



UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

Facultad de Ciencias de la Salud

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE
LA SALUD

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL
ANTITUMORAL DE NUEVOS
DISELENIUROS EN LÍNEAS CELULARES
DE LEUCEMIA.**

Miren Lacasta Esain



UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA.

Facultad de Ciencias de la Salud.

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTITUMORAL DE NUEVOS DISELENIUROS EN LÍNEAS CELULARES DE LEUCEMIA.

Trabajo Fin de Máster presentado por Miren Lacasta Esain.

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y autorizo su presentación ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, septiembre de 2014.

Dr. Ignacio Encío Martínez.

RESUMEN.

El Selenio es un elemento traza esencial para la salud humana, habiendo numerosos estudios que relacionan bajos niveles de selenio en sangre con una mayor incidencia de varios tipos de cáncer. También es conocida su capacidad de inducir citotoxicidad e inhibición del crecimiento celular sobre líneas celulares tumorales. Es por ello que en el presente trabajo se ha evaluado la capacidad antitumoral de seis nuevos diseleniuros con urea sobre líneas celulares de leucemia. Se han obtenido valores aceptables de inhibición del crecimiento sobre la línea K-562 de leucemia mieloide aguda, especialmente han resultado efectivos los compuestos selenados MD-28 y MD-32. Por otro lado, se ha querido comprobar si estos compuestos ejercen su efecto a través de la inducción de apoptosis y del arresto del ciclo celular en alguna de sus fases. Para ello, se ha probado el compuesto MD-35 sobre la línea CCRF-CEM de leucemia linfoblástica aguda de células t. No se ha podido demostrar ni la inducción de apoptosis ni el arresto del ciclo, no obteniéndose diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas y el cultivo control.

ABREVIATURAS.

ABL: *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog*.

Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1.

ATP: adenosín trifosfato.

ATCC: American type culture collection.

Bad: agonista de muerte celular asociado a Bcl-2.

Bax: proteína X asociada a Bcl-2.

BB: buffer de unión.

Bcl-2: leucemia de células B-2.

BCR: *breakpoint cluster región*.

BH: dominio de homología Bcl-2.

CARD: dominio de reclutamiento y activación de caspasas.

CCRF-CEM: línea celular de leucemia aguda t-linfoblástica.

Cdk: quinasa dependiente de ciclina.

CRD: dominio rico en cisteína.

DD: dominio de muerte.

DED: dominio efector de muerte.

DMSO: dimetil sulfóxido.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

EBV: virus de Epstein Barr.

FADD: dominio de muerte asociado a Fas.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

GI50: concentración de producto que provoca la inhibición del 50% del crecimiento celular.

GPX: glutatión peroxidasa.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HTLV-1: virus linfotrópico de células t humanas.

IAPs: proteínas inhibidoras de apoptosis.

K-562: línea celular humana de leucemia eritromieloblástica.

LC50: concentración que mata el 50% de las células.

LLA: leucemia linfocítica aguda.

LLC: leucemia linfocítica crónica.

LMA: leucemia mieloide aguda.
LMC: leucemia mieloide crónica.
Mdm2: doble minuto murino.
Mme: matriz mitocondrial externa.
MPF: factor promotor de la mitosis.
MTT: bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio.
PBS: buffer de sales de fosfato.
PI: yoduro de propidio.
Rb: retinoblastoma.
RDA: cantidad diaria recomendada.
RNA: ácido ribonucleico.
Rpm: revoluciones por minuto.
RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute.
SD: desviación estándar.
Se: selenio.
SEM: error típico de la media.
SFB: suero fetal bovino.
Smac/DIABLO: second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP-binding protein with low pl.
TGI: concentración del compuesto que inhibe totalmente el crecimiento celular.
TNF: factor de necrosis tumoral.
TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.....	5
1. LEUCEMIA.....	5
1.1. Leucemia mieloide crónica.....	6
1.2. Leucemia linfocítica aguda.....	7
2. SELENIO Y CÁNCER.	9
3. APOPTOSIS.....	10
3.1. Características morfológicas y estructurales de la apoptosis.....	12
3.2. Caspasas.....	13
3.3. Vías de activación de la apoptosis.....	14
4. CICLO CELULAR.....	18
4.1. Fases del ciclo celular.....	18
4.2. Regulación del ciclo celular.....	20
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	24
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	25
2. Compuestos selenados.....	25
3. Análisis de la inhibición del crecimiento celular.....	27
4. Análisis de la apoptosis.....	29
5. Análisis del ciclo celular.....	31
6. Análisis estadístico.....	33
IV. RESULTADOS.....	34
1. Resultados de citotoxicidad.....	34
2. Capacidad de inducir apoptosis.....	40
3. Efectos sobre el ciclo celular.....	42
V. DISCUSIÓN.....	45
VI. CONCLUSIONES.....	48
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	49

I. INTRODUCCIÓN.

1. LEUCEMIA.

La leucemia es una enfermedad maligna progresiva de los órganos hematopoyéticos, caracterizada por una proliferación y desarrollo anormales de leucocitos y de sus precursores en la médula ósea y en sangre. Las manifestaciones de la enfermedad vienen dadas por la supresión de la formación de células sanguíneas normales y por la infiltración de los distintos órganos por las células leucémicas. Los factores de inhibición producidos por las células anormales y el reemplazo de la médula suprimen la hematopoyesis produciendo anemia, trombocitopenia y granulocitopenia. La infiltración de los órganos hace que se inflamen el hígado, el bazo y los ganglios linfáticos. También puede afectar a riñones y gónadas, y al sistema nervioso.

Originalmente las leucemias se clasificaban cómo agudas o crónicas basándose en la esperanza de vida pero actualmente se clasifican de acuerdo con el estado de maduración celular. Las leucemias agudas se caracterizan por presentar predominantemente células inmaduras y se dividen en linfocíticas (LLA) y mielocíticas (LMA). Las crónicas se componen de células más maduras y también se dividen en linfocíticas (LLC) y mielocíticas (LMC) [1].

La leucemia afecta 10 veces más a adultos que a niños, sin embargo, la leucemia es el cáncer infantil más común, y la LLA representa aproximadamente 75% de los casos de leucemia infantil. Las leucemias más comunes en adultos son la LMA y la LLC, seguidas por la LMC y la LLA. Se estima que en Estados Unidos habrá 52.380 nuevos casos de leucemia y 24.090 muertes en 2014 [2].

En los últimos 20 años, la incidencia de la leucemia se ha mantenido relativamente estable, mientras que los índices de mortalidad han disminuido y son más altos en la raza blanca que en personas de otros grupos raciales y étnicos. Por sexos, la leucemia es más probable en hombres que en mujeres.

