



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTINEOPLÁSICO DE
NITROSOS ARIL DIHIDROPIRIDINAS**

**Profesor Patrocinante:
Dr. Dante Miranda Wilson
Departamento de Bioquímica y**

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

**Director de Tesis:
Dr. Dante Miranda Wilson
Departamento de Bioquímica**

**y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Farmacéuticas
Universidad de Chile**

Memoria para Optar al Título de Bioquímico

Rodrigo Javier Almárcegui Zamorano

Santiago-Chile

2006

DEDICATORIA

A mis Padres, por ser mi motivación y Energía.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi madre, quien con su apoyo y amor me ha dado la fuerza para poder seguir adelante y lograr mis objetivos en la vida. Sin dudas que cada uno de mis logros son también logros de ella. A mi padre que a pesar de estar lejos, su cariño y amistad me han acompañado siempre. A Paulina, quien ha sido la persona más leal, buena y generosa que he conocido, y que con su amor me ha ayudado a sobrepasar todas las dificultades.

También quiero agradecer a mi director de Tesis y amigo el Doctor Dante Miranda quien me dio la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo. Gracias por sus consejos y enseñarme con su ejemplo a ser una mejor persona. A Margarita Montoya, quien me enseñó una enormidad de cosas y me ayudó a darme cuenta de mis defectos y a tratar de mejorarlos.

Agradezco a las personas que día a día me acompañaron en el laboratorio, a Gladys quien con su compañía, alegría y buena disposición hizo más grato el ya agradable trabajo en el laboratorio. También quiero agradecer a un gran amigo y compañero, Jorge Simon, con el cual hemos compartido muchas experiencias y hemos entablado una amistad que de seguro será muy duradera. También deseo agradecer a Sabrita y Patricio quienes formaron parte de nuestro laboratorio y que dejaron un grato recuerdo. No puedo dejar de dar las gracias a quienes fueron mis amigos durante los años de carrera y que de seguro lo seguirán siendo, Sergio, Rodrigo, Oscar, Pablo Escobar, Pablo Marambio, Coto, Manuel, Carlos, Pancho y todos aquellos que, con su amistad, han contribuido a que mi experiencia universitaria haya sido tan grata.

También quiero agradecer al Doctor Javier Puente, por tener siempre buena disposición. A la profesora Maria Eugenia Letelier, por su apoyo y enseñanza, y a la Doctora Jenny Fiedler por su ayuda y por acogerme en su laboratorio como uno más de su grupo. Finalmente quiero agradecer a mis amigos de Neurobioquímica, Sergio, Karina, Coto, Romina y Claudio quienes me han acompañado y nunca han dudado en entregarme una ayuda o consejo cuando lo he necesitado.

A todos, Muchas gracias.

ABREVIATURAS

ACNK	Actividad citotóxica de las células Natural Killer
CM-H₂DCFDA	5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DHP	Dihidropiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
LPS	Lipopolisácarido
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
NC3	m-nitroso isopropil dihidropiridina,
NC4	p-nitroso isopropil dihidropiridina
NC7	m-nitroso isometil dihidropiridina
NK	Natural Killer
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Amortiguador fosfato salino
PGE₂	Prostaglandina E ₂
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero Bovino Fetal

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
SUMMARY	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Nitrosocompuestos	1
1.2. Especies Reactivas de oxígeno: Generación y características	3
1.3. Daño a estructuras celulares	4
1.4. Fuentes de especies reactivas de oxígeno	5
1.5. Sistemas antioxidantes	6
1.6. Especies reactivas de oxígenos como una señal celular	7
1.7. Ciclooxygenasa 2	8
Hipótesis	11
Objetivos Generales	12
Objetivos Específicos	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Reactivos	13

2.2. Obtención de Células Mononucleares de Sangre periférica (PBMC)	14
2.3. Cultivos de Líneas celulares	14
2.4. Ensayo de viabilidad celular con MTS	15
2.5. Detección de Especies reactivas de Oxígeno	16
2.6. Determinación de expresión de COX-2 mediante inmunowestern Blot	17
2.7. Medición de la actividad citotóxica de células Natural Killer (ACNK)	18
III. RESULTADOS	19
3.1. Efectos de nitrosos aril dihidropiridinas sobre la viabilidad celular	19
3.2. Efectos de nitrosos aril dihidropiridinas sobre la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS) en la línea celular tumoral K562	23
3.3. Efectos de nitrosos aril dihidropiridinas sobre la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS) en células mononucleares de sangre periférica	25
3.4. Efecto de nitrosos aril dihidropiridinas sobre expresión de COX-2	27
3.5. Efecto de nitrosos aril dihidropiridinas sobre la actividad citotóxica de células Natural Killer (ACNK)	31
IV. DISCUSIÓN	35
V. CONCLUSIONES	40
VI. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1 Nitrosocompuestos derivados del fármaco nitroaril-1,4- dihidropiridinas	2
Figura N°2. Generación de especies reactivas de oxígeno por reducción secuencial univalente del oxígeno molecular	3
Figura N°3 Reacción catalizada por las ciclooxigenasas	9
Figura N°4 Efecto de Nitrosos aril DHP sobre la viabilidad de líneas de células tumorales	21
Figura N°5 Efecto de Nitrosos aril DHP sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica	22
Figura N°6 Efectos de nitrosos aril dihidropiridinas sobre la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS) en la línea celular tumoral K562	24
Figura N°7 Efectos de nitrosos aril dihidropiridinas sobre la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS) en células mononucleares de sangre periférica	26
Figura N°8 Efecto de m-nitroso isopropil DHP (NC3) sobre expresión de COX-2	28
Figura N°9 Efecto de p-nitroso isopropil DHP (NC4) sobre expresión de COX-2	29
Figura N°10 Efecto de m-nitroso isometil DHP (NC7) sobre expresión de COX-2	30
Figura N°11 Efecto de m-nitrosos isopripil dihidropiridina (NC3) sobre la actividad citotóxica de células Natural Killer (ACNK)	32
Figura N°12 Efecto de p-nitrosos isopripil dihidropiridina (NC4) sobre la actividad citotóxica de células Natural Killer (ACNK)	33
Figura N°13 Efecto de m-nitrosos isometil dihidropiridinas (NC7) sobre la actividad citotóxica de células Natural Killer (ACNK)	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. IC₅₀ de Nitrosocompuestos

23

RESUMEN

Estudio del efecto antineoplásico de nitroso aril dihidropiridinas

Los Análisis electroquímicos de nitrosos aril dihidropiridinas muestran que estos compuestos pueden modificar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS son pro-oxidantes derivados del oxígeno que en concentraciones fisiológicas pueden estar involucrados en transducción de señales, que durante un estrés oxidativo se encuentran en exceso y pueden provocar daños a importantes funciones biológicas afectando la viabilidad celular. De hecho, el incremento en la producción de ROS ha sido implicado en muchos procesos fisiológicos y patológicos incluyendo envejecimiento y carcinogénesis.

Dada la importancia de estas especies, tanto en procesos normales como patológicos, se estudió el potencial efecto antitumoral de estos nitrosocompuestos. Para ello, se evaluó el efecto de los nitrosoderivados sobre la viabilidad celular utilizando las líneas de células tumorales (RAW, U937, K562) y células mononucleares obtenidas desde sangre periféricas de donantes normales (PBMC), mediante ensayos con el reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS). También se cuantificó el efecto sobre la generación de ROS en células tumorales y PBMC usando el marcador diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA).

Además, debido a la importancia de la enzima COX-2 en el desarrollo de la tumorigénesis, se evaluó el efecto de los nitrosocompuestos sobre la actividad de esta enzima inducida *in vitro* por LPS.

Finalmente, se midió el efecto sobre la actividad citotóxica de las células Natural Killer mediante el ensayo de liberación de ⁵¹Cr desde células blancas radiomarcadas, dado que las células NK representan una importante defensa del sistema inmune innato contra células tumorales.

Nuestros resultados indicaron que los nitrosos aril dihidropiridinas generan un efecto citotóxico dosis dependiente sobre las células tumorales. Sorprendentemente las células PBMC muestran mayor resistencia al efecto de estos nitrosoderivados, lo cual, se refleja en los IC₅₀ obtenidos de los análisis de viabilidad celular, donde los IC₅₀ para células tumorales variaron entre 4-19 µM, en cambio, para células PBMC variaron entre 43-63 µM.

Por otro lado, los resultados obtenidos de los experimentos de generación de ROS mostraron que los nitrosocompuestos aumentan los niveles de ROS en células K562, pero no en PBMC. También, se observó una inhibición de la expresión de COX-2 inducida por Lipopolisacárido (LPS) por efecto de los nitrosocompuestos. Además, la actividad de las células NK no varió por acción de estos compuestos en ninguna de las concentraciones analizadas.

Estos resultados sugieren que los nitrosocompuestos presentan citotoxicidad principalmente sobre células tumorales la que podría estar mediada por generación de ROS. La inhibición de la expresión de COX-2 potenciaría esta actividad antitumoral. Además, al no afectar la actividad de las células NK mantienen activa la respuesta antitumoral inmunológica innata.

Los resultados obtenidos permiten concluir que los nitrosocompuestos presentaron una importante actividad antineoplásica sin afectar de manera significativa la viabilidad de las células mononucleares ni la Actividad citotóxica de células Natural Killer (ACNK). Esto, asociado al efecto sobre COX-2, refuerza el potencial antitumoral de estos compuestos lo cual apoya estudios adicionales para dilucidar su mecanismo de acción.

SUMMARY

Study of the antineoplastic effect of nitroso aril dihidropyridines

Electrochemical analysis of dihidropyridines show that these compounds can modify intracellular levels of reactive oxygen species (ROS). ROS are pro-oxidating derivatives of oxygen, which at physiological concentrations can be involved in signals transduction. However, during oxidative stress, high levels of ROS have additional unfavorable effects upon crucial biological function which can dramatically affect cellular viability. In fact, increase in the production of ROS has been implicated in many human disease processes, including aging and carcinogenesis.

Thus, due to the importance of nitrosocompounds, both in normal and pathological processes, we decided to study the potential antitumoural effects of these derivatives. For this reason we studied the *in vitro* effects of nitroso aril dihidropyridines on the cellular viability of several tumour cells lines (RAW, U937, K562) and also in PBMC using the reagent 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay. Besides, the intracellular generation of ROS in the presence of nitrosocompounds in tumor cells and PBMC was measured with the fluoroprobe CM-H₂ DCFDA (5-(and -6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate).

Because COX-2 plays an important role in carcinogenesis and its expression is modulated by ROS we evaluated the effect of Nitrosocompounds on the *in vitro* Lipopolisacarid (LPS)-induced expression of COX-2.

An important defense of the innate immune response against tumor cells is due to NK cell function. Thus, we measured the effect of Nitrosocompounds on the natural killer cytotoxic activity of PBMC using the Cr⁵¹ release assay.

Our findings indicate that the dihidropyridines derivatives produce a dose response cytotoxic effect on tumour cells. Surprisingly, PBMC showed to be more resistance to the effect of these nitrosoderivates. In fact the IC₅₀ values for tumour cells viability varies between 4-19 µM while for PBMC the IC₅₀ values ranged between 43-63 µM.

This result correlates with ROS generation were nitrosocopounds significantly raised ROS levels in K562 cells, but not in PBMC.

Moreover, nitrocompounds induced an important inhibition of LPS induced-COX-2 expression in RAW cells. On the other side, NK cell activity of PBMC was not modified by these composed.

These findings suggest that the nitrosoderivatives exerted a citotoxic effect mainly on the tumour cell lines studied and that correlates with and increased ROS levels and an inhibition of COX-2 expresion.

In conclusion these results indicates that nitrosoderivatives have a potential antitumour activity.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de reacciones electroquímicas en la interfase electrodo-solución con derivados del fármaco nitroaril-1,4-dihidropiridinas han mostrado que estos compuestos actúan formando intermediarios REDOX activos *in vivo* donde el grupo nitro tendría un rol principal. Estos nitroderivados presentan un grupo ArNO₂ electroactivo capaz de ser reducido formando el anión radical nitro (ArNO₂⁻), especie que puede reaccionar con oxígeno molecular formando especies pro-oxidantes de oxígeno. *In vivo* la nitrorreducción estaría catalizada por diferentes enzimas oxido-reductasas (1).

