
**APOPTOSIS POR TETRAHIDROQUINOLINAS
SUSTITUIDAS EN LA LÍNEA DE CÁNCER DE
PRÓSTATA INDEPENDIENTE DE ANDRÓGENOS
PC-3**

Mayora^{1,2} Adriana, Rojas³ Héctor, Chirino³ Perla, Sojo² Felipe,
Kouznetsov⁴ Vladimir, De Sanctis³ Juan B., Arvelo^{2,1} Francisco,
Benaim^{1,2} Gustavo

¹Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias (UCV)

²Instituto de Estudios Avanzados (IDEA)

³Instituto de Inmunología (UCV)

⁴Universidad Industrial de Santander, Colombia
adrianamayora@hotmail.com

Resumen

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizada por un crecimiento descontrolado celular y su fisiopatología comprende aberraciones en procesos que intervienen en el ciclo celular, entre ellas la evasión de la apoptosis. Las células de cáncer de próstata (PC) independientes de andrógenos (AI) se caracterizan por la evasión de la apoptosis, por lo que la capacidad de un compuesto para iniciar en células tumorales la apoptosis es una estrategia importante en el desarrollo de terapias. Las tetrahydroquinolinas sustituidas (THQs) conforman una clase de compuestos con amplio rango de actividad biológica, entre ellas, como agentes antitumorales. Esta investigación estudió el efecto de 5 THQ sustituidas (JS43, JS56, JS79, JS87 y JS92) en la inducción de la apoptosis en la línea celular de PC AI PC-3. Los valores de concentración inhibitoria (IC_{50}) para cada THQ fueron: 28 μ M (JS43), 28 μ M (JS56), 25 μ M (JS79), 26 μ M (JS87) y 7 μ M (JS92), determinados por el ensayo del MTT. Se encontró que las 5 THQs son capaces de inducir apoptosis, utilizando los métodos de citometría de flujo y microscopía confocal, la fragmentación del ADN nuclear por el Sistema DeadEND Fluorimetric TUNEL y la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática (MP) por la unión de Anexina V-FITC. Además se observó por microscopía de epifluorescencia la peroxidación de fosfolípidos de la MP por el Acido *cis*-parinámico. Estos resultados indican que estudios de THQs podrían llevar al desarrollo de un compuesto antitumoral.

Palabras clave: cáncer de próstata, apoptosis, tetrahydroquinolinas.

Introducción

En organismos multicelulares la dimensión de las poblaciones de células es determinada por la tasa de proliferación y muerte celular. Las células que ya no son necesarias o son una amenaza para el organismo son destruidas por el proceso del suicidio celular programado o apoptosis. En este proceso participan receptores, reguladores y efectores celulares. Entre sus etapas encontramos la fragmentación del ADN nuclear y la exposición de la fosfatidilserina en la MP, a fin de que los cuerpos apoptóticos sean eliminados por la maquinaria inmunológica del organismo, evitando una reacción inflamatoria. Cuando el sistema funciona mal, la acumulación de células puede resultar en algunas patologías, entre ellas, el cáncer.

El PC es una neoplasia maligna que se presenta usualmente en edades avanzadas cuya frecuencia se incrementa de forma rápida después de los 50 años. En la última década su incidencia ha aumentado dramáticamente, constituyendo ya la segunda causa de morbilidad por cáncer en hombres en los países occidentales. Este incremento se debe al aumento en la vida media de los hombres, así como a un mejor diagnóstico debido a la introducción de la prueba del antígeno prostático (PSA), [Jemal *et al.*, (2006)], que permite identificar clínicamente más casos tanto asintomáticos como en fases más tempranas de la enfermedad.