Los factores de riesgo de la leucemia son el tabaquismo, la exposición a algunas sustancias químicas, tales como el benceno, la exposición a la radiación, previo tratamiento con quimioterapia o radioterapia, presentar ciertas afecciones hereditarias o sanguíneas, y antecedentes familiares [2].

El tratamiento de la leucemia va dirigido a la eliminación completa de las células cancerosas y se lleva a cabo mediante métodos quirúrgicos, radioterápicos, quimioterápicos o realizando trasplante de médula ósea. Principalmente se utiliza la quimioterapia pero estos tratamientos muchas veces producen efectos secundarios severos. Por ello es importante y urgente el desarrollo de nuevas drogas antitumorales más selectivas que preserven las células no malignas, reduciendo así los daños causados por la quimioterapia.

1.1. Leucemia mieloide crónica.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un tipo de leucemia que se adquiere por un defecto genético en la célula madre multipotencial hematopoyética que hace que los glóbulos blancos proliferen descontroladamente [3].

1.1.1. Causas.

El 90 % de este tipo de leucemia se produce por una translocación balanceada t (9-22) (q34; q11.2) que da lugar a la fusión de los genes BCR y ABL. Este reordenamiento se conoce cómo cromosoma Philadelphia. Como consecuencia de esta fusión se produce un oncogén que da lugar a la

oncoproteína Bcr-Abl, que es una proteínquinasa constitutivamente activa, la cual promueve el crecimiento y la replicación a través de vías tales como RAS, RAF, JUN quinasa, MYC y STAT. Esto influye en la generación de la leucemia creando un ciclo celular independiente de citoquinas con señales apoptóticas aberrantes en respuesta a la retirada de citoquinas. [4].

Otros factores de riesgo serían la exposición a altas dosis de radiación, ser varón, la edad y ser de raza blanca.

1.1.2. Incidencia y mortalidad.

Supone el 15% de todas las leucemias y el 15-20% de casos de leucemia en adultos, con una incidencia anual de 1-2/100.000 habitantes. La edad media de presentación es de 50 años con leve predominio en varones [5]. La gran mayoría de los casos se producen en adultos.

1.2. **Leucemia linfocítica aguda.**

La leucemia linfocítica aguda (LLA) afecta a las células linfoides y tiene un rápido desarrollo. En condiciones normales los linfocitos maduros se producen en la medula ósea y timo y son los encargados de proporcionar inmunidad al cuerpo. En esta enfermedad los linfoblastos, presentan crecimiento rápido y descontrolado, invadiendo el torrente sanguíneo, la medula ósea y el tejido linfático, pudiendo también invadir otros órganos.

1.2.1. Causas.

La causa de este tipo de cáncer continúa siendo desconocida hasta el momento, aunque se ha asociado su aparición a distintos factores de riesgo [6]:

- Exposición a la radiación: la exposición a niveles altos de radiación (accidentes nucleares, radioterapia) se ha asociado con mayor aparición de LLA y también LMA. Los riesgos asociados a la exposición a bajos

niveles de radiación (estudios por imagen) no se conocen bien. Por seguridad se recomienda limitar la exposición tanto como sea posible.

- Exposición a ciertas sustancias químicas: por ejemplo ciertos medicamentos utilizados en quimioterapia o sustancias químicas como el benceno. El benceno es un solvente usado en refinerías, plantas químicas, fábricas de zapatos e industrias relacionadas con la gasolina, y también está presente en el humo del cigarrillo y en algunos pegamentos, productos de limpieza, detergentes, materiales de arte y disolvente de pintura. Sin embargo, la exposición a sustancias químicas está más relacionada con un aumento en el riesgo de LMA que de LLA.
- Ciertas infecciones virales: se han descrito casos de un tipo poco frecuente de LLA, principalmente en Japón y en el Caribe, que se asocian a infección por el virus linfotrópico de células t humanas tipo 1 (HTLV-1). El virus de Epstein-Barr (EBV) también se ha relacionado con un tipo de LLA, aunque lo más frecuente es que este virus produzca mononucleosis infecciosa.
- Factores genéticos: no parece ser una enfermedad hereditaria, parece ser que el riesgo de padecer la enfermedad no aumenta si hay algún caso en la familia. Sin embargo, el riesgo aumenta si se tiene un gemelo idéntico que presenta la enfermedad en el primer año de vida. Hay algunos síndromes hereditarios en los que sí se ha descrito mayor incidencia: síndromes de Down y Klinefelter, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, ataxia-telangiectasia y neurofibromatosis. La raza también parece ser un factor importante ya que la enfermedad es más común en la raza blanca, aunque no se han esclarecido las causas. El sexo también influye, ya que la incidencia es ligeramente mayor en hombres.

1.2.2. Incidencia y mortalidad.

La Sociedad Americana Contra el Cáncer calcula que en este país en 2014 se diagnosticarán unos 6.000 nuevos casos de LLA (3.100 en hombres y

2.900 en mujeres) y aproximadamente 1.400 personas (810 hombres y 630 mujeres) fallecerán por esta causa.

Tan sólo un tercio de los casos ocurren en adultos ya que la mayoría de LLA aparecen en niños. Se estima que tres de cada cuatro casos de leucemia infantil son de tipo LLA. Es la más común en los primeros años de vida, ocurriendo con más frecuencia entre los dos y los cuatro años de edad. Sin embargo, la mayoría de fallecimientos ocasionados por este tipo de leucemia se producen en adultos.

2. SELENIO Y CÁNCER.

El selenio (Se) es un elemento traza esencial para la salud humana, aunque es requerido en pequeñas cantidades (RDA de 50µg/día). Su principal fuente es la dieta ya que se encuentra en cereales, carnes, pescados, nueces, huevos y en el agua. Es importante para múltiples procesos celulares puesto que forma parte de muchas selenoproteínas con funciones biológicas esenciales. Presenta múltiples beneficios, incluido un efecto protector frente a distintos tipos de cáncer.

Diversos estudios epidemiológicos han asociado un bajo nivel de Se en sangre con un mayor riesgo de incidencia y/o mortalidad de algunos tipos de cáncer [7-9]. Estos estudios se han realizado de manera más exhaustiva en relación al cáncer de próstata [10-12] aunque se ha demostrado que otros tipos de cánceres como los de pulmón [13], hígado [14], cerebro [15] o ciertas leucemias [16], también se ven afectados por la ingesta de Se, por lo que se ha sugerido la utilización de Se sólo o en combinación con otros agentes

antitumorales con el fin de incrementar la eficacia [17] o disminuir la toxicidad [18] de los mismos.