Nitrosocompuestos también obtenidos a partir de nitroaril-1,4-dihidropiridinas presentan un patrón de reducción similar a los nitroderivados y su análisis electroquímico en interfase electrodo-solución mostró que estos nitrosoderivados también forman intermediarios REDOX activos (2).

1.1. Nitrosocompuestos

En este trabajo se evaluó los efectos antineoplásicos de diferentes nitrosoderivados, m-nitroso isopropil dihidropiridina (NC3), p-nitroso isopropil dihidropiridina (NC4) y m-nitroso isometil dihidropiridina (NC7) (figura N°1). Estos nitrosoderivados presentan diferentes sustituciones en la posición 3 y 5 de la dihidropiridina y el grupo NO cambia su posición relativa respecto a la Dihidropiridina (DHP)

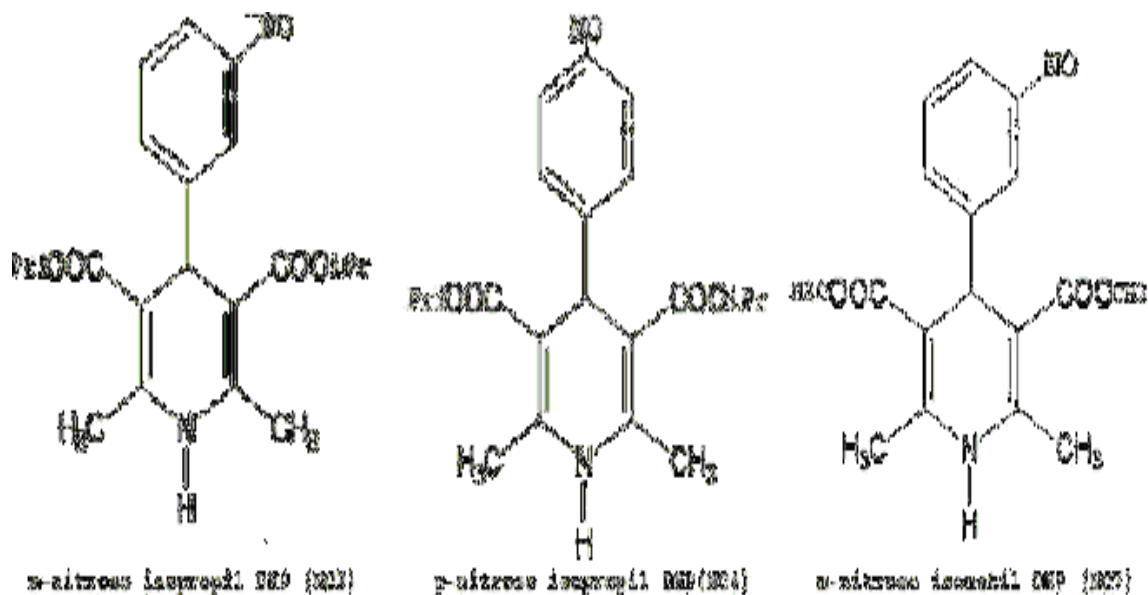


Figura N°1. Nitrosocompuestos derivados del fármaco nitroaril-1,4-dihidropiridinas

La reducción del grupo NO en el anillo bencénico ubicado en la posición 4 de una DHP y la formación de radical ArNO^\cdot es un prerrequisito para su actividad biológica, llegándose a afirmar que el parámetro que define el potencial de reducción de la dupla $\text{ArNO} / \text{ArNO}^\cdot$ es un índice muy apropiado para definir el tipo de propiedades biológicas de los diferentes nitrosocompuestos (3).

La importancia de las diferentes sustituciones presentes en los nitrosoderivados radica en que permiten modificar el potencial de reducción de la dupla $\text{ArNO} / \text{ArNO}^\cdot$. Este potencial se ve afectado por la posición relativa del grupo NO respecto a la DHP y por el efecto estérico de los sustituyentes en las posiciones 3 y 5 de la DHP. El efecto dador de electrones de la DHP afectará al grupo NO en las posiciones *orto* y *para* del anillo bencénico, no existiendo este efecto en la posición *meta*. El efecto estérico de los grupos éster de las posiciones 3 y 5 de la DHP, es probable que saque el anillo bencénico fuera del plano de conjugación con la DHP, produciendo cambios en la facilidad de reducción del grupo NO, principalmente cuando este está ubicado en la posición *orto*.

corresponde a la forma más importante de generación de H_2O_2 en células eucariontes (5). Sin embargo, también puede ser formado directamente por reducción de 2 electrones del O_2 , en un mecanismo catalizado por flavoproteínas oxidasas, como por ejemplo las deshidrogenasas o transhidrogenasas que reaccionan lentamente con O_2 para formar principalmente H_2O_2 (7). El peróxido de hidrógeno es considerado un importante metabolito reactivo de oxígeno pero no es un radical propiamente tal. Su efecto se explica por su capacidad oxidativa y además es una fuente de especies más reactivas y dañinas como el hidroxilo ($OH\cdot$) a través de una ruptura homolítica dependiente de metales de transición. A su vez, el radical Hidroxilo ($OH\cdot$) representa el radical reactivo de oxígeno más poderoso ya que posee una alta afinidad por otras moléculas y reacciona a una velocidad muy alta tanto con moléculas orgánicas como inorgánicas (6).

La actividad pro-oxidante de estas especies derivadas del oxígeno hacen que en cantidades que sobrepasan a las normales sean fuertemente dañinas para la célula ya que reaccionan con macromoléculas generando daños estructurales irreversibles y provocan la muerte celular (5).

1.3. Daño a estructuras celulares

Una de las estructuras más vulnerable a la oxidación son las membranas celulares debido a que poseen una alta concentración de ácidos grasos insaturados los cuales son especialmente sensibles al ataque por radicales libres, principalmente radical hidroxilo, a nivel de los dobles enlaces en sus cadenas hidrocarbonadas en un fenómeno llamado lipoperoxidación (8). La lipoperoxidación ocurre en 3 etapas. La etapa de iniciación ocurre cuando el radical hidroxilo sustrae un átomo de hidrógeno de un grupo metileno del ácido graso para dar lugar a un radical ácido graso (el ácido graso retiene un electrón). Este nuevo radical en busca de su estabilidad se reordena y reacciona con oxígeno de los alrededores generando la forma radicalaria $ROO\cdot$. Seguidamente, el $ROO\cdot$, en busca de una pareja para su electrón, ataca el lípido vecino y da lugar a un nuevo radical ácido graso, el cual se reordena y reacciona con

oxígeno formando $\text{ROO}\cdot$, este nuevamente reacciona con el fosfolípido vecino y así sucesivamente (propagación), creando una verdadera reacción en cadena que daña de manera prácticamente irreversible la membrana celular. La etapa de término ocurre cuando interacciona el $\text{ROO}\cdot$ con otro radical o por efecto de un antioxidante (6,9).

Además de las membranas celulares, otras dos importantes macromoléculas son especialmente sensibles a la acción de ROS, las proteínas y el DNA. Las proteínas pueden recibir daño directo o indirecto por el radical hidroxilo. Este daño puede ser peroxidación, daño a residuos de aminoácidos específicos por oxidación lo que promueve cambios en su estructura terciaria, degradación, y fragmentación. Esto provoca una pérdida de la actividad enzimática, alteraciones de funciones celulares, cambios en el tipo y niveles de proteínas celulares, etc. Por su parte el $\text{OH}\cdot$ también puede interactuar con el DNA generando una serie de daños, siendo los más frecuentes modificaciones de bases del DNA, quiebres del DNA, pérdidas de purinas (sitios apurínicos) y daños al sistema de reparación del DNA (6).

Numerosas investigaciones han concluido que el aumento de especies reactivas de oxígeno están involucradas en una variedad de fenómenos biológicos tales como mutación, carcinogénesis, enfermedades degenerativas, desarrollo, envejecimiento e inflamación. In vitro se ha observado que la exposición de los tejidos a oxidantes causa incremento en la permeabilidad de la mucosa, citotoxicidad, pérdida de la actividad de la gliceraldehído deshidrogenasa, alteración de la función secretora en las células epiteliales del colon y en el transporte activo del sodio (22).

1.4. Fuentes de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno son productos de muchos procesos normales dentro de la célula que incluyen generación de energía, descomposición de lípidos y proteínas, respuesta a catecolaminas y procesos inflamatorios (10). La exposición de organismos vivos a irradiación ionizante y no ionizante (11), el aire contaminante (12), las drogas (13), una larga variedad de xenobióticos y químicos (14) y la invasión de patógenos constituyen las mayores fuentes exógenas de ROS (6).

A nivel celular la mitocondria representa el principal generador de ROS endógeno producto de las reacciones de transferencia de electrones (15). El ROS generado a nivel mitocondrial aparece como co-producto del fenómeno de fosforilación oxidativa que ocurre en la cadena transportadora de electrones (principalmente en el complejo III-Ubiquinol/Citocromo c oxido-reductasa (16) y se estima que aproximadamente entre el 1 al 2% de oxígeno consumido es convertido en ROS, específicamente radical superóxido (6).

En el citosol, la xantina oxidasa participa en la producción de $O_2^{\cdot-}$ (8), y en el retículo endoplasmático liso, enzimas que participan en la detoxificación de drogas liposolubles como el citocromo p450 y las enzimas de la familia b5 pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos, reduciendo oxígeno molecular para producir radical superóxido (17)

Otro organelo involucrado en la producción de ROS es el peroxisoma, principalmente H_2O_2 (18). Las oxidasas asociadas a membrana plasmática, principalmente NADPH oxidasa fagocítica es otra importante fuente de oxidantes(19). NADPH oxidasa utiliza NADPH como dador de electrones para generar radical superóxido desde el oxígeno molecular (6). Además la autoxidación de pequeñas moléculas como la dopamina, epinefrina, flavinas, e hidroquinonas pueden generar radical superóxido (15)

1.5. Sistemas antioxidantes

La síntesis de ROS es un proceso constante e inevitable. Por ello, existen sistemas de defensas antioxidantes desarrollados por la célula y el organismo entero para contrarrestarlos (20). Las defensas antioxidantes son de naturaleza no enzimática y enzimática. Este último sistema lo constituyen enzimas antioxidantes tales como la glutatión peroxidasa, que utiliza glutatión reducido como dador de electrones para eliminar peróxidos como H_2O_2 y peróxidos orgánicos (ROOH)(6). La catalasa, que se

encarga de eliminar H_2O_2 evitando su daño directo y su rol como fuente de otras especies dañinas (20), y una tercera enzima, la superóxido dismutasa que participa en la eliminación de $O_2^{\cdot-}$ mediante su dismutación hacia H_2O_2 , tanto a nivel citoplasmático como a nivel de la matriz mitocondrial manteniendo niveles estacionarios muy bajos la concentración de radical superóxido. (8)

Gracias a la existencia de estos mecanismos antioxidantes, la célula mantiene un adecuado equilibrio redox, controlando la presencia de ambos, prooxidantes y antioxidantes. El balance entre ambos es finamente regulado y es extremadamente importante para mantener la homeostasis del sistema. Un incremento de la actividad prooxidante sobre la capacidad del antioxidante es definido como **estrés oxidativo** y esta condición puede conducir al daño oxidativo (21). Las causas del estrés oxidativo son múltiples pero en términos generales se producen por disminución de los sistemas de defensa, un aumento de las especies prooxidantes, o ambos factores a la vez.

Hay antecedentes que indican que las células tumorales presentan defensas antioxidantes deficientes, lo cual las hace vulnerables al daño provocado por estrés oxidativo. De manera que compuestos capaces de generar ROS intracelular podrían poseer una importante propiedad que puede ser utilizada en terapias antineoplásicas.

1.6. Especies reactivas de oxígeno como una señal celular

Si bien es cierto durante muchos años se pensó que ROS eran solo elementos tóxicos y dañinos, hoy en día se sabe que también tienen gran importancia en la señalización celular (5). Por ejemplo, los ROS generados en la mitocondria están involucrados en la señalización del proceso proapoptótico (24, 25, 31). Así, drogas anticancerígenas que gatillan la apoptosis en células tumorales podrían provocar este fenómeno a través de la activación dependiente de ROS de la vía MAPK - ERK1/2 (26). El estrés oxidativo provocado durante la apoptosis mediada por TNF- α es otra de las evidencias que fortalecen este punto (27).

De esta manera ROS podría ser considerado como un mediador de la apoptosis celular y no solo como la fuente de daño del DNA, lípidos y proteínas

Además evidencias indican que diferentes vías transduccionales pueden utilizar ROS como mensajeros para activar factores transcripcionales como AP-1 y NF-KB induciendo la expresión de genes (28).

