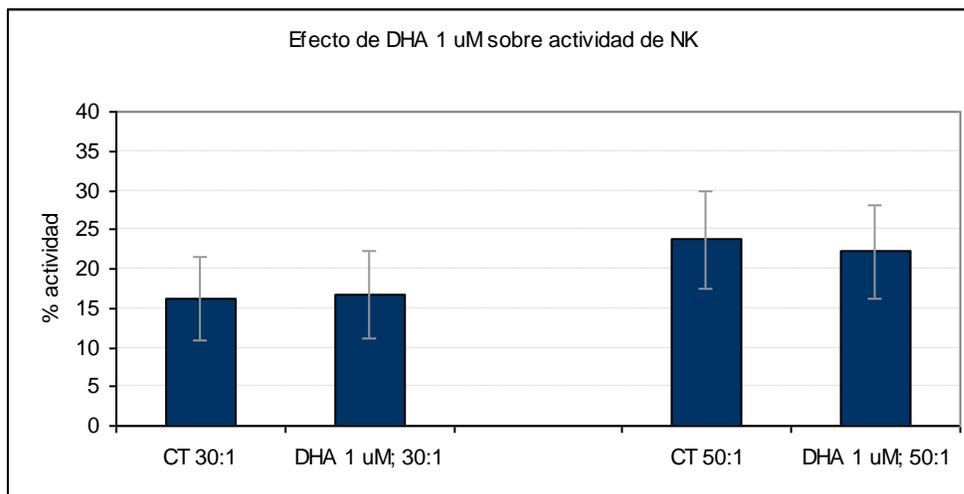


**Fig. 20: Efecto de DHN 1  $\mu$ M sobre actividad de células NK.** La gráfica muestra el porcentaje de actividad (Lisis específica) (%  $\pm$  error SD), respecto a una situación normal o control, para el compuesto DHN a concentración 1  $\mu$ M, en relación 50:1 y 30:1. Representación del promedio obtenido de 6 experimentos independientes.

Para el compuesto DHN a concentraciones de 0,1  $\mu$ M (Fig. 19) y 1  $\mu$ M (Fig. 20), no se observa diferencia significativa al compararlas con el control. En los 6 experimentos independientes se mantiene la tendencia de una respuesta normal de las células NK, por lo que se puede concluir que DHN no afecta la actividad citotóxica de las células NK.



**Fig. 21: Efecto de DHA 0,1  $\mu$ M sobre actividad de células NK.** La gráfica muestra el porcentaje de actividad (Lisis específica) (%  $\pm$  error SD), respecto a una situación normal o control, para el compuesto DHA a concentración 0,1  $\mu$ M, en relación 50:1 y 30:1. Representación del promedio obtenido de 6 experimentos independientes.



**Fig. 22: Efecto de DHA 1  $\mu$ M sobre actividad de células NK.** La gráfica muestra el porcentaje de actividad (Lisis específica) (%  $\pm$  error SD), respecto a una situación normal o control, para el compuesto DHA a concentración 1  $\mu$ M, en relación 50:1 y 30:1. Representación del promedio obtenido de 6 experimentos independientes.

Por otro lado al analizar el efecto de DHA a las mismas concentraciones, 0,1  $\mu\text{M}$  (Fig. 21) y 1  $\mu\text{M}$  (Fig. 22) sobre la actividad citotóxica de NK; observamos que DHA tampoco afecta la actividad citotóxica de las células NK. De acuerdo a estos datos DHN y DHA no afectan la actividad citotóxica de las células NK (Datos obtenidos de 6 experimentos independientes)