Los mecanismos de actuación del Se no han sido completamente aclarados, aunque para su función antitumoral han sido propuestos mecanismos como la protección antioxidante, estimulación de la reparación del DNA dañado y la inducción de apoptosis en células tumorales [19]. La función mejor conocida de este elemento es actuar como cofactor de la glutatión peroxidasa (GPX), enzima que se encarga de mantener bajos los niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la célula, evitando así la formación de radicales libres [20], aunque el mecanismo más plausible parece ser la inducción de la apoptosis. La regulación de los mecanismos apoptóticos es extremadamente compleja y para los compuestos selenados está principalmente involucrada la vía mitocondrial, con activación de las caspasas y de especies reactivas de oxígeno [21].

Hay cada vez más evidencias de distintos ensayos que plantean que los compuestos selenados inhiben importantes vías de la carcinogénesis precoz y de que la actividad antitumoral depende de su estructura química y de su concentración [22-24].

3. APOPTOSIS.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico necesario para el desarrollo y mantenimiento de los seres vivos. El control homeostático del número de células se consigue mediante un equilibrio dinámico entre la proliferación celular y la muerte celular, y la apoptosis juega

un papel fundamental sobre ello [25]. La apoptosis se desencadena en respuesta a distintos estímulos propios o exógenos y fisiológicamente es necesaria para la morfogénesis, la renovación tisular y la regulación del sistema inmunitario, eliminando las células autorreactivas y el excedente de linfocitos tras una infección. También se encarga de la eliminación de células infectadas por virus y aquellas que tienen dañado su DNA.

Debido a que juega un papel clave en la eliminación de células defectuosas, alteraciones en los genes que regulan la apoptosis pueden ser causa de la aparición de muchos tumores [26].

La apoptosis difiere significativamente del otro principal tipo de muerte celular, la necrosis. La apoptosis es un fenómeno activo que requiere de la síntesis de nuevas proteínas mientras que la necrosis es un proceso pasivo y patológico, caracterizado por rotura de la membrana celular y liberación del contenido celular con la consiguiente inflamación. Sin embargo en la apoptosis la membrana permanece íntegra y no se afecta el tejido circundante [27].

Aspectos	Muerte por Apoptosis	Muerte por Necrosis
Significado	Fisiológico y patológico	Patológico
Estímulos	Hipoxia ligera, ausencia de factores de crecimiento etc.	Isquemia, toxinas, falta de ATP, etc..
Morfología	Disminución del volumen celular, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos	Aumento del volumen celular, lisis del núcleo y la célula, destrucción de orgánulos.
Rotura del DNA	Internucleosomal	Aleatoria
Membrana plasmática	Alteraciones en su composición, arrugamiento, mantenimiento de la integridad hasta estadios tardíos	Lisis
Mitocondrias	No afectadas	Hinchadas
Fase latente	Horas	Minutos
Final del proceso	Fagocitosis de cuerpos apoptóticos	Reacción inflamatoria
Histología	Desaparición de células aisladas, sin señales histológicas residuales	Desaparición celular masiva, restos de inflamación, cicatriz fibrosa
Dependencia energética	Dependiente de ATP	Independiente de ATP
Reacción inflamatoria	Ausente	Presente

Tabla 1. Diferencias entre muerte por apoptosis y por necrosis.

3.1. **Características morfológicas y estructurales de la apoptosis [28].**

En un primer momento las células que reciben la señal para entrar en apoptosis sufren disminución del volumen del citoplasma y pérdida de contacto con las células vecinas porque se alteran las moléculas de adhesión de la membrana plasmática. También se produce translocación de N-acetilglucosamina y de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana, lo cual será la señal para la posterior fagocitosis de la célula. Las mitocondrias pierden su potencial transmembrana. En el núcleo se produce la condensación y marginación de la cromatina y las desoxirribonucleasas van cortando el DNA en fragmentos específicos de 180-200 pares de bases. Estos cortes se producen en los espacios internucleosomales. Durante el proceso se da una elevación de los niveles de Ca^{++} y Mg^{++} necesarios para el funcionamiento de las endonucleasas. El citoplasma se sigue condensando y se divide en distintas vesículas conocidas como cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son inmediatamente fagocitados por las células vecinas o por macrófagos y las células fagocíticas secretan citoquinas que inhiben la inflamación.

En la apoptosis se pueden diferenciar tres fases:

- Fase efectora: se caracteriza por un aumento del Ca^{++} intracelular una vez que la célula ha recibido las señales inductoras de la apoptosis, y esto origina la activación de endonucleasas y caspasas y además, se producen cambios en el citoesqueleto que provocan cambios en el tamaño y forma celulares.
- Fase degradativa: en esta fase se produce la degradación de las proteínas y los ácidos nucleicos y la célula sufre cambios en la membrana plasmática. Debido a ellos se originan los cuerpos apoptóticos. Las endonucleasas se encargan de fragmentar el DNA, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina.

- Fase de eliminación: los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos debido a que son capaces de reconocer la fosfatidilserina presente en la superficie de las células apoptóticas. De este modo, se evita la inflamación del tejido circundante.

Todos estos cambios se dan debido a una activación en cascada de unas proteínas muy conservadas a lo largo de la evolución, las caspasas.

3.2. Caspasas.

Las caspasas son cisteín-proteasas que tienen cisteína en el centro catalítico y cortan otras proteínas tras residuos de ácido aspártico. Juegan un papel clave en la ejecución y regulación de la muerte celular programada [29]. Las caspasas se encuentran en la célula como zimógenos inactivos o procaspasas y son activadas por otras proteínas mediante proteólisis.

Las caspasas se clasifican según su función:

- Caspasas iniciadoras: 2, 8, 9 y 10. Poseen largos dominios reguladores que interaccionan con otras proteínas (CARD, DED). Su función es activarse en respuesta a señales proapoptóticas para después activar a las caspasas efectoras.
- Caspasas efectoras: 3, 6 y 7. Son propiamente las que producen los signos típicos de la apoptosis.