Una importante enzima que participa activamente en los fenómenos de inflamación y que recientemente se le han atribuido un importante rol en el crecimiento celular y carcinogénesis es la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Su expresión esta regulada por la unión de NF-KB y AP-1 en su sitio promotor/enhancer. De manera que ROS pueden actuar como segundos mensajeros capaces de modificar la expresión de COX-2 (28). Se ha observado que en líneas de células tumorales sometidas a radiación se genera un aumento de ROS, provocando una sobre expresión de COX-2 (29)

1.7. Ciclooxigenasa 2

La ciclooxigenasa-2 es una enzima bifuncional que cataliza los 2 primeros pasos de la vía que conduce a la formación de Prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX), llamadas ciclooxigenación y peroxidación. COX-2 cicla y adhiere $2O_2$ al ácido araquidónico para formar PGG_2 (producto inestable), y también reduce PGG_2 a PGH_2 . Esta prostaglandina H_2 es el precursor para la biosíntesis, catalizada por enzimas específicas, de Tromboxanos A_2 (TXA₂), Prostaclina (PGI_2) y otras prostaglandinas PGD_2 , PGE_2 , PGF_2 . (30) (Figura N°3).

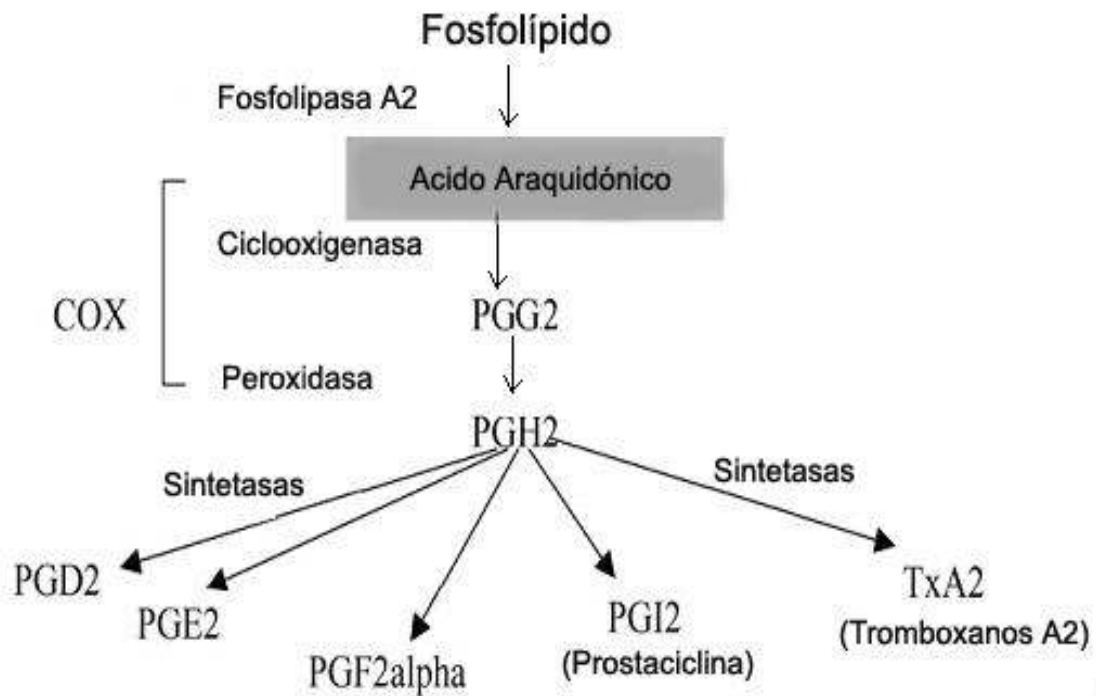


Figura N°3: Reacción catalizada por las ciclooxygenasas: En respuesta a un estímulo se activan las fosfolipasas A₂ y hidrolizan el ácido araquidónico de los fosfolípidos en la membrana. Este es convertido en PGH₂ mediante la ciclooxygenasa. PGH₂ es el precursor de varios prostanoideos (44).

La COX-2 es la isoforma inducible de la COX y es indetectable en la mayoría de los tejidos. Sin embargo esta expresión inducible se hace constitutiva en una variedad de cánceres, como el de colon, mamario, pulmonar, próstata, Testicular, pancreático y de piel (32, 33, 34, 35, 36).

Hay estudios que han concluido que la expresión de COX-2 es suficiente para generar tumorigénesis en glándulas mamarias de ratones transgénicos (37).

Numerosos antecedentes han sugerido una importante función de la COX-2 en el inicio y progresión del cáncer. Por ejemplo, se ha observado que la COX-2 o uno de sus productos PGE₂ inhiben la apoptosis celular (38, 39, 40). PGE₂ también puede activar el receptor de crecimiento epidermal (EGFR) promoviendo el crecimiento del

tumor (41) e inhibir la producción de citoquinas regulatorias provocando una disminución de la vigilancia inmune contra el tumor (44). La COX-2 también aumenta la angiogénesis (42,43), incrementa la adhesión de células tumorales a la matriz extracelular (44) y aumenta la expresión de metaloproteinasas aumentando la penetración a tejidos y metástasis (45). Es por ello que drogas antiinflamatorias inhibidores de ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) no esteroideas (NSAIDs), reducen en un 40 al 50% la incidencia de algunos cáncer (38).

Todos estos antecedentes muestran la importancia que tienen ROS y COX-2 en las célula tumorales, por lo tanto el análisis de compuestos que provoquen una modificación en estos parámetro podría sustentar una actividad susceptible de ser aprovechada para fines terapéuticos contra el cáncer. Por ello en esta memoria se estudió el potencial efecto antitumoral de los nitrosoderivados centrados en cambios en la viabilidad celular debido a alteraciones a nivel de ROS y de la actividad de COX-2. Por otro lado, considerando la importancia de las células natural killer (NK) como mecanismo de defensa antitumoral, se abordó el estudio de la ACNK por acción de los nitrosocompuestos. Las células natural killer corresponden a una subpoblación de linfocitos que forman parte de la inmunidad celular innata. Ellas se caracterizan por reconocer las células tumorales de manera no restringida a MHC no necesitando capacitación previa (47). De esta manera, es evidente la importancia que compuestos con potencial antitumoral no disminuyan la actividad de este trascendental mecanismo defensivo.

Por ello, tomando en consideración esta información se postuló la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Los compuestos nitrosos aril DHP poseen una acción antineoplásica debido a la inducción de estrés oxidativo y/o inhibición de de COX -2.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar la acción de los nitroso aril derivados sobre la viabilidad de las células y su correlación con la generación de ROS, la expresión de COX-2 y la ACNK.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de compuestos nitroso aril derivados sobre la viabilidad celular de las líneas de células tumorales U937, K562 y RAW, y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes normales.
2. Medir la generación de ROS en células K562 y PBMC por acción de nitrosoderivados.
3. Evaluar el efecto de nitroso aril dihidropiridinas sobre la expresión de COX-2 en células RAW
4. Evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad de las células NK.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Reactivos:

Compuestos m-nitroso isopropil DPH, p-nitroso isopropil DPH, m-nitroso isometil DHP sintetizados en el laboratorio de Bioelectroquímica del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

SIGMA: Reactivo de Bradford para medición de proteínas, Lipopolisacarido desde *Escherichia coli* Serotipo 0111:84, Anticuerpo anti-actina, Anticuerpo secundario anti-rabbit.

PROMEGA: Kit para ensayo de proliferación celular no radioactivo Cell Titer 96 AQ Ueous.

MOLECULAR PROBES: Reactivo de detección de especies reactivas de Oxígeno 5-(and -6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA).

BIORAD: Anticuerpo anti COX-2. Anticuerpos secundarios anti-Mouse.

MÉTODOS

1. Obtención de Células Mononucleares de Sangre periférica (PBMC)

Muestras de sangre periférica de donantes normales se obtuvieron del Banco de Sangre del Hospital San José. La sangre se diluyó en solución buffer fosfato salina (PBS) y se depositó cuidadosamente sobre Ficoll Histopaque- 1077. Dos volúmenes de sangre sobre uno de Ficoll Histopaque- 1077 fueron centrifugados a 1500 rpm por 30 minutos. La interfase que corresponde a células mononucleares fue colectada, lavada con PBS y centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm.

Las células mononucleares se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal de bovino (SFB), 2 mM de glutamina y 50 ug/ml de gentamicina-Estreptomicina en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C.

2. Cultivos de Líneas celulares

Líneas de células tumorales, monocitos humanos (U937), Eritroleucemia humana (K562) y macrófagos de ratón (RAW) fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB, 2 mM de glutamina y antibióticos (50 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de Estreptomicina) (Medio completo) en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y a una temperatura de 37 °C.

3. Ensayo de viabilidad celular con MTS

Para los experimentos de viabilidad celular se incubaron células U937 (2000 células/pocillo), K562 (3000 células/pocillo), RAW (3000 células/pocillo) y células mononucleares (1×10^6 células/pocillo) en placas de 96 pocillo de fondo plano. A cada pocillo se agregaron diferentes concentraciones de nitrosocompuestos con el objetivo de medir su efecto sobre la viabilidad de las células. Los nitrosocompuestos fueron disueltos en DMSO y la concentración final del solvente en el medio de cultivo fue menor al 1% (v/v).

La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante el reactivo [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS). El reactivo MTS es convertido en formazan soluble mediante la acción de deshidrogenasas presentes en células metabólicamente activas. Así, la cantidad de formazan medido por absorbancia a 490nm es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo (49). Las placas se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% durante 2 horas y se midió su absorbancia a 490nm en un lector de ELISA.

4. Detección de Especies reactivas de Oxígeno

Para la medición de los niveles ROS intracelular se utilizó la detección del reactivo marcador 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorohidrofluoresceína diacetato (CM-H₂ DCFDA) mediante Citometría de flujo, usando un citómetro de flujo Becton Dickinson. La DCFH se oxida al reaccionar con ROS generando el producto fluorescente diclorofluoresceína (DCF). La detección de este producto fluorescente se realiza a través de Citometría de flujo y la intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional a la magnitud del estrés oxidativo en la célula (50).

Células K562 y PBMC fueron lavadas con HEPES dos veces. Una vez lavadas y centrifugadas, se resuspendieron en HEPES y se agregó el reactivo marcador CM-H₂ DCFDA durante 30 minutos a 37 ° C y protegidas de la luz. Finalmente las células se lavaron 2 veces por centrifugación con HEPES a 1500 rpm para eliminar el marcador no incorporado a la célula. Las células marcadas se resuspendieron en HEPES.

El ensayo se realizó sometiendo a las células marcadas a diferentes concentraciones de nitrosos aril DHP, manteniéndolas a 37 ° C y protegidas de la luz durante 2 horas. La fluorescencia fue medida mediante Citometría de flujo.

5. Determinación de expresión de Ciclooxygenasa-2 (COX-2) mediante inmunowestern Blot

Células de la línea celular RAW (1×10^6 células/ml) fueron incubadas en medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal de bovino en presencia y ausencia de nitrosocompuestos y LPS de acuerdo a las condiciones experimentales durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación las células RAW se lavaron 2 veces con PBS frío y se centrifugaron a 5000 rpm por 1 minuto. Las células fueron homogenizadas en 100 μ l de buffer RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1mM de Ortovanadato de sodio activado, 1% NP-40 y 0,25 % de desoxicolato de sodio) que contenía inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 1 μ g/ml de apoproteína, leupeptina y pepstatina).

Luego, por medio del método de Bradford, se cuantificaron las proteínas totales de cada muestra. Posteriormente, 35 μ g de proteínas fueron diluidas con buffer de carga y separadas mediante SDS-PAGE en un gel al 10%. Finalizada la separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 70 minutos en buffer de transferencia (TRIS 48 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20 %) a 110 Volt constantes. Luego la nitrocelulosa fue bloqueada con solución de PBS con leche descremada al 5 % durante 30 minutos. Posteriormente la nitrocelulosa fue incubada con anticuerpo primario anti cox-2 (1:250) (para la visualización de COX-2) y anti-actina (1:3000) (para la visualización de actina) durante toda la noche, en agitación y a 4°C. Finalizada la incubación con el primer anticuerpo, las membranas de nitrocelulosas se lavaron tres veces con PBS y Tween al 0,01% (PBS-T), y se incubaron con anticuerpo secundario anti-mouse para anti-COX2 y anti-rabbit para anti-actina durante 1 hora y a temperatura ambiente. Finalmente las membranas se revelaron usando un Kit de quimioluminiscencia (Biological industries). Finalmente la cuantificación de ambas proteínas se realizó mediante el análisis densitométrico utilizando el programa UN-SCAN-IT (USI).