## 6.- Discusión

En la presente Tesis se abordó el estudio de la capacidad antineoplásica de los compuestos DHN y DHA. En un comienzo al evaluar la viabilidad celular se demostró que ambos compuestos afectan la proliferación celular de células K562 y U937 de forma dosis dependiente y que ambos compuestos no afectan la viabilidad de células normales PBMC. Esto lleva a pensar varias posibilidades de acción, la intervención mediante intercalación de los compuestos sobre el material genético, un efecto sobre la capacidad metabólica de la célula afectando principalmente el funcionamiento mitocondrial, produciendo especies reactivas que generarían un proceso apoptótico, una despolarización de la mitocondria, o mediante la inhibición de mediadores celulares que forman parte del mismo metabolismo celular, son algunas posibles respuestas. El experimento de viabilidad fue prioritario para esta investigación ya que de no obtener resultados acordes a una inhibición de esta de forma significativa conllevaría inmediatamente a la finalización de cualquier otro experimento. El hecho de que afecte a células tumorales y no a células normales se demostró tanto en los ensayos de viabilidad, como de citotoxicidad mediada por células NK, lo que denotó especificidad por parte de ambos compuestos.

Sabiendo que ambos compuestos tienen actividad antineoplásica cabe estudiar el modo por el cual actúan. Según estudios anteriores que mencionan la presencia de mediadores inflamatorios y expresión elevada de la enzima Ciclooxygenasa Cox-2 en algunos tipos de tumores (Romano M. et. al., 2003; Hong-Ping Y. et. al., 2005; Williams C. et. al., 2000), fue interesante estudiar la expresión de Cox-2 en células U397 diferenciadas con TPA. Observamos que DHA es capaz de inhibir aún más la expresión de esta enzima de manera significativa a una concentración de 10  $\mu$ M, lo que no ocurre con DHN, estableciendo ya una diferencia importante entre ambos compuestos. Una probable respuesta es que DHN y DHA pueden inhibir la viabilidad de células tumorales mediante la inhibición de alguna vía metabólica que comprenda la participación de Cox-2, ya que como se describió anteriormente esta está sobreexpresada en algunos tipo de tumores y permite la activación de otras vías que pueden llevar a un proceso angiogénico, partícipe de un

proceso metastásico. Con el ensayo de viabilidad del efecto combinado de DHN y DHA con compuestos con actividad antiinflamatoria logramos observar que la viabilidad se ve levemente potenciada, de forma estadísticamente significativa en los casos en que se utiliza a DHA en combinación con indometacina, M2 y en menor grado con Matico a 48 horas, lo que apoya la teoría de que mediadores proinflamatorios están presentes y activos en la proliferación de células tumorales y no sobre células normales. Lo anteriormente descrito sugiere que DHN y en especial DHA podrían afectar vías transduccionales de procesos metabólicos de células tumorales estimulados por mediadores proinflamatorios que llevan a la expresión de Cox-2.

Cuando se analizó el comportamiento del potencial mitocondrial mediante rodamina123; ambos compuestos mostraron un efecto despolarizante mucho mayor que el causado por azida de sodio, conocido despolarizador de membrana mitocondrial mediante su efecto sobre el complejo IV de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Lizard G. et. al., 1995; Tan S. et. al., 2006). Sabiendo además que la disipación del potencial de membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C desde la mitocondria aparecen como eventos claves durante el proceso apoptótico (Krysko D. et. al., 2001) no se puede establecer con los resultados obtenidos el mecanismo por el cual DHN y DHA realizan esta acción despolarizante ni menos inhibitoria de la viabilidad, solo se puede decir que despolarizan la mitocondria, DHA en mucho mayor grado que DHN con una diferencia significativa entre ellos ( $p \leq 0,05$ ) y que más aún, no afectan de forma significativa a células normales. Sin embargo, también es importante señalar que tanto DHN como DHA, en especial DHA; podrían inhibir algunos de los complejos mitocondriales o desacoplar la estrecha relación entre los complejos y la gradiente de protones necesaria para la activación del quinto complejo que produce ATP. Esta idea tiene una base importante; el hecho de que células tumorales tienen una alta tasa de crecimiento y proliferación conlleva a suponer que por esto mismo necesitan de mucha mayor cantidad de ATP para desarrollar su actividad metabólica, que sin duda, es mucho más elevada en comparación a una célula normal, lo que explicaría la baja despolarización obtenida con las células normales PBMC, que no es significativamente importante. Esta teoría apunta a una disminución de ATP por los compuestos lo cual, podría ser aclarado mediante el análisis de los niveles de ATP producidos. (Gribble F. et. al., 2000 ; Drew B. et. al.,