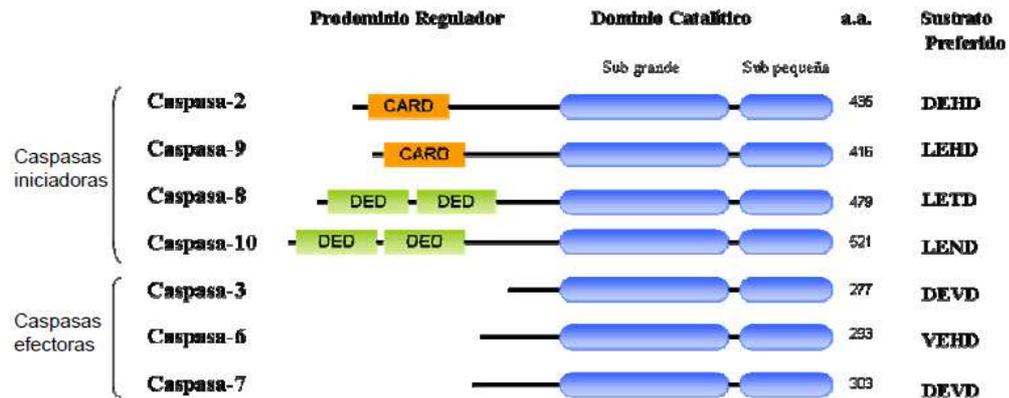


Figura 1. Clasificación de las principales caspasas y su estructura.

Las caspasas efectoras producen principalmente fragmentación del DNA celular vía activación de CAD, proteólisis de las láminas nucleares que conlleva la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo y proteólisis de las proteínas del citoesqueleto, lo que hace que se deforme la membrana celular y finalmente se fragmente la célula.

3.3. Vías de activación de la apoptosis.

Para que una célula entre en apoptosis requiere dejar de recibir señales de supervivencia y comenzar a recibir señales de muerte. Estas señales pueden ser muy diversas: oxidación del interior celular, lesión del DNA por estos oxidantes, exposición a luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterápicos, etc. Estos desencadenantes originan moléculas que se unen a receptores específicos de la membrana celular y transmiten la señal activando la cascada de reacciones que llevarán a la activación de las caspasas efectoras y a la muerte celular. Entre estas moléculas activadoras de la apoptosis se encuentran en TNF y el FAS ligando, que se unen a sus receptores específicos de superficie. [28]

1. Introducción.

La apoptosis se puede desencadenar por dos tipos de vías que se diferencian en el modo de iniciación; la vía intrínseca o mitocondrial, que depende de cambios en la permeabilidad mitocondrial, y la vía extrínseca que es activada a través de receptores de la superficie celular denominados receptores de muerte [30].

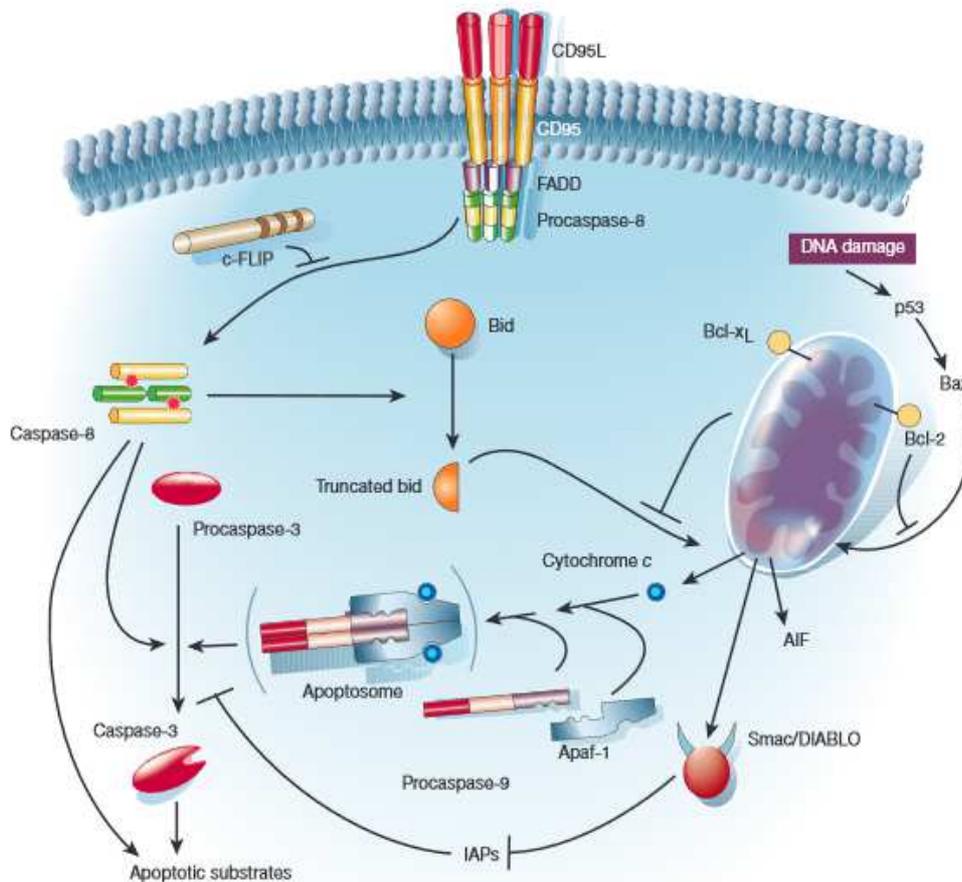


Figura 2. Vías intrínseca y extrínseca de activación de la apoptosis. Hengartner MO. *The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000 Oct 12; 407(6805):770-6.*

- Vía extrínseca: también llamada vía de los receptores de muerte. Esta vía se desencadena por miembros de la superfamilia de los receptores de muerte, por ejemplo, CD95 o Fas y TNFR I. Estos receptores tienen un dominio intracelular común llamado dominio de muerte (DD) y dominios

extracelulares ricos en cisteína (CRD) específicos de cada receptor. La unión del ligando de Fas a su receptor induce agrupación de receptores y formación de un complejo de señalización inductor de muerte. Este complejo recluta, vía molécula adaptadora FADD (Fas- associated death domain protein), múltiples procaspasas 8 que se activarán por proteólisis. La activación de la caspasa 8 puede ser bloqueada al ser reclutada por c-FLIP, un homólogo de caspasa deficiente en proteasa [31]. Las caspasas 8 activas son liberadas y activan por proteólisis a la procaspasa 3, que pasa a caspasa 3 activa y esta, a su vez, activa a las otras caspasas efectoras 6 y 7 llevando a fin la muerte celular.