6. Medición de la actividad citotóxica de células Natural Killer (ACNK)

La determinación de ACNK se realizó mediante ensayos de Citotoxicidad cuantificando el ^{51}Cr liberado desde blancos celulares de células Natural Killer. La célula blanco utilizada fue la línea celular K562 que corresponde a una Eritroleucemia humana.

El ensayo se llevó a cabo incubando $1,5 \times 10^6$ células K562 en medio completo en presencia $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (100 uCi/ml) durante 2 horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y a 37°C . Luego las células marcadas se lavaron 3 veces con PBS para eliminar el ^{51}Cr no incorporado. Las células K562 marcadas fueron resuspendidas en 30 ml de medio completo quedando en una concentración final de 5000 células/ml.

Como las células NK representan el 10 a 15 % de las PBMC, el ensayo se realizó incubando dos relaciones de PBMC:células K562 (30:1 y 50:1 respectivamente) en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo. Las células PBMC fueron previamente incubadas con 0,1 y 1 μM de Nitrosocompuestos durante 24 horas.

La placa de 96 pocillos se centrifugó durante 5 minutos y luego se incubó durante 4 horas en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a 37°C . Finalmente, la placa se centrifugó durante 10 minutos y se extrajo una alícuota de 100 μl del sobrenadante para determinar el ^{51}Cr liberado por la lisis de las células K562 en un contador Gamma PACKARD.

Para la determinación de la actividad citotóxica de las células NK fue necesario medir las cuentas por minuto (cpm) de lisis total (Lt) que se obtiene sometiendo a células K562 radiomarcadas a la acción de tritón x100 y las cpm de la lisis espontánea (Le) determinada al agregar a las células K562 solo medio de cultivo. La actividad citotóxica se expreso como el % de actividad citotóxica, según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ actividad} = (X - \text{Le}) / \text{Lt} \times 100$$

X = cpm de muestra

III. RESULTADOS

1. Efectos de nitrosos aril DHP sobre la viabilidad celular de las líneas de células tumorales U937, K562, RAW y PBMC obtenidas desde pacientes normales.

Se evaluó el efecto del NC3, NC4 y NC7 sobre la viabilidad de líneas de células tumorales y PBMC. Para ello las células se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB con concentraciones crecientes de nitrosos aril dihidropiridinas (0.1, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 μM) durante 72 horas.

Para la determinación de la viabilidad se utilizó el compuesto MTS.

La figura N°4 muestra que los compuestos afectan la viabilidad de las células tumorales de manera dosis dependiente. En las células U937 se observó una sensibilidad a los nitrosocompuestos a partir de concentraciones menores a 10 μM , y en concentraciones de 50 μM la viabilidad no supero el 2%. Tanto NC3 y NC4 tienen un efecto citotóxico similar en U937, mientras que NC7 muestra una citotoxicidad levemente superior en altas concentraciones.

La citotoxicidad es levemente inferior en células K562. Esta línea celular también presentan sensibilidad a concentraciones menores de 10 μM de nitrosoderivados y la viabilidad de las células al someterlas a la concentración de 50 μM no superó el 20 %. Nuevamente se observa una mayor sensibilidad a concentraciones altas de NC7. Por su parte, la línea celular RAW presenta mayor resistencia a concentraciones bajas de NC3 y NC4, pero experimentan una violenta caída en su viabilidad al cultivarlas con concentraciones de nitrosocompuestos mayores de 10 μM .

Mientras que las células tumorales manifiestan una clara sensibilidad a los nitrosocompuestos, PBMC muestran mayor tolerancia (Figura N°5). Los nitrosocompuestos NC3 y NC4 solo tienen un efecto citotóxico sobre PBMC a concentraciones mayores de 10 μM , y a 50 μM la viabilidad de PBMC sobrepasa los

55%. Los valores de IC_{50} obtenidos del análisis de viabilidad celular muestran que PBMC presenta resistencia al efecto citotóxico de los nitrosocompuestos y, además el efecto parcialmente selectivo de estos nitrosoderivados sobre las células tumorales (Tabla N°1).

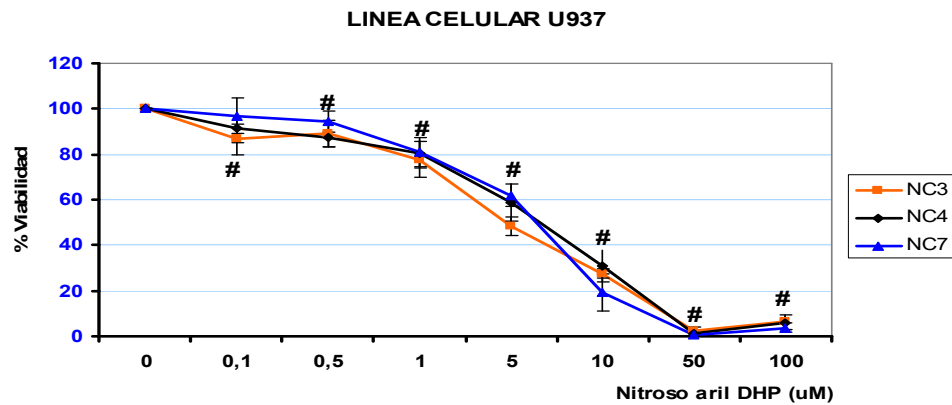
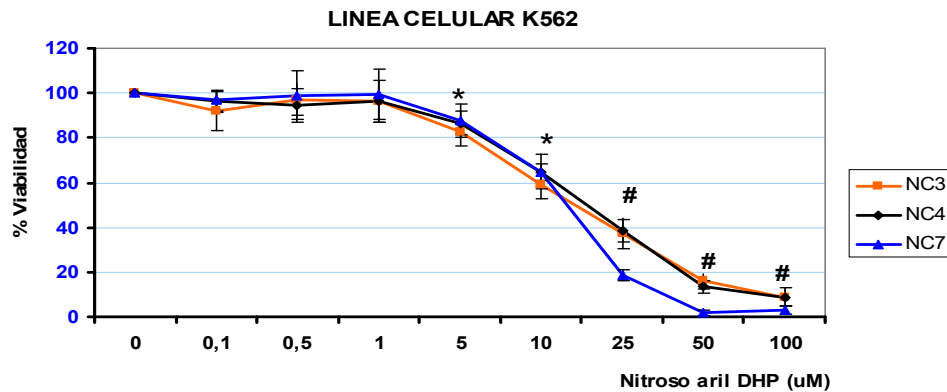
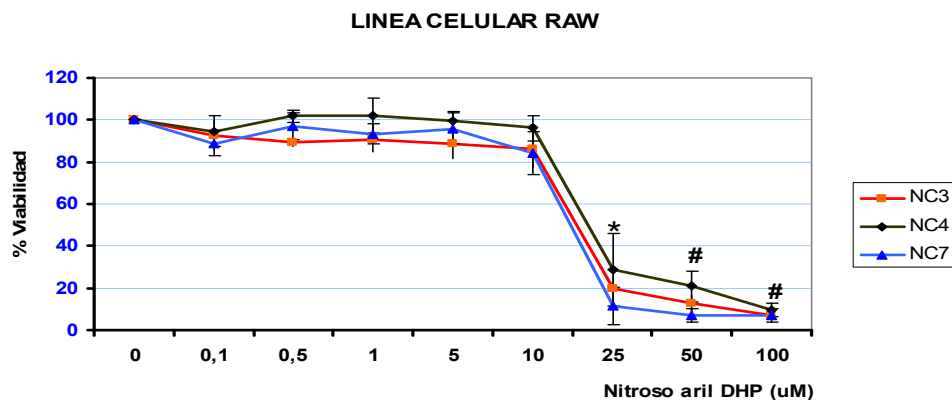
A**B****C**

Figura N° 4. Efecto de Nitrosos aril DHP sobre la viabilidad de líneas de células tumorales. Concentraciones de nitrosocompuestos que varían entre 0,1 a 100 μM fueron agregadas a cultivos de células. **(A)** Viabilidad de células U937, **(B)** Viabilidad de células K562 y **(C)** Viabilidad de células RAW incubadas con nitrosocompuestos durante 72 horas. La viabilidad de las células fue medida con el ensayo de MTS. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar. * $p < 0.05$; # $p < 5 \cdot 10^{-5}$ respecto al control con DMSO.

Células mononucleares de Sangre periférica (PBMC)

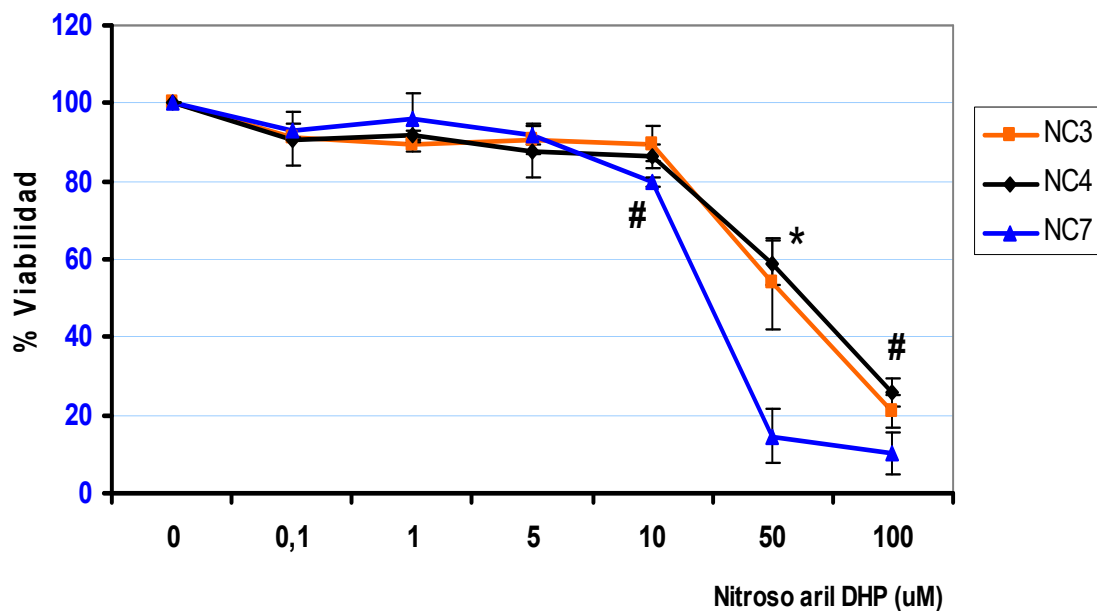


Figura N° 5. Efecto de Nitrosos aril DHP sobre la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica. PBMC cultivadas durante 72 horas con diferentes concentraciones de nitroso compuestos. La viabilidad de las células fue medida con el ensayo de MTS. Los datos corresponden al promedio de 3 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar. * $p < 0.05$; # $p < 5 \times 10^{-5}$ respecto al valor control que contiene DMSO.

Tabla N° 1. IC₅₀ de Nitrosocompuestos. El cuadro indica los valores de IC₅₀ de cada nitrosocompuesto para las 3 líneas celulares tumorales y PBMC, obtenidos de los resultados de viabilidad celular.

Compuestos	U937 (µM)	K562 (µM)	RAW (µM)	PBMC (µM)
IC₅₀ NC3	4,75	17,02	16,68	55,54
IC₅₀ NC4	5,99	18,13	19,18	60,66
IC₅₀ NC7	5,16	13,15	14,54	43,92

2. Efectos de nitrosos aril DHP sobre la generación de ROS en la línea celular tumoral K562.

Teniendo en cuenta que la disminución de la viabilidad celular podría estar relacionada con la generación de ROS se midió el efecto de los nitrosocompuestos sobre la generación de especies reactivas de oxígeno en células K562 marcadas con CM-H₂ DCFDA. Los resultados indican que a 2 horas de incubación a partir de 10 µM se genera un estrés oxidativo en las células K562 (figura N°6). Se observa que los niveles de ROS se incrementan a medida que aumenta la concentración de nitrosocompuestos, a excepción de NC7 que provoca una leve caída de los niveles de ROS en 50 µM. A la concentración de 50 µM los compuestos provocan un aumento en los niveles de ROS de aproximadamente 23 veces, 18 veces y 7 veces por sobre el valor control para NC3, NC4 y NC7 respectivamente.