2003) Por otra parte, se sabe que pequeñas cantidades ROS producidas por el metabolismo normal de la mitocondria o presentes en el entorno, son capaces de producir la activación de vías transduccionales, en donde se incluye como blanco la proteína activada por mitógeno (MAPK), al igual que NF-kB (Tegeder I. et. al., 2001) relacionado directamente con la activación y expresión celular de la enzima Cox-2 (Kiritoshi S. et. al., 2003; Jung Y. et. al., 2003; Barrios M. et. al., 1999; Berg D. et. al., 2002). Por esta razón se evaluó finalmente la capacidad de generación de ROS por parte de ambos compuestos DHN y DHA, sobre las células K562 y PBMC esta última utilizada como control de células normales en donde se pudo observar diferencias entre ambos compuestos. Los datos muestran que la generación de ROS por ambos compuestos es nula, de hecho gráficamente es menor a la generación basal de ROS. Sorprendentemente a 25  $\mu$ M ambos compuestos disminuyen aún más los niveles de ROS detectados, lo que podría deberse a propiedades antioxidantes o atrapadoras de radicales libres. Por otro lado la generación de ROS en PBMC es muy baja comparada con las células tumorales, lo cual refuerza la idea de que ambos compuestos no generan especies reactivas de oxígeno, sino que tal vez las atrapan, idea que debe ser sin duda analizada a futuro con mayor profundidad.

DHN y en mayor medida DHA, son capaces de inhibir la viabilidad de células tumorales sin necesidad de producir especies tóxicas para la célula como ROS. Queda aún abierta la posibilidad de que ambos compuestos actúen sobre más de un objetivo celular: interrumpir el metabolismo normal de la mitocondria afectando la polarización de su membrana e inhibir a la vez mediadores celulares que activen moléculas necesarias para el crecimiento de células tumorales como es el caso de Cox-2.

De acuerdo a lo descrito anteriormente el compuesto 9,10-dihidroxi-4,4-dimetil-5,8-dihidro-1(4H)-antraceno (DHA), ejerce una mayor acción antitumoral en comparación a 4,4-Dimetil-5-8-dihidroxinaftaleno-1-ona (DHN), inhibiendo la proliferación de células tumorales, tanto de forma independientemente, como potenciado con compuestos con actividad antiinflamatoria como indometacina. Este efecto se llevaría a cabo mediante dos mecanismos probables: un efecto citotóxico mediado por la despolarización de la membrana mitocondrial que llevaría a la célula tumoral a apoptosis y/o inhibiendo la respuesta proinflamatoria mediada por Cox-2

afectando la participación de esta enzima en el crecimiento y metabolismo que implica el desarrollo de células tumorales. Podemos concluir además que la acción de ambos compuestos es llevada a cabo sin afectar la respuesta inmune innata representada por la acción citotóxica de células NK sobre células tumorales, ni afectando la viabilidad de PBMC. Estos datos refuerzan la idea de profundizar los estudios de ambos compuestos como potenciales agentes quimioterapéuticos.