La incidencia de esta patología varía mundialmente; es mayor en los Estados Unidos, Canadá y Escandinavia y siendo baja en Asia (Crawford, 2003). La etiología real es desconocida, hasta ahora se considera multifactorial y los

factores de riesgo más estudiados son hormonales, sexuales y reproductivos, así como estilo de vida, ocupación, historia familiar y hábitos dietéticos. En Venezuela el PC a partir de 1990 ha mostrado un crecimiento rápido que lo ha llevado a la primera posición como causa de morbilidad y mortalidad por cáncer en los hombres. En lo que respecta a la tasa de mortalidad por PC en el quinquenio 2001-2005, el promedio nacional fue de 31 casos por cada 100.000 varones y la primera posición fue para el estado Trujillo, con una tasa de 44,9 casos; le sigue el estado Monagas con 42,1 casos y Guárico con 41,9 casos (Capote, 2006). Los pacientes con PC usualmente son tratados mediante el bloqueo androgénico, siendo la duración de la respuesta al tratamiento es de 12 a 18 meses, después del cual, de no haber remisión completa, el tumor puede progresar de nuevo y las opciones terapéuticas serán entonces escasas. Cuando se produce la castración, ya sea física o química, la célula inicialmente hormono-sensible experimenta un fenómeno de apoptosis, pero no todas las células que componen el tumor sufren este fenómeno. Algunas de ellas quedan silentes, mientras que otras continúan desarrollándose, debido a que se activan otras vías intracelulares que les permiten seguir dividiéndose y desarrollando el tumor *de novo* [McDonnell *et al.*, (2002)].

En los últimos años se ha intentado clasificar los tumores de próstata en función de la sensibilidad a los andrógenos y así tenemos: a) andrógeno-dependientes, que precisan de los andrógenos para seguir creciendo; b)

andrógeno-sensibles, que al eliminarse los andrógenos disminuyen su crecimiento, pero sus células no mueren; y, c) andrógeno-independientes, que crecen independientemente de la exposición o no a los andrógenos. Las células malignas de estos tumores, de no poderse controlar, serán las que en definitiva llevarán a la muerte de los pacientes (Mayora y Arvelo, 2011).

A pesar de los grandes avances realizados para determinar la génesis del PC, desde el punto de vista molecular, hasta el presente es poco lo que se conoce sobre su iniciación y desarrollo. La característica más distintiva del avance hacia el PC andrógeno-independiente, es el desarrollo de nuevos fenotipos resistentes a la apoptosis (Reed, 2003). Aunque la maquinaria necesaria para hacer que se lleve a cabo este fenómeno fundamental está presente en estas células, pero la incapacidad de sufrir muerte celular resulta de alteraciones moleculares en las vías de señalización de iniciación de la apoptosis o de los efectores iniciales [Plati *et al.*, (2008)]. Al ser el PC un problema prioritario en salud, un objetivo importante es desarrollar nuevos tratamientos que sean eficaces contra la población de células resistentes a hormonas, por lo tanto la capacidad de un compuesto para iniciar en células tumorales la apoptosis es una estrategia clave en el desarrollo de terapias. Las THQs conforman una clase de compuestos con amplio rango de actividades biológicas, entre ellas como agentes antitumorales (Khan, 2007).

Esta investigación tuvo como objetivo hacer una evaluación del efecto de algunas THQs en la inducción de la

apoptosis en la línea celular de PC AI PC-3. Para ello se seleccionaron cinco THQs sintetizadas [Kouznetsov *et al.*, (2010)] y mediante citometría de flujo, microscopia confocal y microscopia de epifluorescencia se determinó la aparición de distintos eventos de la apoptosis.

Materiales y Métodos

Síntesis de las Tetrahydroquinolinas sustituidas

Las series de THQs fueron sintetizadas a partir de un compuesto *trans*-Isougenol, aislado de plantas de Clavos de Olor (*Eugenia caryophyllata*) y Canela (*Cinamomum versum*), mediante reacciones de cicloadición imino Diels-Alder, obteniéndose isómeros estables y purificados por cromatografía. Los liofilizados fueron disueltos en DMSO, a concentraciones específicas para no excederse de 0,2 % del vehículo en cada ensayo. Las THQs fueron donadas por el Dr. Vladimir Kouznetsov para la realización de este estudio [Kouznetsov *et al.*, (2010); (Universidad Industrial de Santander, Colombia, (2010)].

Cultivo celular

La línea celular humana de PC AI PC-3 de la ATCC (American Type Culture Collection Manassas, VA USA) fue cultivada en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), y estreptomycin (10,000 U/ml), en un ambiente húmedo a 37°C y 5% de CO₂. Los fibroblastos dérmicos humanos fueron obtenidos a partir de cultivos primarios de explantes de tejidos de individuos sanos y mantenidos en las condiciones indicadas previamente. Un documento de consentimiento fue

obtenido de los donantes de fibroblastos (Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos, IDEA, 2012).