- Vía intrínseca: esta vía dependiente de la mitocondria se activa frente a señales intracelulares como por ejemplo, el daño en el DNA, estrés oxidativo o exceso de Ca^{++} intracelular. Lo primero que ocurre es un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (mme) con salida al citoplasma de citocromo c, que formará el apoptosoma, y de Smac-diablo que se une a IAPs (inhibidores de caspasas) inhibiéndolos. Estos cambios en la permeabilidad mitocondrial vienen dados por la familia de proteínas Bcl-2. Estas proteínas presentan uno o varios dominios estructurales homólogos BH. Dentro de esta familia hay proteínas antiapoptóticas, la mayoría con 4 dominios BH (BH1-BH4) y proteínas proapoptóticas sin dominios BH4. Éstas se dividen en dos subfamilias; la subfamilia Bax, con dominios BH1-BH3, y la subfamilia BH3, únicamente con este dominio. Las proteínas de la subfamilia Bax, Bax y Bad, son las responsables directas del aumento de la permeabilidad. Bax se encuentra como monómero libre en el citosol y Bad como monómero en la mme. Ante un estímulo proapoptótico Bax se inserta en la membrana mitocondrial y ambos oligomerizan, lo cual induce la liberación de sustancias desde la mitocondria. La subfamilia de proteínas Bcl-2 impide esta oligomerización de Bad y Bax actuando como antiapoptóticos al impedir la liberación de citocromo c y otras proteínas. Las proteínas Bcl-2 pro y antiapoptóticas coinciden en la superficie mitocondrial para regular la salida del citocromo c.

Por tanto, que la célula entre en apoptosis o no depende de si es más fuerte la señal antiapoptótica o la proapoptótica. Lo siguiente que tiene lugar, si la célula entra en apoptosis, es la formación del apoptosoma. En presencia de ATP, el citocromo c se une a Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1) que sufre un cambio conformacional y deja expuestos sus dominios CARD, lo cual permite su oligomerización. De esta forma puede unir múltiples unidades de procaspasa 9 y de esta manera se forma el apoptosoma. Cuando Apaf-1 y las procaspasas 9 están unidos se produce la activación de la caspasa 9, la cual activará a la caspasa 3 y ésta, al resto de caspasas efectoras.

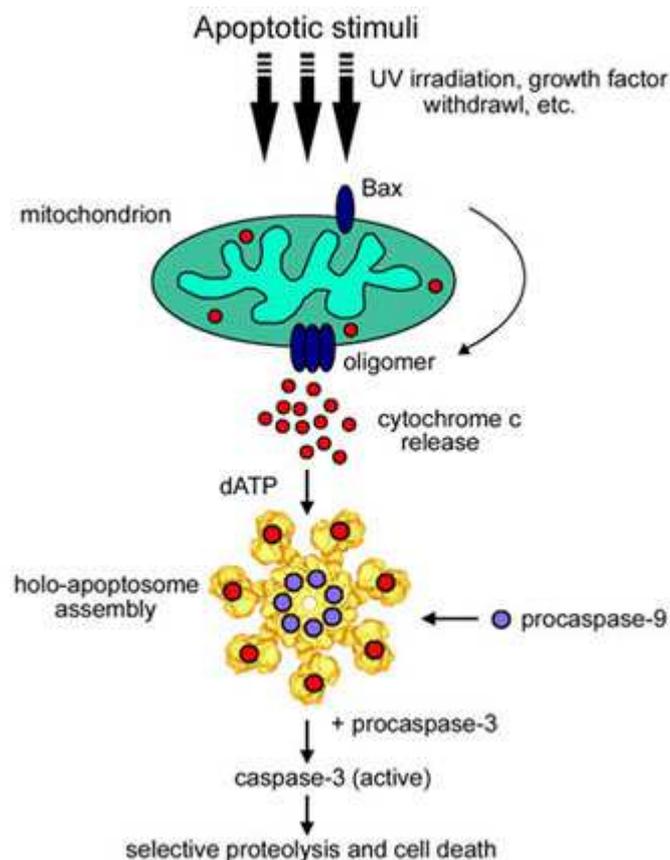


Figura 3. Esquema de la vía intrínseca de la apoptosis.

La vía de los receptores de muerte y la mitocondrial convergen en la activación de la caspasa 3. Esta parte está inhibida por los IAPs, pero la proteína Smac/DIABLO liberada de la mitocondria impide esta inhibición.

4. CICLO CELULAR.

El ciclo celular es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas. La división celular consiste principalmente en dos procesos consecutivos, caracterizados por la replicación del DNA y la segregación de los cromosomas replicados en dos células hijas. Originalmente, la división celular se dividía en dos fases: mitosis, es decir, la división del núcleo y del citoplasma (cariocinesis y citocinesis), y la interfase, el periodo entre dos mitosis. La mitosis incluía profase, metafase, anafase y telofase. Bajo el microscopio se vio que durante la interfase la célula simplemente aumentaba de tamaño, pero más adelante se comprobó que la interfase incluía las fases G₁, S y G₂ [32]. La duración del ciclo celular depende de la estirpe pero tiene una duración media de 24 horas.

4.1. Fases del ciclo celular.

- **Fase G₁:** período que transcurre entre el fin de una mitosis o nacimiento de la célula y el inicio de la síntesis de DNA. Durante este periodo la célula duplica su tamaño y masa, hay síntesis activa de RNA, proteínas y todos sus componentes, como resultado de la expresión de los genes que

codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. En este momento la célula contiene una dotación cromosómica $2n$, es diploide pero cada cromosoma está formado por una sola cromátida. Esta fase contiene el punto de restricción G1 en el cual la célula verifica que las condiciones son las idóneas antes de pasar a fase S. Tiene una duración media de 6-12 horas.

- **Fase S** (síntesis): replicación o síntesis del DNA, la dotación cromosómica pasa de $2n$ al comienzo a $4n$ al final de la fase; cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas unidas por un centrómero. La célula también duplica su centriolo. Tiene una duración media de unas 6-8 horas. Al final de esta fase se da otro punto de control para comprobar que el material genético se ha duplicado correctamente.
- **Fase G2**: empieza cuando todo el DNA se ha duplicado y la célula presenta dos juegos diploides completos de cromosomas ($4n$), y finaliza cuando comienza la mitosis. En esta fase se evalúa la fidelidad de la replicación, se corrigen los errores y se sintetizan proteínas necesarias para la mitosis. Tiene una duración entre 3 y 4 horas, es la fase más corta de la interfase. Contiene el punto de restricción G2/M.
- **Fase M** (mitosis y citocinesis): división nuclear. Ésta incluye 4 subfases: profase, metafase, anafase, telofase. los cromosomas replicados se condensan, la envoltura nuclear se desintegra y las cromátidas hermanas se separan. Se forman dos nuevos núcleos. La mitosis finaliza con la citocinesis o división del citoplasma, que se inicia en la telofase, en donde se segmenta el citoplasma dando lugar a dos células nuevas. Este proceso dura aproximadamente 1 hora.
- **Fase G₀**: las células se encuentran en quiescencia (células no proliferativas), ya que han abandonado el ciclo celular activo. En esta fase las células pueden pasar días, semanas o años. Las células son metabólicamente activas pero no se dividen.