## 7.- Conclusiones

- DHN y DHA tienen un efecto inhibitorio en la viabilidad celular de líneas tumorales U937 y K562 de forma dosis-dependiente.
- Dicho efecto citotóxico sobre la viabilidad celular afecta a células tumorales y no a células normales PBMC, indicando que las células tumorales K562 y U937 son más sensibles a la acción de estos compuestos.
- El efecto combinado de DHN con indometacina, M2 y Matico sobre la viabilidad celular es nula tanto a 48 como a 72 horas. Sin embargo al combinar DHA con los compuestos antes mencionados observamos que el efecto sobre la inhibición de la viabilidad fue potenciado significativamente sólo a 48 horas.
- Los Inmunowesternblot demostraron que la expresión de Cox-2, inducida por LPS es inhibida por acción de DHN y DHA.
- DHN y DHA despolarizan la membrana mitocondrial en células K562, Este efecto es mayor en el caso de DHA en comparación a DHN.
- Células PBMC muestran mayor resistencia a la despolarización de membrana mitocondrial mediado por DHN y DHA.
- DHN y DHA no generan Especies Reactivas de Oxígeno en células K562 ni en PBMC.
- Ambos compuestos a altas concentraciones (25  $\mu$ M) podrían actuar como atrapadores de radicales libres.
- DHN y DHA no afectan la actividad citotóxica mediada por células NK de PBMC.

## 8.- Bibliografía

- Alderden R.; Mellor H.; Modok S.; Hambley T.; Callaghan R.; *Cytotoxic efficacy of an anthraquinone linked platinum anticancer drug*; 2006; *Biochem. Pharmacol.*; 71: 1136-1145.
- Araya R.; Cardona W.; Cassels B.; Delgado T.; Ferreira J.; Miranda D.; Pavani M.; Pessoa H.; Soto J.; Weiss B.; *Effects of 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H) anthracenone derivates on tumor cell respiration.*; 2006; *Bioorg. Med. Chem.*; 13: 4664 – 4669.
- Araya R.; Delgado T.; Gárate M.; Ferreira J.; Pavani M.; Pessoa H.; Cassels B.; *Effects of 4,4-Dimethyl-5,8- dihidroxynaphtalene- 1- one and 4,4-Dimethyl-5,8-dihidroxytetralone Derivates on Tumor cell respiration.*; 2002; *Bioorg. Med. Chem.*; 10: 3057-3060.
- Balkwill F.; Mantovani A.; *Inflammation and cancer: back to Virchow?* ; 2001; *Lancet*; 357: 539-545.
- Barrios M.; Chadee K.; *Novel regulation of Cox-2 expression and prostaglandin E2 production by IFN- $\gamma$  in human macrophages.* 1998; *J Immunol.*; 161: 2441-2448.
- Barrios M.; Tiraloché G.; Chadee K.; *Lipopolysaccharide Modulates COX-2 transcripcionally and posttranscriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$* ; 1999; *Am. Association Immunol.*; 22: 963-969.
- Berg D.; Zhang J.; Lauricella D.; Moore S.; *IL-10 is a central regulator of Cox-2 expression and Prostaglandin production*; 2002; *Am. Association immunol.*; 2674-2680.
- Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* 1976; *Anal Biochem.*; 72:248-254.
- Calderón J.; *Estudio farmacológico de diterpenoides obtenidos desde especies vegetales medicinales de la región altoandina*; 2003; tesis para optar al título de Químico Farmacéutico; Universidad de Chile.