Ensayos de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de cada THQs se utilizó el ensayo de sobrevivencia celular, conocido como ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Mosmann, 1983), el cual consiste en la formación de cristales de formazan luego de la reducción de la sal de tetrazolio, MTT, por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. El procedimiento consistió en incubar 5.000 células sembradas en placas de elisa con distintas concentraciones del compuesto durante 24 horas en las condiciones previamente descritas. Así mismo, se realizaron los controles correspondientes. Luego del tratamiento las células fueron incubadas con 0,5 mg/mL de MTT durante 3 horas a 37 °C, posteriormente se retiró el sobrenadante y se incorporaron 100 µL de DMSO para disolver los cristales de formazan. La absorbancia fue medida en un lector de multi-detección de microplaca (Synergy HT, Bio-Tek) a 570 nm. El valor de la IC₅₀ fue definido por la concentración del compuesto que reduce a un 50 % la absorbancia con respecto a las células no tratadas (Laboratorio de Tumores y Cultivo de Tejidos, IBE, UCV, abril 2012).

Fragmentación del ADN nuclear

El efecto de las THQs en la fragmentación del ADN nuclear fue cuantificado por el kit TUNEL (TdT-mediated Utp Nick-End Labeling) de Promega (Promega, 2011). Las células sembradas (1.000.000 células) fueron tratadas durante 24

horas con cada una de las THQs con su respectivo IC₅₀ y estaurosporina 1µM como control positivo, para después ser marcada con el kit según las indicaciones del fabricante y el efecto fue determinado por citometría de flujo (Epics XL Beckman Coulter, FL; Instituto de Inmunología, UCV, mayo 2012).

Exposición de fosfatidilserina (PS) en la membrana plasmática

La exposición de PS en la MP fue registrado por el kit Annexin V-FITC de Miltenyi Biotec (Miltenyi biotec, 2011). Brevemente, las células sembradas (1.000.000 células) fueron tratadas durante 15 horas con cada una de las THQs con su respectivo IC₅₀ y estaurosporina 1µM como control positivo, para después ser marcada con el kit según el protocolo del fabricante y el efecto fue determinado por citometría de flujo (Epics XL Beckman Coulter, FL) y microscopía confocal (Instituto de Inmunología, UCV, junio 2012).

Tanto en la fragmentación del ADN nuclear como en la exposición de la fosfatidilserina el marcaje con el kit (verde) fue indicativo de apoptosis, mientras que el marcaje con yoduro de propidio (IP)(rojo) fue indicativo de apoptosis en estado avanzado o necrosis.

Peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática

El proceso de peroxidación de los fosfolípidos de la MP fue registrada por ácido cis-parinárico (Molecular Probes). Brevemente, las células sembradas (1.000.000 células) fueron tratadas durante 24 horas con cada una de las THQs con su respectivo IC₅₀ y estaurosporina 1µM como control

positivo, para después ser incubadas durante 1 hora con el ácido *cis*-parinámico (5 μ M), el efecto fue determinado por microscopía de fluorescencia a 320 nm [Fabisiak *et al.*, (2000), los análisis fueron realizados usando el programa de análisis de imágenes ImageJ 1.46 u (National Institute of Health. USA), (Instituto de Inmunología, UCV, julio 2012).

Resultados y Discusión

Ensayos de citotoxicidad

Los primeros ensayos realizados determinaron el efecto citotóxico de las THQs en las células PC-3 y fibroblastos por el ensayo de MTT. Los ensayos indicaron que las THQs disminuyeron la viabilidad de las células de manera dependiente de la dosis, con IC₅₀ en células PC-3 de 28 μ M (JS43), 28 μ M (JS56), 25 μ M (JS79), 26 μ M (JS87) y 7 μ M (JS92), mientras que en los fibroblastos humanos los IC₅₀ fueron de 93 μ M (JS43), 65 μ M (JS56), 34 μ M (JS79), 54 μ M (JS87) y 42 μ M (JS92). Se puede observar en todas las THQs presentan un IC₅₀ menor en la línea celular PC-3, lo cual indicaría

posiblemente un mayor efecto de estos compuestos en células cancerosas en comparación a células no cancerosas.