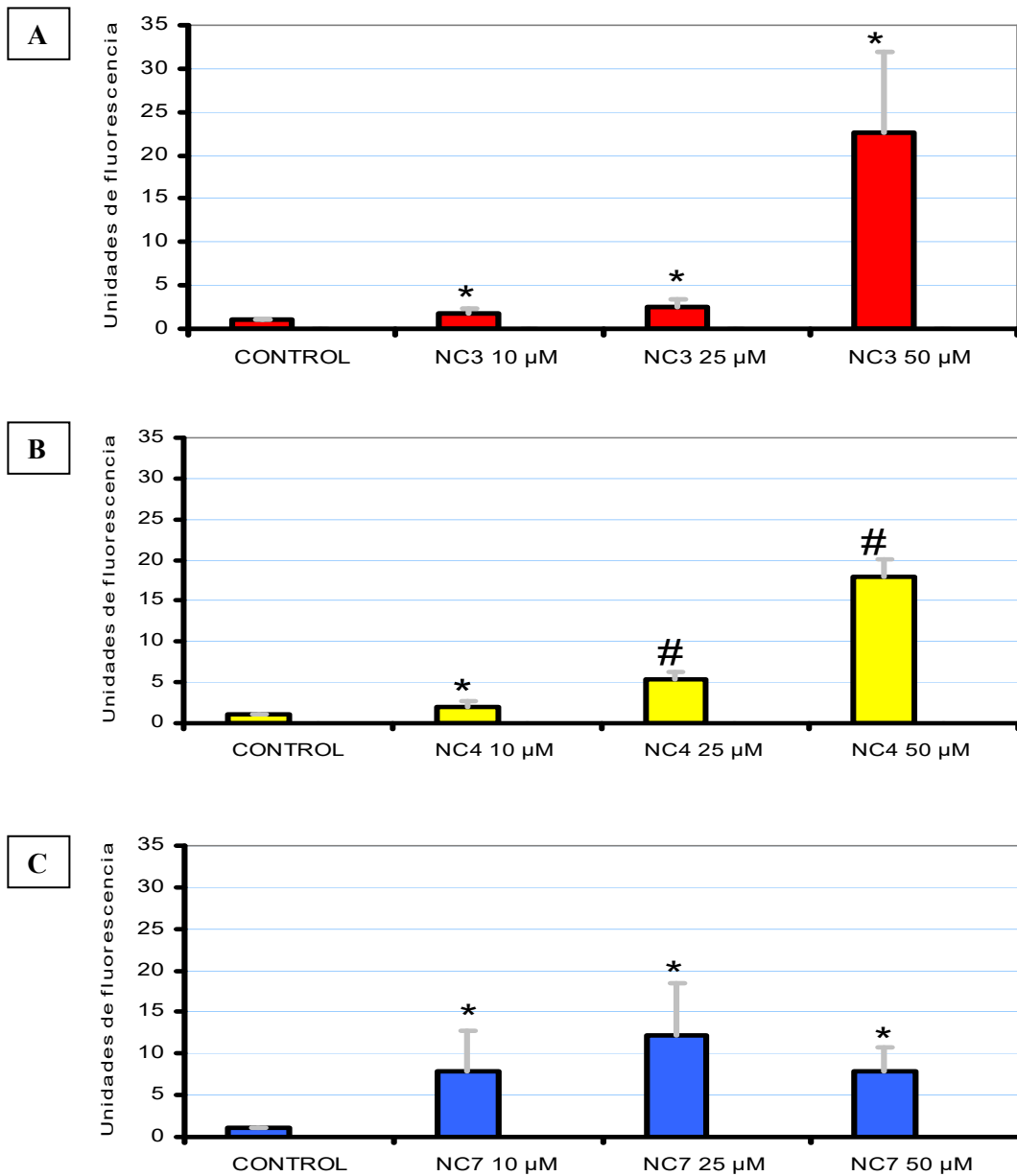


Figura N°6: Efectos de nitrosos aril DHP sobre la generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS) en la línea celular tumoral K562. Células K562 fueron expuestas a concentraciones de 10, 25 y 50 μM de (A)NC3, (B)NC4 y (C)NC7, durante 2 horas. Se observa generación de ROS a partir de 10 μM . También se midieron concentraciones menores a 10 μM sin observarse producción de ROS. La generación de especies reactivas de oxígeno fue medida por Citometría de flujo utilizando el marcador CM-H₂ DCFDA. Los datos fueron normalizados a los valores del control. El control contenía DMSO ya que fue utilizado para disolver los nitrosocompuestos. Los datos presentados corresponden al promedio de 4 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar. * $p < 0.05$; # $p < 0.005$ respecto al valor control.

3 Efectos de nitrosos aril DHP sobre la generación de ROS en PBMC.

Células mononucleares de sangre periférica obtenidas de donantes normales fueron marcadas con CM-H₂ DCFDA y mantenidas en HEPES con concentraciones crecientes de nitrosos aril dihidropiridinas (1, 5, 10, 25 y 50 µM) durante 2 horas y a 37 ° C.

En la figura N°7 se puede apreciar que en dos horas de incubación con los compuestos el nivel de ROS generado en concentraciones de 25 y 50 µM es claramente inferior que los generados en células tumorales.

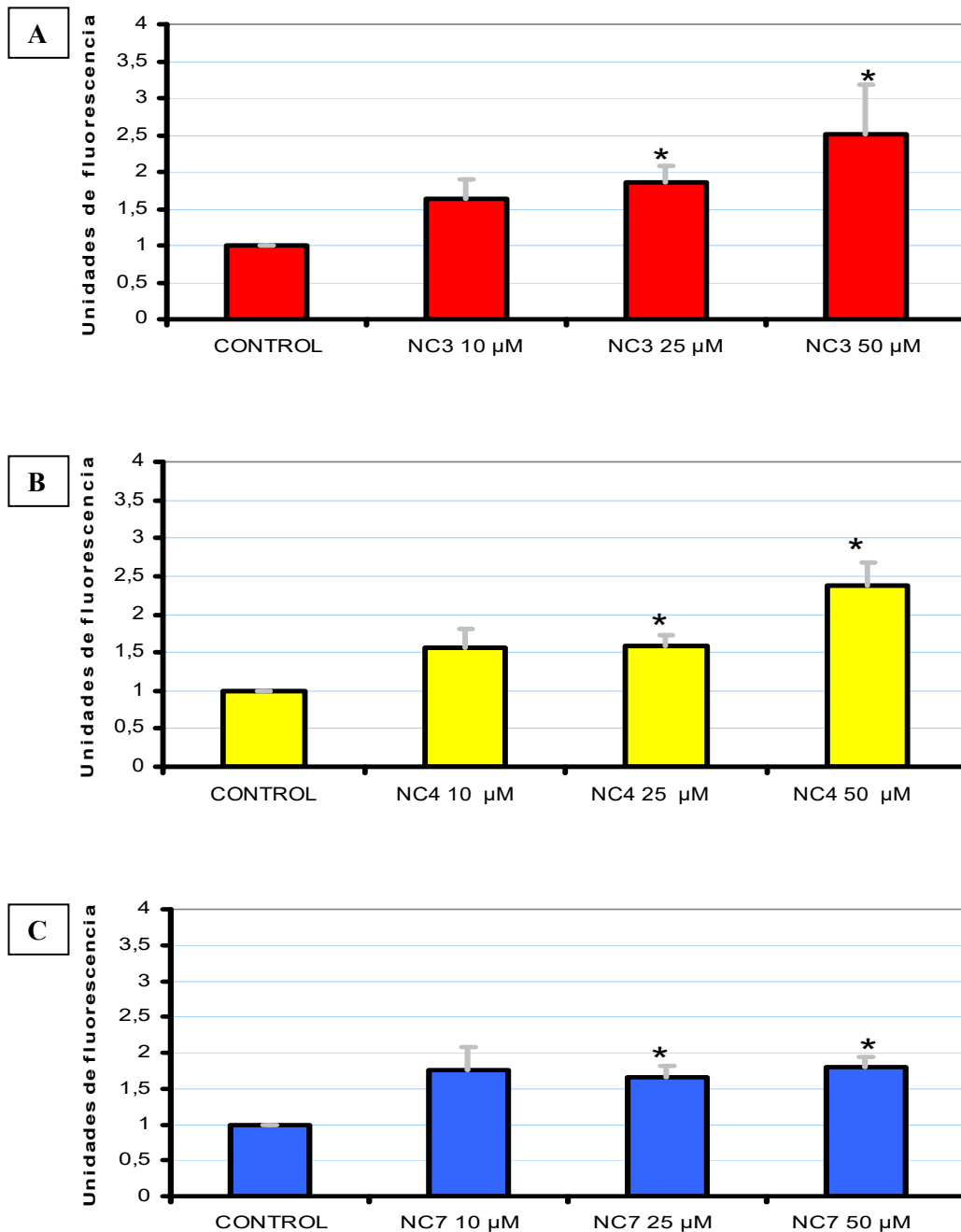


Figura N°7: Efectos de nitrosos aril DHP sobre la generación de ROS en PBMC.

Células mononucleares fueron expuestas a concentraciones de nitrosocompuestos de 10, 25 y 50 μ M de (A)NC3, (B)NC4 y (C)NC7, durante 2 horas. Los datos muestran una menor generación de ROS comparados con el provocado en células tumorales. La generación de especies reactivas de Oxígeno fue medida por Citometría de flujo utilizando el marcador CM-H₂DCFDA. Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar. * p < 0.05 respecto al valor control.

4. Efecto de nitrosos aril DHP sobre expresión de COX-2

Dado el hecho que COX-2 participa en el crecimiento de células tumorales se evaluó el efecto de los nitrosoderivados sobre la expresión de COX-2. Para ello se indujo la expresión de COX-2 con lipopolisacárido (LPS)

En la figura N°8 se muestra el efecto de NC3 sobre la expresión de COX-2 inducido por LPS. Los resultados indican que NC3 inhibe la expresión de COX-2 de manera dependiente de la concentración. y a 10 μM se observa una disminución del 46 % de la expresión. El nitrosocompuesto NC4 inhibe la expresión de COX-2 en 25 y 71 % en concentraciones de 1 y 10 μM respectivamente (figura N°9).

Los resultados presentados en la figura N°10 muestran que NC7 también provoca una disminución en la expresión de COX-2 en un 88% a 10 μM del nitrosocompuesto.

Los aumentos que se observan en las concentraciones de 0,1 μM tanto para NC3 como NC4 son estadísticamente no significativos.