- Castello L.; Tessitore L.; *Resveratrol inhibits cell cycle progression in U937 cells*; 2005; *Oncol. Rep.*; 13: 133-137.
- Castle PE, Hillier S., Rabe L, Hildesheim A., Herrero R., Bratti M., Sherman M., Buck R., Rodríguez M., Morales J., Schiffman M: *An association of cervical inflammation with high degree cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV)*; 2001; *Cancer Epidemiology. Biomarkers Prev.*; 10: 1021-1027.
- Chace J.H., Hooker N.A., Mildenstein K.I. Krieg A.M. Cowdery J.S.; *Bacterial DNA-induced NK cell IFN- $\gamma$  production is dependent on macrophage secretion of IL-12*; 1997; *Clin. Immunol. Immunopathol*; 84: 185-193.
- Chauvin C.; De Oliveira F.; Ronot X.; Mousseau M.; Leverage X. ; *Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells.*;2001 ; *J. Biol. Chem.*; 276: 41394-41398.
- Chen X-H.; Bai J.; Shen F; Bai A.; Guo Z.; Cheng G; *Imrecoxib: a novel and selective cyclooxygenase 2 inhibitor with anti-inflammatory effect*; 2004; *Acta Pharmacol. Sin.*; 25: 927-931.
- Colomé J.; Jorda J.; Fernández G.; Segoviano R.; Fernández D.; Pérez E.; *Radicales Libres y citotoxicidad del etanol en los leucocitos humanos de sangre venosa periférica.*; 2003; 20(8): 396-398.
- Coussens L.; Werb Z.; *Inflammation and Cancer*; 2002; *Nature*; Vol. 420: 860-867.
- Drew B.; Leeuwenburgh C.; *Method for measuring ATP production in isolated mitochondria: ATP production in brain and liver mitochondria of Fischer-344 rats with age and caloric restriction*; 2003; *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*; 285: 1260-1268.
- Eli Y.; Przeddecki F.; Levin G.; Kariv N.; Raz A.; *Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and vivo.*; 2001; *Biochem. Pharmacol.*; 61: 565-571.
- Falchi A.; Isola R.; Diana A.; Putzolu M.; Díaz G.; *Characterization of depolarization and repolarization phases of mitochondrial membrana potencial*

*fluctuations induced by tetramethylrhodamine methyl ester photoactivation*; 2005; FEBS journal; 272: 1649-1659.

- Fang S. ; Koteswara Y.; Tzeng Y.; *Cytotoxic effect of trans-cinnamaldehyde from cinnamomum osmophloeum leaves on human cancer cell lines*; 2004; 2: 136-147.
- Fang S.; Koteswara Y.; Tzeng Y.; *Cytotoxic effect of trans-cinnamaldehyde from cinnamomum osmophloeum leaves on human cancer cell lines.*; 2004; Int. J. Appl. Sci. Eng. 2: 136-147.
- Felty Q.; Roy D.; *Estrogen, mitochondria, and growth of cancer and non-cancer cells*; 2005; J. Carcinog.; 4: 1 -18.
- Ferlini C, Biselli R, Nisini R, Fattorossi A. *Rhodamine 123 a useful probe for monitoring T cell activation*; 1995; Cytometry; 21:284-293.
- Forslund C.; Bylander B.; Aspenberg P.; *Indomethacin and celecoxib improve tendon healing in rats*; 2003; Acta Orthop. Scand; 74 (4): 465-469.
- Fu S.; Wu Y.; Zhang Y.; Qiao M.; Chen Y.; *Anticancer effects of COX-2 inhibitors and their correlation with angiogenesis and invasion in gastric cancer*; 2004; World J. Gastroenterol.; 10: 1971-1975.
- Garcia P.; Koster F.; Kelley R.; McDowell T.; Bankhurst A.; *Antibacterial activity of human natural Killer cells*; J. Exp. Med.; 1999: 99-113.
- Garcia-Peñarrubia P.; Bankhurst A.; Koster F.; *Prostaglandins from human T suppressor / cytotoxic cells modulate NK antibacterial activity*; ; J. Exp. Med.; 1989: 601-606.
- Gilroy D.; Colville N.; Chivers W.; Paul-Clark M.; Willoughby D.; *Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties*; 1999; Nature Medicine; 5 (6): 698-701.
- Gribble F.; Loussouarn G.; Tucker S.; Zhao C.; Nichols C.; *A novel method for measurement of submembrane ATP concentration*; 2000; J. Biol. Chem.; 275: 30046-30049.
- Gutierrez P.; *Efecto de Diterpenoides derivados del mulinano sobre la actividad de xantino oxidasa, atropamiento de radicales libres y expresión de Cox-2*; 2005; tesis para optar al título de Químico Farmacéutico; Universidad de Chile.