Fragmentación del ADN nuclear

La fragmentación del ADN nuclear es un proceso que se inicia desde la fase temprana de la apoptosis, siendo irreversible por lo cual se puede hacer una relación directa entre la proporción de células con ADN fragmentado con la viabilidad del cultivo, pero en fases avanzadas de la apoptosis la permeabilidad de la MP se incrementa y permite el marcaje con IP, por lo cual, cuando el cultivo presenta el doble marcaje se habla de fases avanzadas de la apoptosis, en cambio cuando solo se observa marcaje por IP se habla ya no de un proceso apoptótico sino de un proceso de necrosis. En la Figura 1 se puede observar el efecto de la IC₅₀ de JS79 y JS87 en la fragmentación del ADN nuclear, se observa una muerte celular de aproximadamente 50 % en cada caso, donde la mayor proporción de las células se encuentran en fase temprana de apoptosis, los resultados obtenidos con JS43, JS56 y JS92 indican la misma tendencia.

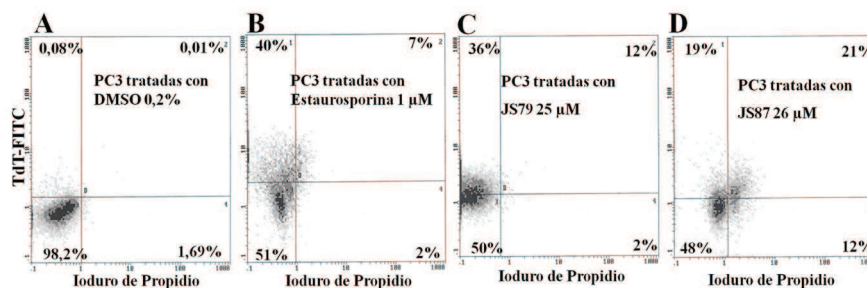


Figura 1. Fragmentación del ADN nuclear por efecto de Tetrahydroquinolinas sustituidas

La Figura 1A muestra un 98 % en la viabilidad de las células tratadas con el vehículo (control negativo), la Figura 1B muestra el efecto de la estaurosporina en las células (control positivo), se registra una fragmentación del ADN nuclear cercana al 50 %, lo cual es proporcional al estado de vida de las células tratadas, estando el 40 % de las células en apoptosis temprana; las Figuras 1C y 1D muestran el efecto de dos de las THQs JS79 y JS87, en ambos casos se observa una proporción de células sin marcaje del 50 %. Luego del tratamiento con JS79 se observa que la mayor proporción de las células afectadas están en apoptosis temprana, mientras que con JS87 existe una distribución uniforme entre apoptosis temprana y avanzada.

Exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática

La exposición de PS en la MP es uno de los primeros pasos en la apoptosis y el análisis es similar a lo observado al realizado en la fragmentación del ADN nuclear. En la Figura 2 se puede observar el efecto de el IC₅₀ de JS43 y JS92 en la PS en la MP, se ve que aproximadamente el 50 % tienen la PS en la cara externa de la MP, sin embargo, aun se observa integridad en la MP por lo cual es muy poco el marcaje con IP por lo que se puede afirmar que la mayor proporción de las células se encuentran en una fase temprana de la apoptosis, los resultados obtenidos con JS56, JS79 y JS87 indican la misma tendencia.