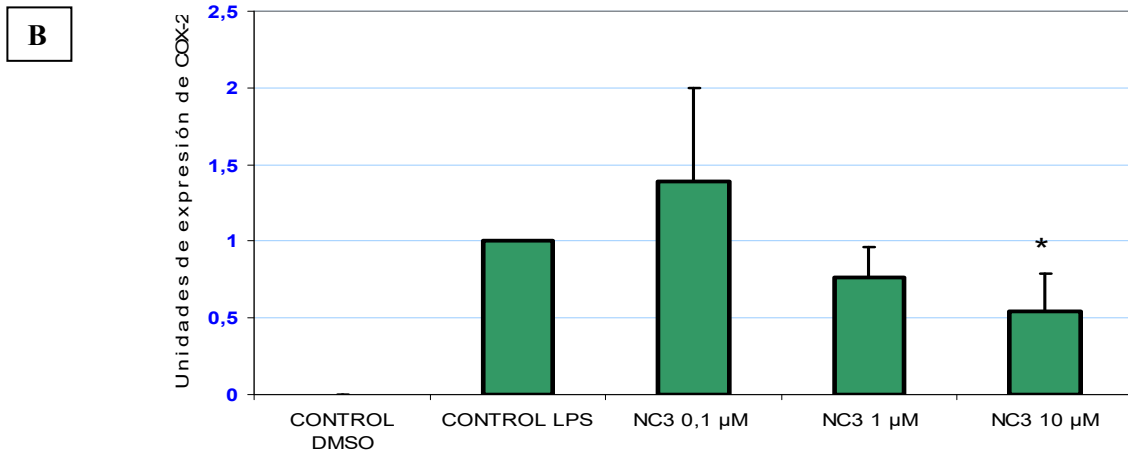
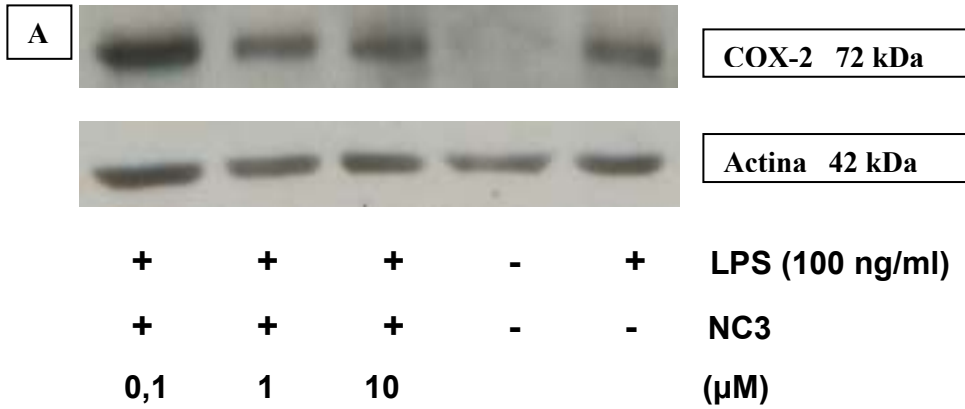


Figura N°8. Efecto de NC3 sobre expresión de COX-2. Células RAW incubadas con 0.1, 1, 10 μ M de m-nitroso isopropil DHP y 100 ng/ml de LPS durante 24 horas. **(A)** Inmunowestern Blot representativo de 3 experimentos independientes. **(B)** Valores obtenidos de la relación COX-2/ Actina y corresponden al promedio de 3 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar. * $p < 0.05$ respecto al control que contiene DMSO ya que fue utilizado para disolver los nitrosocompuestos.

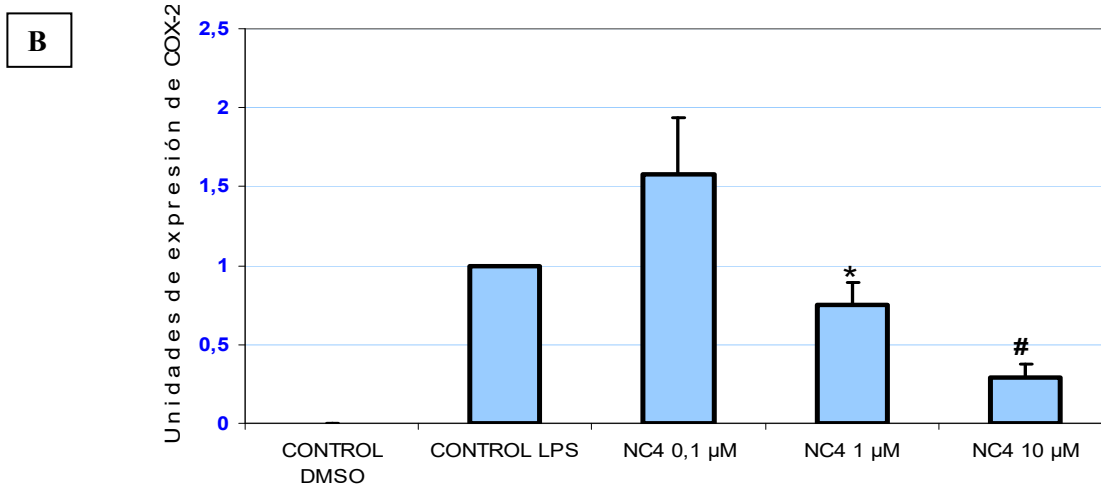
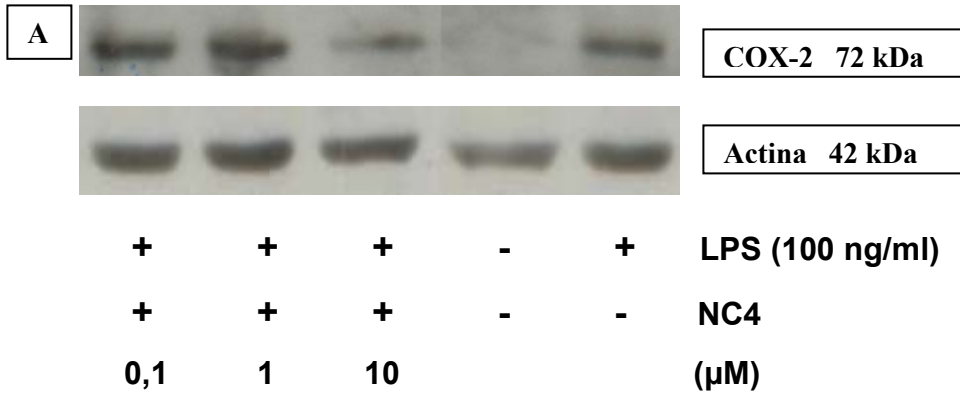


Figura N°9. Efecto de NC4 sobre expresión de COX-2. Células RAW incubadas con 0.1, 1, 10 μM de p-nitroso isopropil DHP y 100 ng/ml de LPS durante 24 horas. **(A)** Inmunowestern Blot representativo de 3 experimentos independientes. **(B)** Valores obtenidos de la relación COX-2/ Actina y corresponden al promedio de 3 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar. * $p < 0.05$; # $p < 0.0005$ respecto al control que contiene DMSO ya que fue utilizado para disolver los nitrosocompuestos.

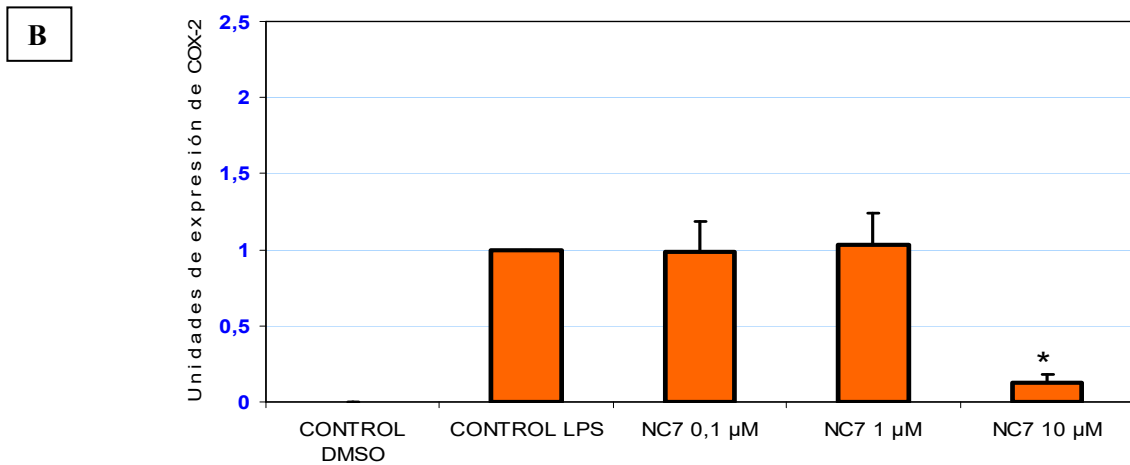
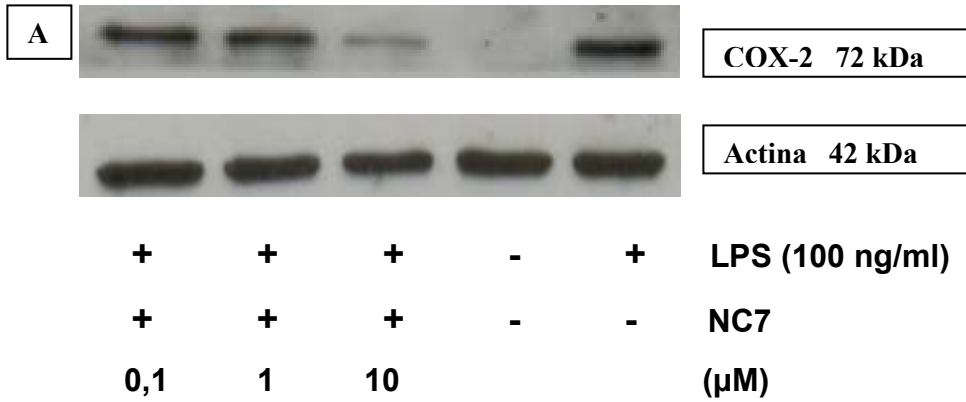


Figura N°10: Efecto de NC7 sobre expresión de COX-2. Células RAW incubadas con 0.1, 1, 10 μM de m-nitroso isometil DHP y 100 ng/ml de LPS durante 24 horas. **(A)** Inmunowestern Blot representativo de 3 experimentos independientes. **(B)** Valores obtenidos de la relación COX-2/ Actina y corresponden al promedio de 3 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar. *p < 0.05 respecto al control que contiene DMSO ya que fue utilizado para disolver los nitrosocompuestos.

5. Efecto de nitrosos aril DHP sobre la actividad citotóxica de células Natural Killer (ACNK).

Las células natural killer, comprenden a una subpoblación de linfocitos que se caracterizan por lisar espontáneamente células tumorales, constituyéndose así una importante herramienta defensiva del sistema inmune. Por ello es importante evaluar si los nitrosocompuestos tendrían un efecto sobre este importante componente de defensa antitumoral.

En las figuras N° 11, 12 y 13 se observa que al incubar PBMC durante 24 horas con concentraciones de 0,1 y 1 μ M de nitrosos aril dihidropiridinas no hay una modificación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) del ACNK con respecto a la actividad lítica de PBMC en ausencia de nitrosocompuestos.

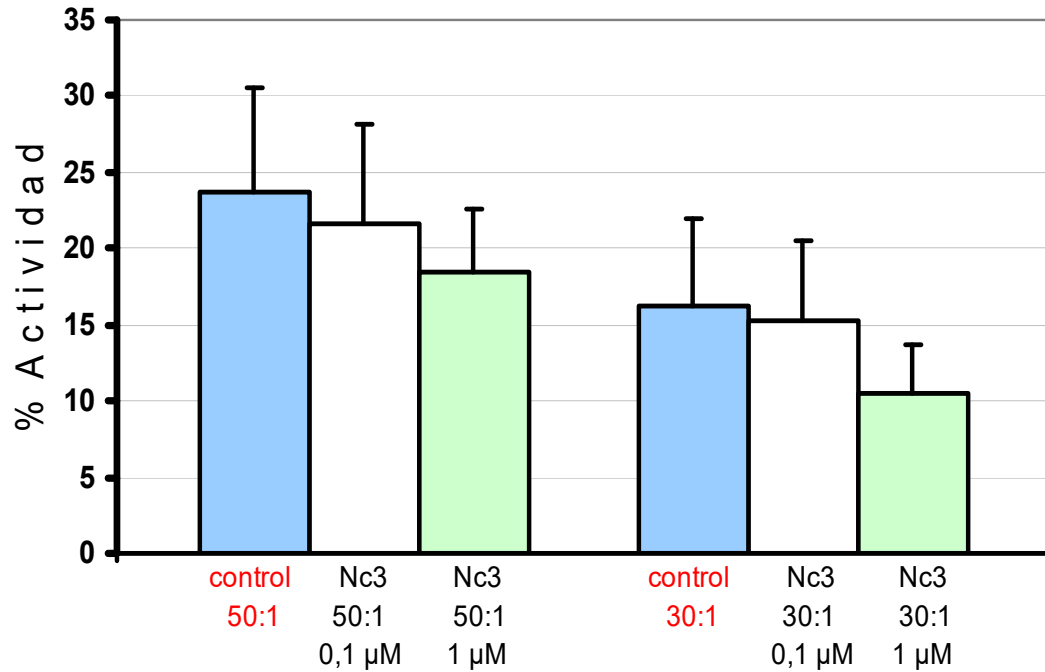


Figura N°11. Efecto de NC3 sobre la ACNK. Células Natural Killer tratadas con 0,1 y 1 μ M de NC3 fueron incubadas con células K562 radiomarcadas en 2 relaciones 50:1 y 30:1(NK:K562). Los resultados se presentan como el % de actividad citotóxica de las células NK. ($p > 0.05$) de ACNK por efecto de NC3. Los datos corresponden al promedio de 6 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar.