- Herlaar E. Brown Z. *p38 MAPK signaling cascades in inflammatory disease*. Mol.Med.Today; 1999, 5: 439-447.
- Herr I.; Debatin M.; *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy*; 2001; Blood; 98: 2603-2614.
- Hilleman M. Critical review and outlook: *Pathogenesis, prevention and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus.*; 2003; Vaccine, 21:4626-4649.
- Hoffmann S.; Spitkovsky D.; Radicella P.; Epe B. and Wiesner Rudolf; *ROS derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of mammalian cells.*; 2004; Free Radical Biol. Med., 36:765-773.
- Hong-Ping Y.; Xiao W.; Yuan S.; Fang L.; Shun X.; *Antiproliferation and apoptosis induced by selective COX-2 inhibitor in human esophageal squamous carcinoma cells*; 2005; J. Applied Res.; 5: 212-220.
- Houghton P.; Hylands P.; Mensah A.; Hensel A.; Hensel A.; Deters A.; *In vitro test and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example*; 2005; J. Ethnopharmacol.; 100: 100-107.
- Inoue A.; Muranaka S.; Fujita H.; Kanno T.; Tamai H.; Utsumi K.; *Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on ROS, AKT, Cytochrome c and Caspase pathway.*; Free Radical Biol. Med., 2004; 37: 1290-1299.
- Juan G, Cavazzoni M, Saez GT, O'Connor JE. *A fast kinetic method for assessing mitochondrial membrane potential in isolated hepatocytes with rhodamine 123 and flow cytometry*. Cytometry; 1994; 15:335-342.
- Jung Y., Isaacs J., Lee S., Trepel J. and Neckers L. *IL-1 $\beta$ -mediated up-regulation of HIF-1 via an NF $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis*; 2003; FASES J.; 17: 2115-2117.
- Junkera A.; Kipnis A.; Jamieson A.; Gonzales M.; Difenbach A; Raulet D.; Turner J; Orme I.; *NK cells respond to pulmonary infection with Mycobacterium tuberculosis, but play a minimal role in protection.*; 2003; J. immunol.; 6039-6045.

- Kiritoshi S.; Nishikawa T.; Sonoda K.; Kukidome D.; Senokuchi T.; Matsuo T.; Matsumura T.; Tokunaga H.; Brownlee M.; Eiichi A.; *ROS from mitochondria induce Cox-2 gene expression in human mesangial cells.*; 2003; Diabetes; 52: 2570-2577.
- Krause M.; Brand M.; Krauss S.; Meisel C.; Vergin H.; Burmester G. ; Buttgerit F. ; *Nonsteroidal Antiinflammatory drugs and a selective cyclooxygenase 2 inhibitor uncouple mitochondria intact cells* ; 2003; The Histochem. Soc.; 48: 1438-1444.
- Krysko D.; Roels F.; Leybaert L.; D'Herde K.; *Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis.*; 2001; J Histochem Cytochem; 49: 1277-1284.
- Li D-M.; Lu W-L.; Wang X-Q.; Wang J-C. ; Zhang H.; Zhang R-J.; Wang G-L.; Zhang Q.; *Pharmacokinetics of indomethacin, a metabolite of Acemetacin, following a Single dose and multiple doses administered as acemetacin sustained release tablets in Healthy male volunteers*; 2005; J. Health Sci., 51(3): 308-316.
- Liang M.; Bardhan S.; Pace E.; Rosman D.; Beutler J.; Porco J.; Gilmore T.; *Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B signaling proteins IKK $\beta$  and p65 through specific cysteine residues by epoxyquinone A monomer: correlation with its anti-cancer cell growth activity.*; 2006; Biochem. Pharmacol; 71: 634-645.
- Lizard G.; Fournel S.; Genestier L.; Dhedin N.; Chaput C.; Flacher M.; Mutin M.; Panaye G.; Revillard J.; *Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis*; 1995; Citometry; 21: 275-283.
- Loyola L.; Morales G.; De la Torre M.; Pedreros S.; Rodríguez B.; *17-acetoxymulinic acid, a rearranged diterpenoid from Mullinum crassifolium*; 1990; Phytochem; 29: 3950-3951.
- Mahajan S.; Aalinkeel R; Schwartz S.; Chawda R.; Nair M.; *Effector cell mediated cytotoxicity measured by by intracellular granzyme B release in VIH infected subjects*; 2003; Biol. Proced. Online; 5:182-188.
- Manning C, Vallyathanb V. and Mossman B. *Disease caused by asbestos: mechanism of injury and disease development.*; 2002; Inter. Immunopharmacol.; 2: 191-200