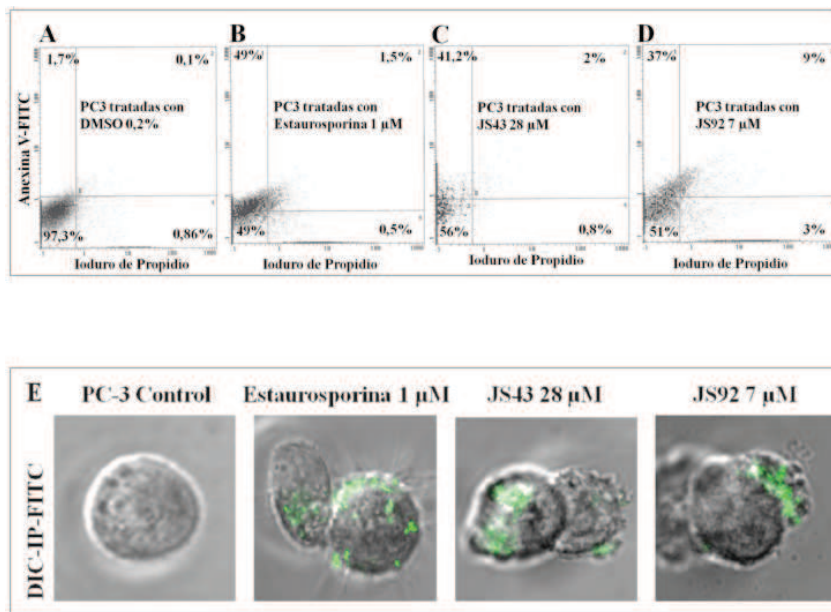


Figura 2. Exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática por efecto de tetrahidroquinolinas sustituidas

La Figura 2A indica la poca exposición de la PS en las células tratadas con el vehículo, se observa una viabilidad de 97 %; la Figura 2B muestra el efecto de la estaurosporina en las células (control positivo), se registra que el 50 % de las células ya tiene expuesta la PS, el 49 % de las células en apoptosis temprana; las Figuras 2C y 2D muestran el efecto de JS43 y JS92. En ambos casos se observa una exposición de PS cercana al 40 %, el tratamiento con JS92 mostró avanzar más rápidamente que los demás compuestos ya que un 9 % del cultivo celular ya estaba entrando a fases más avanzadas de la apoptosis. La Figura 2E muestra las imágenes obtenidas por microscopía confocal de las células previamente analizadas por citometría de

flujo, se observa la presencia de anexina V-Fitc en la MP de las células tratadas pero no en las células PC-3 control.

Peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática

La peroxidación de los fosfolípidos de la MP es un proceso que se observa cuando la célula está siendo afectada por algún citotóxico. En la Figura 3 se puede observar la magnitud de peroxidación de los fosfolípidos de la MP por efecto de las 5 THQs estudiadas así como de un control negativo (tratamiento con el vehículo) y de un control positivo (estaurosporina 1 μ M). En todos los casos se puede ver un efecto citotóxico muy significativo, observándose en mayor grado tras los tratamientos con JS87 y JS92.

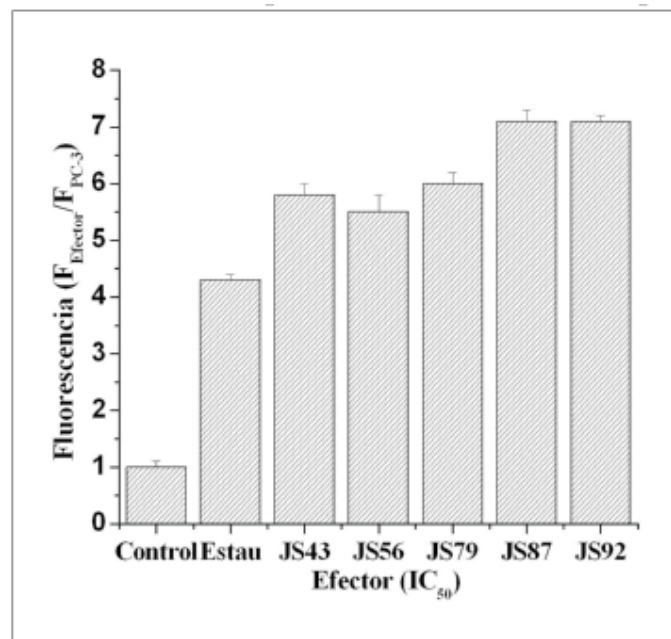


Figura 3. Peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática por efecto de Tetrahydroquinolinas sustituidas

La Figura 3 indica la poca peroxidación de las células tratadas con el vehículo y como este evento se ve incrementado significativamente (de 4 a 7 veces) al tratarse las células con estaurosporina o cualquiera de las THQs.