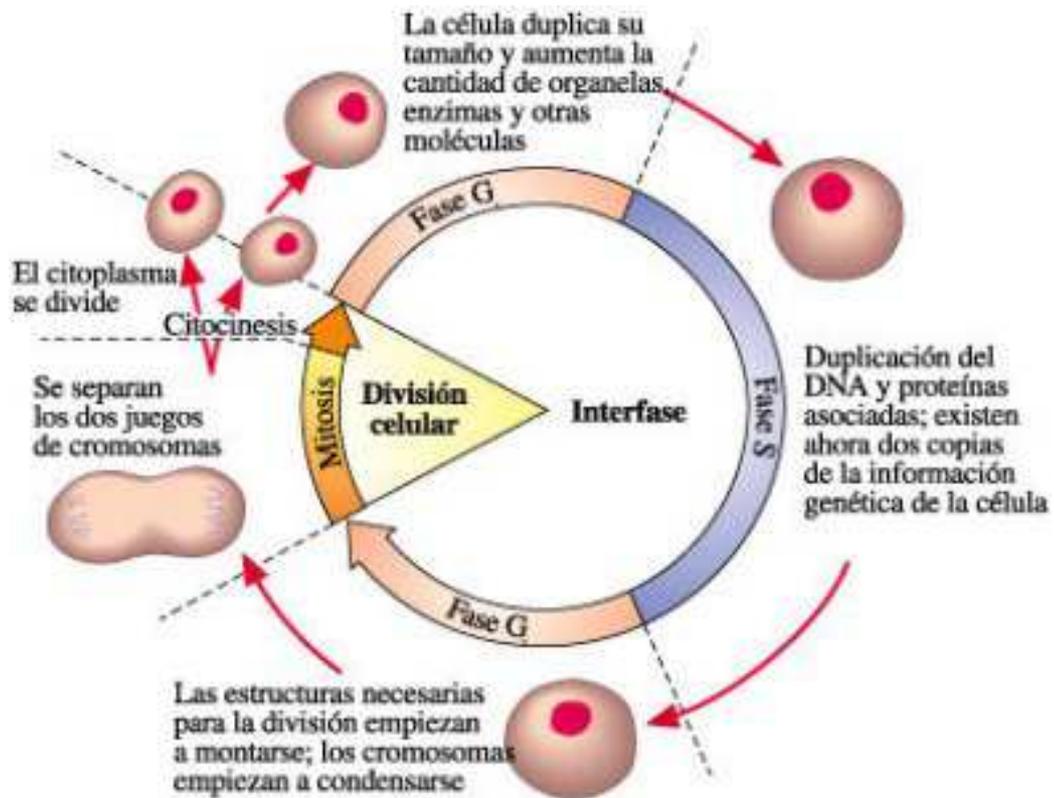


Figura 4. Esquema de las fases del ciclo celular.

4.2. Regulación del ciclo celular.

El ciclo celular es un proceso ordenado y estrictamente controlado principalmente por dos familias de proteínas: las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) [33].

- **Quinasas dependientes de ciclinas:** son proteínas que contienen un núcleo catalítico de serina/treonina y fosforilan en estos residuos a proteínas diana claves en el ciclo celular. Se activan al formar complejos con ciclinas. Su concentración celular es constitutiva a lo largo del ciclo y

la formación de este complejo está regulada por la concentración de ciclinas.

- **Ciclinas:** familia de proteínas con expresión diferencial a lo largo del ciclo celular y que forman complejo con las Cdk. Son producto de protooncogenes, ya que una mutación en ellos podría dar lugar a una excesiva proliferación celular.

Hay 4 tipos de ciclinas que se unen a las CDKs y actúan en fases específicas del ciclo celular:

- Ciclina D: actúa en la fase G₁; y se unen a CDK 4 y 6; produce la transcripción de Rb/E2F.
- Ciclina E: actúa al final de la fase G₁ y en la intersección G₁/S, se unen a CDK2; produce la transcripción de Rb/E2F.
- Ciclina A: actúa en la fase S y principios de la fase G₂ se unen CDK2 y a CDK1.
- Ciclina B: controla la fase M en complejo con CDK1.

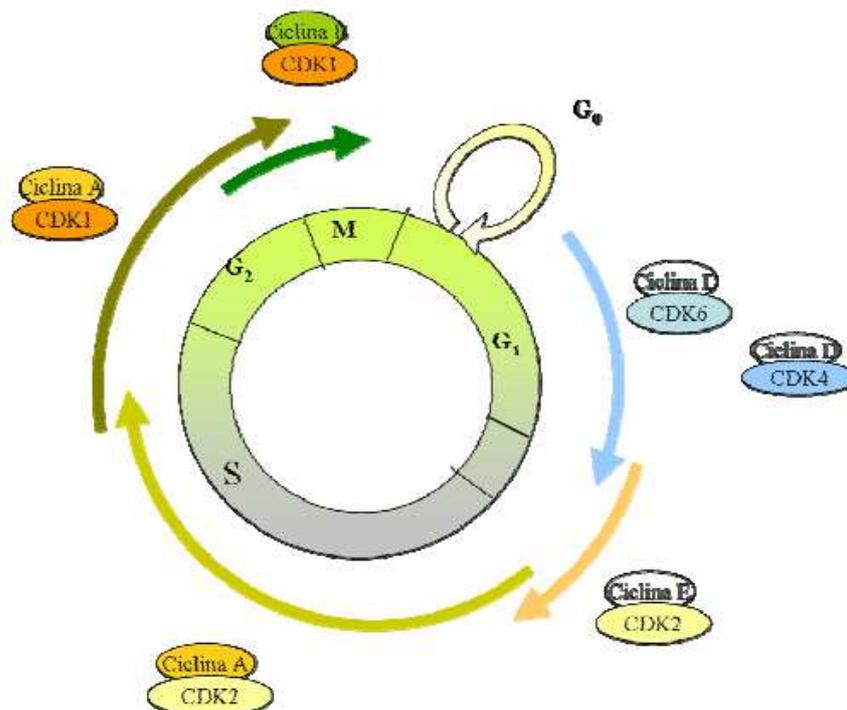


Figura 5. Esquema resumen del control del ciclo celular por ciclinas y Cdk.

A lo largo del ciclo celular hay varios puntos de control claves para controlar que la célula pase a la siguiente fase en las condiciones óptimas. Los principales son:

- Punto de restricción o paso de G₁ a S: está controlado por factores externos (presencia de nutrientes, sales y temperatura), volumen celular y factores de crecimiento. En este control participa el complejo ciclinaD-Cdk4, 6. Los factores de crecimiento inducen la formación de ciclina D y se forman los complejos Cdk-ciclina que fosforilan la proteína Rb (retinoblastoma), que una vez fosforilada se libera del factor E2F que induce la entrada en fase S.