- Mensah A.; Sampson J.; Houghton P.; Hylands P.; Westbrook J.; Dunn M.; Hughes M.; Cherry G.; *Effects of Buddleja globosa leaf and its constituents relevants to wound healing*; 2001; J. Ethnopharmacol.; 77: 219-226.
- Meyer-Siegler K.; Leifheit E.; Vera P.; *Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells.*; 2004; BMC Cancer; 1-12.
- Mifflin R.; Powell D.; *Ciclooxigenases*; 2001; 8: 49-68.
- Miwa S. and Brand M.D.; *Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling*; 2003; Biochem. Soc. Transactions.; 31: 1300 – 1301.
- Modica-napolitano, J. S. and Aprille J. R. *Basis for the selective cytotoxicity of the rhodamine123.*;2002; Cancer Res., 47: 4361-4365.
- Munger K. *The role of human papillomaviruses in human cancers*; 2002; Frontiers in Bioscience; 7:D641-D649.
- Nagano S.; Otsuka T.; Niuro H.; Yamaoka K.; Arinobu Y.; Ogamo E.; Akahoshi M.; Inouse Y.; Miyake K.; Nakashima H.; Niho Y.; Harada M.; *Molecular mechanism of Lipopolysaccharide-induced COX-2 expresión in human neutrophils: involvement of the MAPK pathway and regulation by anti-inflammatory cytokines*; 2001; J. Immunol; 14: 733-740.
- Napolitano M.; Singh Keshav; *Mitochondria as target for detection and treatment of cancer*; 2002; Expert rev. Molec. Med.; 1-19.
- Opirari A.; Tan L.; Boitano A.; Sorenson D.; Aurora A. ; Liu R.; *Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells*; 2004; Cancer Res.;64: 696-703.
- Pallis M.; Grundy M.; Turzanski J.; Kofler R.; Russell N.; *Mitochondrial membrane sensitivity to depolarization in acute myeloblastic leukemia is associated with spontaneous in vitro apoptosis, wild-type TP53, and vicinal thiol/disulfide status.*; 2001; Blood; 98: 405-413.
- Park C.; Bissell M., Barcellos-Hoff M.H. *The influence of the microenvironment on the malignat phenotype*; 2000; Mol.Med.Today; 6:324-329.