Desde los inicios de la humanidad, el hombre ha buscado paliativos a sus múltiples dolencias en la naturaleza (compuestos naturales); sin embargo éstos pueden tener efectos secundarios y además se consumen las fuentes naturales de estos compuestos. Actualmente, a fin de ver incrementada la eficiencia del efecto buscado y disminuir la destrucción de las fuentes, los compuestos son sintetizados y modificados en los laboratorios en un proceso conocido como funcionalización. Los compuestos estudiados en esta investigación son tetrahidroquinolinas sustituidas, sintetizadas a partir de un compuesto *trans*-Isougenol, aislado de plantas de Clavos de Olor (*Eugenia caryophyllata*) y Canela (*Cinamomum versus*) mediante reacciones de cicloadición imino Diels-Alder, a los cuales se le adicionaban grupos funcionales a fin de incrementar su eficiencia en las células.

Conclusiones

Los resultados obtenidos deben ser tomados en cuenta, MTT y peroxidación de los fosfolípidos de la MP, puesto que indican que las 5 THQs probadas, tienen un efecto citotóxico en las células estudiadas, y siendo este efecto citotóxico alcanzado en la línea cancerígena PC-3 a una menor concentración del compuesto, en comparación al registrado en la línea control de fibroblastos. Este hallazgo

aunque debe ser mejor determinado, genera indicios sobre compuestos que serían candidatos a estudios para una nueva quimioterapia. Los resultados obtenidos con los protocolos de fraccionamiento de ADN nuclear y exposición de PS en la MP nos indican que las 5 THQs inducen la muerte celular por apoptosis, lo cual es muy importante al momento de aplicar una quimioterapia, pues éste es un proceso fisiológico que evita la reacción inflamatoria dañina al organismo cada vez que una célula ha cumplido su ciclo o ha sido inducida a la muerte.

Estos resultados indican que estudios más profundos de las THQs podrían llevar al desarrollo de un compuesto antitumoral.

Agradecimiento

Esta investigación fue financiada con los recursos del Proyecto FONACIT G-2011000884, CDCH-UCV PG-03-8728-2013/1 a G.B. y la beca FONACIT para el desarrollo de Talento Humano de alto nivel a Adriana Mayora.

Referencias Bibliográficas

- Capote Negrin, L. (2006). Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev. Venez. Oncol.* 18: 269-281.
- Crawford, E. (2003). Epidemiology of prostate cancer. *Urology*: 62: 3-12.
- Fabisiak, J.P.; Tyurin, V.A.; Tyurina, Y.Y.; Sedlov, A.; Lazo, J.S.; Kagan, V.E. (2000). Nitric oxide dissociates lipid oxidation from apoptosis and phosphatidylserine externalization during oxidative stress. *Biochemistry*.

- 39(1):127-38.
- Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Murria, T.; Xu, J.; Smigal, C. (2006). Cancer statistics. *Cancer J: Clin.* 56: 106-130.
- Khan, M. (2007). Quinoline analogs as Antiangiogenic Agent and Telomerase Inhibitors. *Top. Heterocycl. Chem.* 11:213-229.
- Kouznetsov, V.; Merchan, A.; Arvelo, F.; Bello, J.; Sojo, F.; Muñoz, A. (2010). 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl Substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline Derivatives Obtained Through Imino Diels-Alder Reactions as Potential Antitumoral Agents. *Letters in Drug Design & Discovery.* 7:632-639.
- Mayora, A.; Arvelo, F. (2011). Cáncer de próstata y apoptosis. *Invest Clin.* 52: 376 -396.
- McDonnell, T.; Troncoso, P.; Brisbay, S. (1992). Expression of the protooncogen *bcl-2* in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 52: 6240-6244.
- Miltenyi Biotec. (2011), [en línea], de http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/363/MiltenyiBiotecDataSheet_Annexin-V-FITC-Kit_130-092-052.pdf.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 65: 55-63.
- Plati, J.; Bucur, O.; Khosravi-Far, R. (2008). Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem;* 104: 1124-1149.
- Promega. (2011), [en línea], de <http://www.promega.com/products/cell-health-assays/apoptosis/tunel-assays>.
- Reed, J. (2003). Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell.* 3: 17-22.