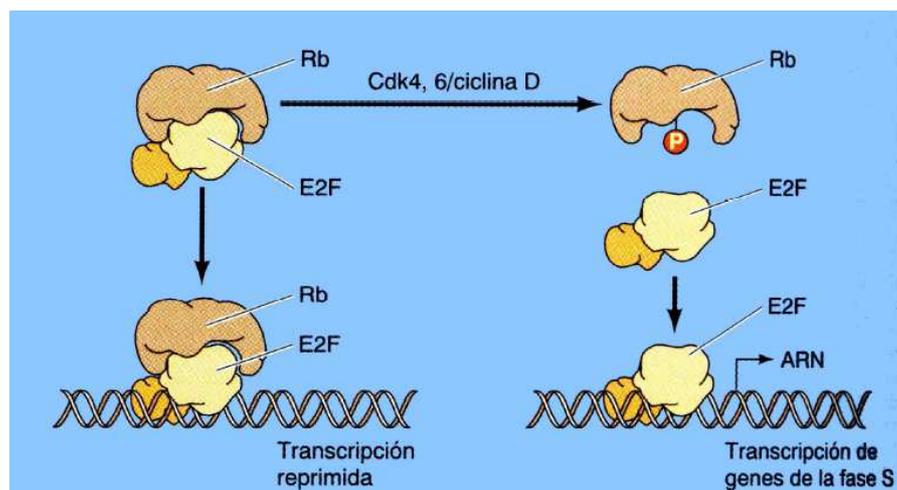


Figura 6. Punto de restricción G₁/S.

- Punto de control G₂/M: controla la entrada en mitosis comprobando que la célula tiene el volumen adecuado, que el material genético se ha replicado correctamente y que el DNA no esté dañado. Este punto está controlado por el complejo ciclina B-Cdk1, también llamado factor promotor de la mitosis (MPF). La ciclina B comienza a sintetizarse al inicio de la fase S y alcanza su máxima concentración al final de G₂. El MPF activo induce la activación de factores de transcripción por fosforilación de manera que se transcriben los

genes de la DNA-polimerasa, histonas, etc. También fosforila las láminas nucleares fragmentando así la membrana nuclear y controla la progresión de la metafase.

El daño en el DNA puede detener el ciclo celular en cualquier fase para intentar reparar los daños y si no se consigue, inducir la apoptosis de esa célula. La proteína p53 juega un importante papel en este proceso. Es un gen supresor de tumores conocido también como el “guardián del genoma”. En condiciones normales se encuentra en bajos niveles debido a que la oncoproteína mdm2 lo fija y lo transporta fuera del núcleo. Ante un daño en el DNA aumenta su expresión nuclear e induce genes que detienen el ciclo celular. Si no se consigue reparar el daño aumenta aún más la concentración celular de p53 y la célula entra en apoptosis.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Dada la alta morbimortalidad del cáncer el desarrollo de nuevos fármacos cada vez más específicos que actúen selectivamente sobre las células tumorales es muy importante. En los últimos años se han evaluado múltiples componentes derivados del selenio con estructura muy diversa y teniendo en cuenta los prometedores resultados de anteriores estudios [34-37] y que hay pocos ensayos en leucemia, nos vamos a centrar en la evaluación de la toxicidad de 6 nuevos diseleniuros con urea en líneas celulares de leucemia para la identificación de potenciales anticarcinógenos.

Objetivos.

1. Evaluación de la capacidad de 6 nuevos compuestos derivados de selenio para inhibir el crecimiento celular en cultivos de células K-562 de leucemia mieloide crónica.
2. Dado que hay evidencias de que la apoptosis es un mecanismo crítico en la prevención del cáncer por los compuestos selenados, se estudiará la capacidad de estos compuestos para inducir apoptosis en células CCRF-CEM de leucemia linfoblástica.
3. El arresto del ciclo celular es una de las dianas de muchas drogas anticancerígenas. Por ello, se analizará el efecto de estos compuestos sobre la progresión del ciclo celular en células CCRF-CEM de leucemia linfoblástica aguda de células t.

III. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Líneas celulares y condiciones de cultivo.

Las células K562 de leucemia mieloide crónica y las CCRF-CEM de leucemia linfoblástica aguda de células T son células no adherentes que crecen en suspensión y fueron adquiridas de la ATCC (*American type culture collection*). Fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (*Gibco*) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y con antibiótico (*Pen Estrep Gibco*) al 1%. El SFB se descomplementó calentándolo a 56°C durante 30 minutos. Las células se cultivaron en frascos de 75 cm³ (*Nunc*), en estufa a 37°C, con un 5% de CO₂ y 95% de humedad. Se cambió el medio cada 48 horas realizando diluciones de las células para mantener un crecimiento exponencial.

2. Compuestos selenados.

Los compuestos fueron sintetizados por el departamento de Química Orgánica de la Universidad de Navarra. Todos los compuestos tienen una base de diseleniuros y urea, y son de alto peso molecular. Su estructura se resume en la siguiente tabla:

Referencia	Estructura	Peso molecular (g/mol)
MD-27	1,1'-(4,4'-diselenodiilbis(4,1-fenilen))bis(3-(4-metoxibencil selenourea)	839,0
MD-28	1,1'-(4,4'-diselenodiilbis(4,1-fenilen))bis(3-(4-metilbencil selenourea)	843,5
MD-29	1,1'-(4,4'-diselenodiilbis(4,1-fenilen))bis(3 fenilselenourea)	815,5
MD-32	1,1'-(4,4'-diselenodiilbis(4,1-fenilen))bis(3-hexiltiourea)	628,0
MD-34	1,1'-(4,4'-diselenodiilbis(4,1-fenilen))bis(3-benciltiourea)	640,0
MD-35	1,1'-(4,4'-diselenodiilbis(4,1-fenilen))bis(3-ciclohexilurea)	592,0

Tabla 2. Estructura química y pesos moleculares de los compuestos estudiados.

Para los estudios de citotoxicidad los compuestos experimentales se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) (*Sigma*) a una concentración inicial de 10^{-2} M. para su esterilización se filtró la dilución utilizando filtros de 0.22 μm (*Millipore*). Para los ensayos de citotoxicidad se realizaron diluciones seriadas de los compuestos partiendo de la dilución madre. Éstas se realizaron en medio de cultivo RPMI 1640 sin suplementar obteniendo diluciones de concentraciones desde 10^{-3} M hasta 10^{-7} M. Sin embargo, para los estudios de apoptosis y ciclo celular los compuestos fueron disueltos y diluidos en DMSO

hasta obtener las diferentes concentraciones empleadas. Todos los compuestos y diluciones se guardaron a -20°C hasta su uso.