- Park J.; Schoene N.; *N-Caffeoyltyramine arrests growth of U937 and Jurkat cells by inhibiting protein tyrosine phosphorylation and inducing caspase-3*; 2003; Cancer Letters; 202: 161-171.
- Poynter M., Daynes R. *PPAR $\alpha$  activation modulates cellular redox status, repress NF- $\kappa$ B signaling and reduces inflammatory cytokine production in aging*; 1998; J. Biol. Chem.; 273: 32833-32841.
- Punchard N.; Whelan C.; Adcock I.; *Inflammation*; 2004; J. inflammation; 1: 1-4.
- Rigas B.; Kashfi K.; *Cancer prevention: a new era beyond COX-2*; 2005; J.f pharmacol. Exp. therapeutic; 314: 1-8.
- Romano M.; Claria J.; *Cicloxygenase 2 and lipooxygenase converging functions on cells proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy*; 2003; FASEB J. 17: 1986-1995.
- Salinas J.; *Estudio antiinflamatorio analgésico y tóxico de nuevos diterpenoides aislados de especies vegetales de la región altoandina chilena*; 2004; tesis para optar al título de Químico Farmacéutico; Universidad de Chile.
- Sanchez-Alcazar J.; Khodjakov A.; Schneider E.; *Anticancer Drugs induce increased mitochondrial cytochrome c expression that precedes cell death*; 2001; Cancer res.; 61: 1038-1044.
- Sandor F.; Buc M.; *Toll-like receptors III. Biological significance and impact for human medicine*; 2005; Folia Biologica ; 51: 198-203.
- Scaduto R.; Grotyohann L.; *Measurement of mitochondrial membrane potencial using fluorescent rhodamine derivates*; 1999; Biophysical J.; 76: 469-477.
- Shapiro HM. *Functional assays for cell activation" in Practical flow cytometry*, Third Edition, 1995, (542 pages) Chapter 7.4: 339-342.
- Sporn M.; Roberts A.; *Peptide growth factors and inflammation, tissue repair and cancer*; 1986; J. clin. Invest; 78: 329-332.
- Steven G. E.; Parham P.; Dupont B; Geraghty P.; Trowsdale J; Middleton D.; Vilches C; Carrington M.; Witt C.; Guethlein L.; Shilling H.; Garcia C.; Hsu K.; Wain H.; ; *Killer –cell immunoglobulin- like receptor KIR nomenclature report*; 2003; Immunogenetics; 55: 220-226.

- Syrjanen KJ; *HPV infections and esophageal cancer*. J Clin.Path. 2002, 55: 721-728.
- Szewczyk A.; Wojtczak L.; *Mitochondria as a pharmacological target*; 2002; Pharmacol. Rev.; 54: 101-127.
- Tan S.; Sagara Y.; Liu Y.; Maher P.; Schubert D.; *The regulation of ROS production during programmed cell death*; 2006; The J. cell Biology; 141: 1423-1432.
- Tegeder I.; Pfeilschifter J.; Geisslinger G.; *Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors*; 2001; Faseb J.; 15; 2057-2072.
- Tliba O.; Chauvin A.; Le Vern Y.; Boulard C.; Sibille P.; *Evaluation of the hepatic NK cell response during the early phase of Fasciola hepatica infection in rats*; Vet. Re. 2002; 33: 327-332.
- Wang T.; Qin L.; Liu Y.; Wilson B.; Eling T.; Langenbach R.; Taniura S.; Hong J.; *Role of reactive oxygen species in LPS-induced production of prostaglandin E2 in microglia*; 2004; J. Neurochem.; 88: 939-947.
- Williams C.; Tsuji M.; Dey S.; *Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth*; 2000; J.Clin. Invest; 105: 1589-1594.
- Xian-Song Wang, Zhen Sheng, You-Bing Ruan, Yang Guang, Mu-Lan Yang; *CpG oligodeoxynucleotides inhibit tumor growth and reverse the immunosuppression caused by the therapy with 5-fluorouracil in murine hepatoma*; World J. Gastroenterol; 2005; 11: 1220-1224.
- Yun C.; Lundgren A.; Azem J.; Sjöling A.; Holmgren J.; Svennerholm A.; Lundin S.; *Natural killer cells and Helicobacter pylori infection : bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production.*; Infection and immunity; 2005: 1482-1490.
- Zhang D.; Wu J.; Ye F.; Jiang S.; Yi J. ; Zhang W. ; Wei H.; Sung M.; Wang W.; Li X.; *Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by Scutellaria Baicalensis.*; 2003; Cancer Res.; 63: 4037-4043.