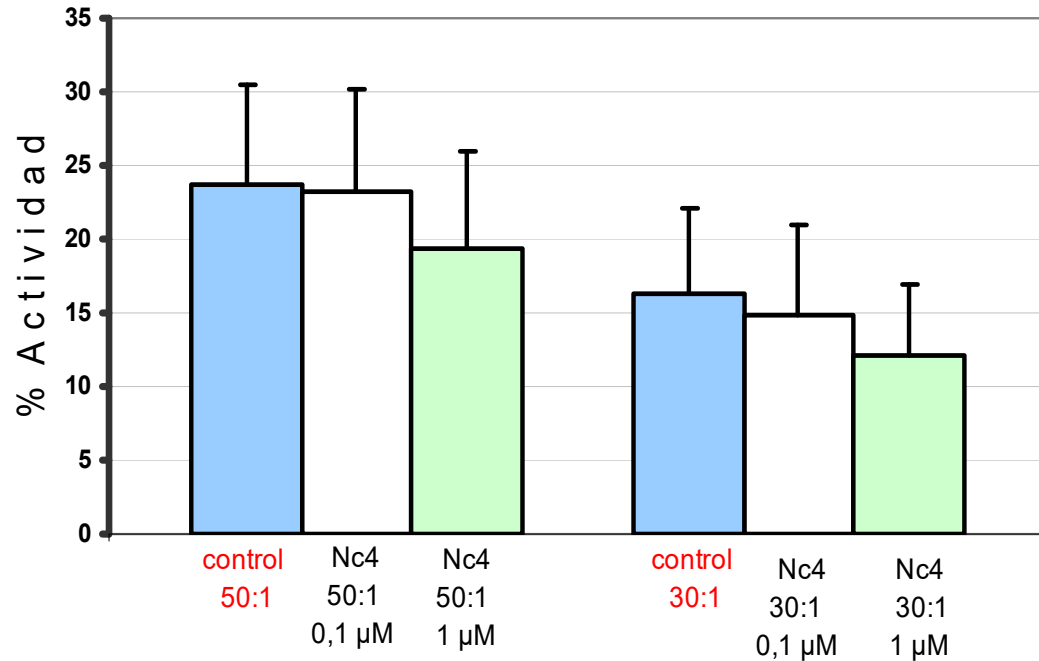


Figura N°12: Efecto de NC4 sobre la ACNK. Células Natural Killer tratadas con 0,1 y 1 μM de NC4 fueron incubadas con células K562 radiomarcadas en 2 relaciones 50:1 y 30:1(NK:K562). Los resultados se presentan como el % de actividad citotóxica de las células NK. ($p > 0.05$) de ACNK por efecto de NC4. Los datos corresponden al promedio de 6 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar.

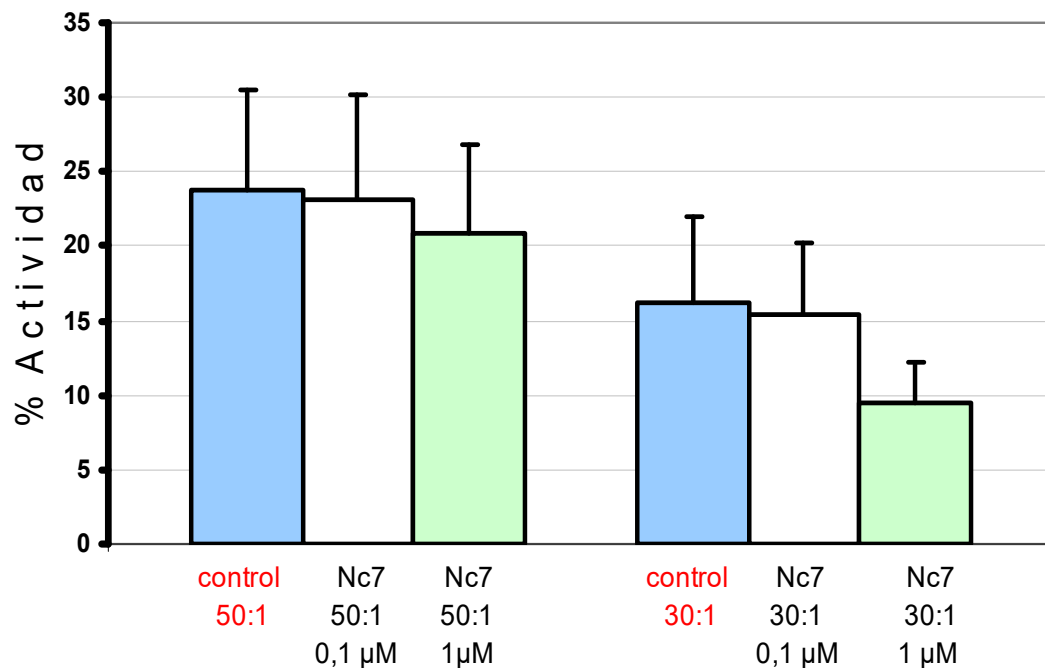


Figura N°13: Efecto de NC7 sobre la ACNK. Células Natural Killer tratadas con 0,1 y 1 μM de NC7 fueron incubadas con células K562 radiomarcadas en 2 relaciones 50:1 y 30:1(NK:K562). Los resultados se presentan como el % de actividad citotóxica de las células NK. ($p > 0.05$) de ACNK por efecto de NC7. Los datos corresponden al promedio de 6 experimentos independientes y sus respectivos errores estándar.

IV. DISCUSIÓN

Fármacos capaces de generar un efecto citotóxico sobre células tumorales en forma específica sin afectar a células normales son el sueño del alquimista dedicado a la investigación antitumoral. Uno de los grandes problemas de la quimioterapia es su poca selectividad provocando serios efectos secundarios. Muchos son los blancos biológicos mediante los cuales los fármacos pueden afectar la viabilidad celular. Por ejemplo, bloquear la biosíntesis de macromoléculas vitales, afectar la generación de energía o provocar el daño estructural de organelos o citoesqueleto. Sin embargo la mayoría de los procesos bioquímicos o estructuras celulares son las mismas en células normales y tumorales, de manera que identificar blancos o procesos de alta sensibilidad en células tumorales sería muy valioso en quimioterapia. Una estrategia diferente pero que persigue el mismo fin, es modificar procesos o inhibir moléculas que favorezcan la génesis, crecimiento o desarrollo del tumor. Es así como drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs), que inhiben la actividad de Ciclooxygenasas, son utilizadas para reducir la incidencia de varios cáncer (38).

Por otro lado la intervención a nivel de procesos de oxido reducción podría ser de gran utilidad ya que la célula tumoral posee menor defensa antioxidante. Fármacos que provoquen una modificación en este parámetro pueden resultar una interesante herramienta terapéutica que gatille la muerte celular producto del daño oxidativo o por apoptosis provocado por un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS).

En la literatura se presentan diversos compuestos con efectos tóxicos sobre células tumorales, como los derivados de Benzo[b]thiophenesulphonamide (BTS) 1,1-dioxide, que inducen sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y apoptosis en células tumorales (51), y aceites naturales y alfa-humulano que generan la muerte de células tumorales aparentemente por producción de ROS (52).

Diferentes nitrosoderivados, el m-nitroso isopropil Dihidropiridina (NC3), p-nitroso isopropil Dihidropiridina (NC4) y m-nitroso isometil dihidropiridina (NC7) mostraron, a través de reacciones electroquímicas en la interfase electrodo-solución, que actuaban formando intermediarios REDOX activos los cuales al reaccionar con oxígeno molecular generaban ROS. ROS en cantidades que sobrepasan a las normales son fuertemente dañinas para la célula ya que reaccionan con macromoléculas generando daños estructurales irreversibles y provocando la muerte celular. Considerando estos antecedentes se evaluó el impacto citotóxico del NC3, NC4 y NC7 sobre las líneas de células tumorales K562, RAW y U937, y PBMC obtenidas de donantes normales. Los resultados indicaron que las células tumorales experimentaron una disminución en su viabilidad de manera dosis dependiente luego de 72 horas de incubación con los nitrosocompuestos (figura N°4). Sorprendentemente PBMC mostraron mayor resistencia al efecto citotóxico (figura N°5). Al comparar los valores de IC₅₀ se observan que son significativamente menores para las células tumorales en comparación a PBMC (tabla N°1).

De esta manera resultó interesante evaluar si la disminución de viabilidad celular se correlacionar con generación de ROS. Los resultados obtenidos indicaron que en la línea tumoral K562 se generó un fuerte estrés oxidativo luego de 2 dos horas de incubación con los tres nitrosocompuestos (figura N°6), lo cual estaría de acuerdo a lo observado en el estudios electroquímico de estos compuestos.

Por otro lado, en células mononucleares de sangre periférica, sorpresivamente, se observaron niveles de ROS notoriamente más bajos luego de la incubación durante 2 horas con los nitrosocompuestos. La magnitud de la nitrosoreducción de los compuestos *in vitro* o los mecanismos antioxidantes presentes en PBMC podrían entregar una posible explicación a este punto.

Es importante destacar que el compuesto CM-H₂ DCFDA utilizado para detectar la generación de especies reactivas de oxígeno carece de especificidad, por lo tanto no nos permiten determinar las especies pro oxidante específicas, pero si nos da una idea bastante confiable de los cambios generales en el estado REDOX de la célula.

Hay que recordar que el estrés oxidativo, que se define como un incremento de la actividad prooxidante sobre la capacidad antioxidante, puede generarse ya sea por disminución de los sistemas de defensa o por un aumento de las especies prooxidantes. Conocida la estructura de los nitrosocompuestos y su mecanismo de acción, es poco probable que el estrés generado *in vitro* se deba a un efecto sobre la capacidad antioxidante celular. De manera que la causa más probable del estrés oxidativo en células K562 sea un fuerte aumento en la generación de ROS.

Un requisito para la actividad REDOX de los nitrosocompuestos es su reducción generando el intermediario radical nitroso. Esto posiblemente ocurriría gracias a la acción de enzimas oxido-reductasas presentes en la célula. Con los resultados obtenidos en el trabajo no es posible precisar la enzima o enzimas involucradas, ni tampoco si dicha nitrosorreducción ocurriría en el citosol o en algún organelo, como el retículo endoplasmático encargado de la biotransformación de fármacos.

Los resultados de viabilidad celular son consistentes con los obtenidos desde el análisis de la generación de ROS en células K562 y PBMC. Es probable que la muerte celular generada por los nitrosocompuestos en células K562 sea debida al fuerte estrés oxidativo, y la muerte provocada en las otras líneas de células tumorales sea debida al mismo fenómeno. La mayor resistencia a los nitrosocompuestos y el menor estrés oxidativo observado en PBMC es un dato que potencia este punto. Por otro lado, NC7 muestra la mayor citotoxicidad tanto para células tumorales como PBMC, sin embargo, los análisis de generación de ROS en esta últimas mostraron niveles levemente bajos (figura N°7). Esta observación abre la posibilidad de que otro mecanismo participe en la disminución de la viabilidad celular.

Estudios previos han demostrado que la adhesión exógena de H₂O₂ puede inducir apoptosis o necrosis dependiendo de la concentración de H₂O₂ o el tipo de célula. La apoptosis ocurriría a niveles bajos de estos agentes, mientras que la necrosis se generaría por altos niveles (46). Esto abre la posibilidad que mecanismos apoptóticos, también pueden estar involucrados en la muerte observada en PBMC. Mientras que en células tumorales los altos niveles de ROS provocarían principalmente serios daños a

macromoléculas y una violenta muerte por necrosis. Un paso adicional de nuestro estudio podría ser evaluar la generación de H_2O_2 viendo si la catalasa disminuye la señal oxidativa.

Es conocido que COX-2 y su principal producto, la PGE_2 , son importantes moléculas que participan en el fenómeno de tumorigénesis. De manera que fármacos que inhiban COX-2 tendrían potencialmente una propiedad que puede ser aprovechada en terapias antitumorales. Los resultados de la expresión de COX-2 obtenidos en este trabajo, muestran que en concentraciones de 10 μM el NC3, NC4 y NC7 generan una inhibición de la expresión de COX-2 inducida por LPS, en un 46, 71 y 88 % respectivamente. Estos resultados reforzarían la actividad antineoplásica observada en los experimentos de viabilidad. Es importante señalar que con los experimentos realizados no es posible precisar las causas y los niveles a los cuales se produce la inhibición de la enzima.

En la literatura se ha señalado que un aumento de ROS provoca un aumento en la expresión de COX-2 (28, 29). En nuestros resultados la disminución de la expresión de COX-2 la hemos observado en concentraciones de nitrosocompuestos que provocan la generación de ROS en las células K562, pero no evaluamos si en células RAW las concentraciones analizadas gatillaban un estrés oxidativo. Sin embargo sabemos que no afectan a la viabilidad de las células RAW, de manera que es probable que a concentraciones 10 μM no se generen niveles significativos de ROS en estas células.

Por otro lado, una importante defensa que posee el organismo contra células tumorales es el llevado a cabo por las células NK. Las células NK corresponden a una subpoblación de linfocitos que forman parte de la inmunidad celular innata.

Antecedentes indicarían que ROS como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo provocan una inhibición sobre la actividad citotóxica de las Natural killer (48). De esta manera se evaluó el efecto de los nitrosocompuestos sobre la actividad citotóxica de células Natural Killer. Los resultados mostraron que el NC3, NC4 y NC7 en concentraciones fisiológicas no provocan un efecto estadísticamente

significativo sobre la ACNK (figura N° 11, 12 y 13). Este resultado sin dudas es bastante relevante ya que de esta manera los nitrosocompuestos no alterarían la respuesta natural que posee el organismo contra las células tumorales.

Resumiendo podemos decir que los compuestos m-nitroso isopropil Dihidropiridina, p-nitroso isopropil Dihidropiridina y m-nitroso isometil dihidropiridina afectan la viabilidad celular, siendo las células tumorales analizadas mas sensibles que PBMC. Los IC₅₀ en los experimentos de viabilidad muestran una clara susceptibilidad de las células tumorales por los nitrosocompuestos, señalando una actividad antineoplásica bastante selectiva. Esta muerte puede ser debida a estrés oxidativo. Las causas de este fenómeno no es posible precisarlas en este trabajo pero estudios posteriores pueden contribuir a identificarlas. Las posibles explicaciones de esto podrían ser: a) Las defensas antioxidantes de PBMC permiten contrarrestar el estrés Oxidativo generado por los nitrosocompuestos o, b) Existen diferencias en el mecanismo de reducción de los nitrosocompuestos *in vitro* en las células tumorales K562 y PBMC.

Un interesante experimento que podría complementar estos estudios y dar una mejor explicación de la muerte celular generada por los nitrosocompuestos seria utilizar antioxidantes como DTT o Vitamina D, y de esta manera evaluar como se modifica la viabilidad de las células. Además de utilizar otras células tumorales para comprobar si el efecto de los nitrosocompuestos es más amplio o si está circunscrito a células de origen hematopoiético.

Estos resultados, indican que los nitrosocompuestos poseen una actividad antitumoral y por ello apoyan estudios adicionales para definir el potencial uso de estos compuestos como terapia complementaria en el tratamiento del cáncer.

V. CONCLUSIÓN

- Los nitroso aril DHP disminuyen la viabilidad de células tumorales K562, U937 y RAW. La disminución de la viabilidad en las células mononucleares de sangre periférica fue inferior. Por lo tanto, los nitrosocompuestos mostraron un mayor efecto citotóxico sobre células tumorales
- Los nitrosocompuestos NC3, NC4 y NC7 generaron un fuerte estrés oxidativo en células tumorales K562. En cambio provocan un mínimo aumento de ROS en células mononucleares de sangre periférica donadas por pacientes normales en las mismas concentraciones y tiempos estudiados.
- Los nitroso aril DHP inhiben la expresión de COX-2 inducida por LPS en macrófagos de la línea celular RAW
- Los nitroso aril DHP no afectan la actividad citotóxica de células NK de PBMC en las concentraciones y tiempos estudiados

VI. REFERENCIAS

1. Nuñez-Vergara, L. J., Squella, J.A., Aldunate, J., Letelier, M. E., Bollo, S., Repetto, Y., Morillo, A., Spencer, P. L, (1997). Nitro Radical Anion formation from Nifurtimox, Part I: Biological Evidences in *Tripanosoma Cruzi*. *Bioelectrochem & Bioenerg*, 43: 151-155.
2. Nuñez-Vergara, L. J, Santander, P., Navarrete-Encina, P. A, Squella, J.A, (2005). Electrochemical reduction of C-4 nitrosophenyl 1,4-dihydropyridines and their parent C-4 nitrophenyl derivatives in protic media. *Journal of electroanalytical chemistry*, 580: 135-144
3. Wardman, P, (1985). Some reactions and properties of nitro radical-anions important in biology and medicine. *Environmental Health Perspectives*, 64: 309-320
4. Knowles, R. G ., Moncada, S, (1994). Nitric oxide syntetases in mamales,. *Biochemical Journal*, 298: 249-258
5. Thannickal, V. J., Fanburg, B.L, (2000). Reactive Oxygen species in cell signalling. *The American Journal Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279: 1005-1028
6. Kohen, R., Abraham, A, (2002). Oxidation of biological Ststem, Oxidative Stress Phenomena, Antioxidant, Redox Reactions, and Methods for their Quantification. *Toxicologic pathology*, 30: 620-650
7. Massey, V, (1994). Activation of Molecular Oxygen by Flavins and Flavoproteins. *The Journal of biological chemistry*, 269: 22459-22462
8. Kappus, H, (1985). Lipid peroxidation: mecanisms, analysis, anzymology and biological relevance, in oxidative stress. Editado por H. Sies, academic press inc, London, 273-310
9. Piña-Garza E, (1996). Los radicales libres:beneficios y problemas. *Gaceta médica de México*, 132: 183-200
10. Ikeda, Y., Long, D. M, (1990). The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*, 27: 1-11.
11. Pentland, A.P, (1994). Active oxygen mechanisms of UV in ammatation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 366: 87-97.

12. Koren, H. S, (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environmental Health Perspectives*, 103: 235-242.
13. Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N., Kondo, M., (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal. *Digestive diseases and sciences*, 43: 30S-34S.
14. Elsayed, N.M., Omaye, S.T., Klain, G.J., Korte, D.W Jr, (1992). Free radical mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sul. de after subcutaneous injection. *Toxicology*, 72: 153-165.
15. Freeman, B.A., Crapo, J.D, (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*, 47: 412-426.
16. turrens, J. F., Alexandre, A., Lehninger, L, (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria, *Archives. Biochemistry and Biophysics*, 237: 408-414
17. Aust, S.D., Roerig., D.L., Pederson, T.C, (1972). Evidence for superoxide generation by NADPH-cytochrome c reductase of rat liver microsomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 47: 1133-1137.
18. Boveris, A., Oshino, N., Chance, B, (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*, 128: 617-630
19. Babior, B.M, (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93: 1464–1476
20. Fernandes, V., Videla, L. A, (1996). Biochemical aspects of cellular antioxidant system. *Biological Research*, 29: 177-182.
21. Hrbac, J., Kohen, R, (2000). Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implication for health and disease. *Drug Development Research*, 50: 516-527.
22. Buffinton, G., Doe, W, (1995). Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 19: 911-918
23. Rodriguez, R., Redman, R, (2005). Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 3175-3176

24. Han, H., Long, H., Wang, H., Wang, J., Zhang, Y., Wang, Z, (2004). Progressive Apoptotic Cell Death Triggered by Transient Oxidative Insult in H9c2 Rat Ventricular Cells: A Novel Pattern of Apoptosis and the Mechanisms. *American Journal Physiology Heart Circulatory Physiology*, 286: 2169-2182
25. Fleury, C., Mignotte, B., Vayssiere, J.L, (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84: 131-41
26. Schweyer, S., Soruri, A., Heintze, A., Radzun, H.J., Fayyazi, A, (2004). The role of reactive oxygen species in cisplatin-induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines. *International Journal Oncology*; 25: 1671-1676
27. Sidoti-de Fraise, C., Rincheval, V., Risler, Y., Mignotte, B., Vayssiere, J.L, (1998). TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene*, 17: 1639-1651
28. Gulam, W., Aleem, S, (2005). Hepatitis C Virus Stimulates the Expression of Cyclooxygenase-2 via Oxidative Stress: Role of Prostaglandin E₂ in RNA Replication. *Journal of Virology*, 79: 9725-9734
29. Li, L., Steinauer, K.K., Dirks, A.J., Husbeck, B., Gibbs, I., Knox, S.J, (2003). Radiation-induced cyclooxygenase 2 up-regulation is dependent on redox status in prostate cancer cells. *Radiation Research*. 160: 617-21.
30. Bakhle, Y.S, (2001). COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. *British Journal of Pharmacology*, 134: 1137-1150
31. Simizu, S., Takada, M., Umezawa, K., Imoto, M, (1998). Requirement of Caspase-3(-like) Protease-mediated Hydrogen Peroxide Production for Apoptosis Induced by Various Anticancer Drugs. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 26900-26907
32. Soslow, R.A., Dannenberg, A.J., Rush, D., Woerner, B.M., Khan, K.N., Masferrer, J., Koki, A.T, (2000). COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer*, 89: 2637-2645.
33. Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R.L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., Hla, T, (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Research*, 55: 3785-3789

34. Tucker, O.N., Dannenberg, A.J., Yang, E.K., Zhang, F., Teng, L., Daly, J.M., Soslow, R.A., Masferrer, J.L., Woerner, B.M., Koki, A.T., Fahey, T.J, (1999). Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Research.*, 59: 987-990.
35. Yoshimura, R., Sano, H., Masuda, C., Kawamura, M., Tsubouchi, Y., Chargui, J., Yoshimura, N., Hla, T., Wada, S,(2000). Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer*, 89: 589-596
36. Hase, T., Yoshimura, R., Matsuyama, M., Kawahito, Y., Wada, S., Tsuchida, K., Sano, H., Nakatani, T, (2003). Cyclooxygenase-1 and -2 in human testicular tumours. *European Journal of Cancer*, 14: 2043-2049.
37. Liu, C.H., Chang, S.H., Narko, K., Trifan, O.C., Wu, M.T., Smith, E., Haudenschild, C., Lane, T.F., Hla, T, (2001). Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 18563-18569
38. Dempke, W., Rie, C., Grothey, A., Schmoll, H.J, (2001). Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 127: 411-417.
39. Sheng, H., Shao, J., Morrow, J.D., Beauchamp, R.D., DuBois, R.N, (1998). Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 58: 362-366.
40. Cao, Y., Pearman, A., Zimmerman, G., McIntyre, T., Prescott, S, (2000). Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis, *The Journal of Cell Biology*, 97: 11280-11285
41. Dannenberg, A.J., Lippman, S.M., Mann, J.R., Subbaramaiah, K., DuBois, R.N, (2005). Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *Journal of Clinical Oncology*, 2: 254-266.
42. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R.N,(1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93: 705-716.
43. Daniel, T., Liu, H., Morrow, J., Crews, B., Marnett, C, (1999). Thromboxane A₂ Is a Mediator of Cyclooxygenase-2-dependent Endothelial Migration and Angiogenesis. *Cancer Research*, 59: 4574-4577

44. M'eric, J.B., Rottey, S., Olausson, K., Soria, J.C., Rixe, K., Spano, J.P, (2006). Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Oncology/Hematology*, 59: 51-64
45. Tsujii, M., Kawano, K., DuBois, R, (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 94: 3336-3340
46. Lennon, S.V., Martin, S.J., Cotter, T.G, (1991). Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Proliferation*, 24: 203-214
47. Natarajan, K., Dimasi, N., Wang, J., Mariuzza, R., Margulies, D, (2002). Structure and function of natural killer cell receptors: Multiple Molecular Solutions to Self, Nonself Discrimination. *Annual Review of Immunology*, 20: 853-885
48. Mellqvist, U., Hansson, M., Brune, M., Dahlgren, C ., Hermodsson, S., Hellstrand, K, (2000). Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine. *Blood*, 96: 1961-1968
49. Berridge, M.V., Tan, A.S, (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303: 474-482.
50. Wan, S., Zhou, Z., Kennedy, A, (2003). Adaptation of the dichlorofluorescein assay for detection of radiation-induced oxidative stress in cultured cells. *Radiation Research*, 160: 622-630.
51. Encio, I., Morre, D.J., Villar, R., Gil, M.J., Martinez-Merino, V, (2005). Benzo[b]thiophenesulphonamide 1,1-dioxide derivatives inhibit tNOX activity in a redox state-dependent manner. *British Journal of Cancer*, 92: 690-695.
52. Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A., Madelmont, J.C, (2003). Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Medica*, 69: 402-407.