3. **Análisis de la inhibición del crecimiento celular.**

Se realizaron estudios de citotoxicidad basados en ensayos colorimétricos cuantificables con MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] [38]. Esta técnica se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (coloración amarilla) por las células viables que son capaces de reducirlo convirtiéndolo en sales de formazán insolubles (de color azul oscuro), que serán disueltas con DMSO para su posterior lectura colorimétrica. Esta reacción está catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial. La cantidad de producto formado será directamente proporcional al número de células vivas y se cuantificará midiendo su absorbancia a 550 nm.

Se determinó la citotoxicidad en la línea K-562. El efecto tóxico de los compuestos se evaluó mediante el cálculo de los siguientes parámetros: **GI50** (concentración de producto que provoca la inhibición del 50% del crecimiento celular), **TGI** (concentración del compuesto que inhibe totalmente el crecimiento celular) y **LC50** (concentración que mata el 50% de las células). La variable medida para ello fue el porcentaje de crecimiento celular. Se comparó el crecimiento a las 72 horas de las células tratadas con los compuestos a probar y las células no tratadas (control) con respecto a las células del inóculo inicial (a tiempo cero). Con las lecturas colorimétricas se realizaron los siguientes cálculos para obtener los porcentajes de crecimiento para cada concentración de compuesto: $[(A-A_0)/(A_c-A_0)] \times 100$ cuando $A \geq A_0$ y $[(A-A_0)/A_0] \times 100$ cuando $A < A_0$, donde A=absorbancia del compuesto; A₀= absorbancia a tiempo cero; A_c= absorbancia del control. Se dibujó una curva dosis-respuesta utilizando los porcentajes de crecimiento calculados y el SEM (error típico de la media). De la curva se obtuvieron por extrapolación los valores de los tres parámetros expresados en unidades de concentración (micromolar).

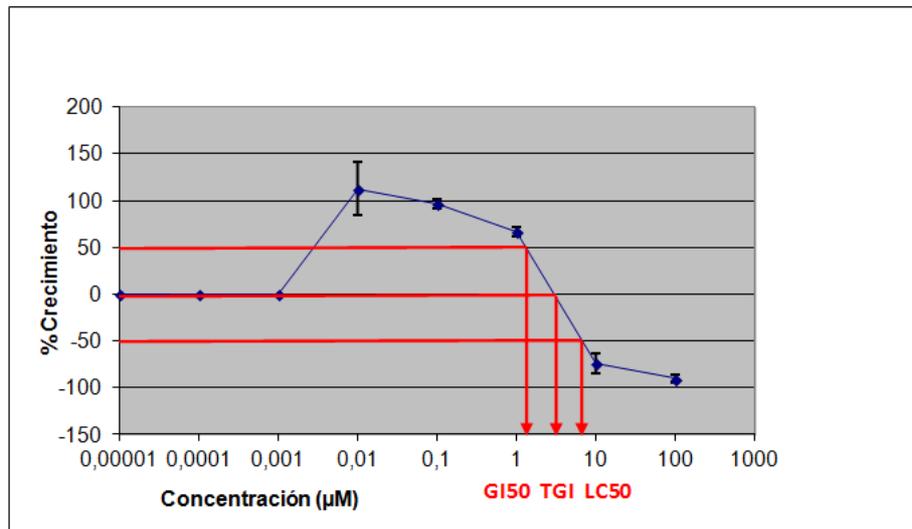


Figura 7. Determinación de los parámetros de citotoxicidad.

Para los experimentos se utilizaron placas de 96 pocillos (*TPP*) de fondo redondo a una densidad de 4×10^3 células por pocillo en un volumen final de 200 μl . Para determinar el número de células en el cultivo del que se parte se realizó una dilución 1:10 de células en trypan blue (*Gibco*) y se transfirieron a una cámara de Neubauer para contarlas al microscopio óptico. El trypan blue es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. De esta manera las células que aparecen teñidas de azul son consideradas no viables.

En cada placa se analizaron los diferentes compuestos en concentraciones finales desde 10^{-4}M hasta 10^{-8}M , realizando cada concentración por cuadruplicado y cada experimento al menos por triplicado.

Procedimiento:

- Se añaden 100 μl de medio suplementado con SFB al 10% en cada pocillo. A los pocillos blanco se añaden 200 μl y a los pocillos control 120 μl .
- 80 μl de la dilución de células necesaria para alcanzar las 4×10^3 células, excepto a los pocillos blanco.

- 20 μl de los compuestos a las distintas concentraciones en los pocillos que corresponda. De esta manera el volumen final de cada pocillo es de 200 μl .
- Las muestras se incuban en estufa a 37°C con un 5% de CO₂ durante 72 horas. Para la placa a tiempo cero se omite este paso.
- Transcurrido ese tiempo se añaden 50 μl de MTT (2 mg/ml de PBS) (*Calbiochem*) a cada pocillo y se incuban en estufa durante 4h a 37°C, 5% CO₂.
- A continuación se centrifugan las placas y se retira el sobrenadante.
- Se añaden 150 μl de DMSO a cada pocillo para disolver el formazán que haya precipitado y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm con un lector de placas de ELISA.

4. **Análisis de la apoptosis.**

La cuantificación de la apoptosis se llevó a cabo por citometría de flujo, siguiendo la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática con el *Annexin V-FITC kit (BD Pharmingen)*.

Cuando la célula comienza la apoptosis cambia la morfología de su membrana exponiendo su parte interna y dejando en el exterior la fosfatidilserina a la que es capaz de unirse la anexina (apoptosis temprana). Para cuantificar la apoptosis tardía se utiliza el fluorocromo yoduro de propidio (PI) que tiene la capacidad de unirse al DNA. Pero sólo es capaz de penetrar en la célula cuando su membrana comienza a fragmentarse en fases más avanzadas de la apoptosis. Analizando las muestras en citómetro (*Epics XI 4 clr, Beckman Coulter*) se detectó la anexina gracias a su marcaje con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y se midió su emisión a 525 nm. La emisión del PI se detectó a 620 nm.

Las células que se encuentran en el cuadrante A3 son las células vivas, negativas para anexina y PI, las del cuadrante A4 (anexina+/PI-) son las células que se encuentran en apoptosis temprana, las del cuadrante A2 (anexina+/PI+) son las células en apoptosis tardía y las del cuadrante A1 (anexina-/PI+) son las células necróticas.

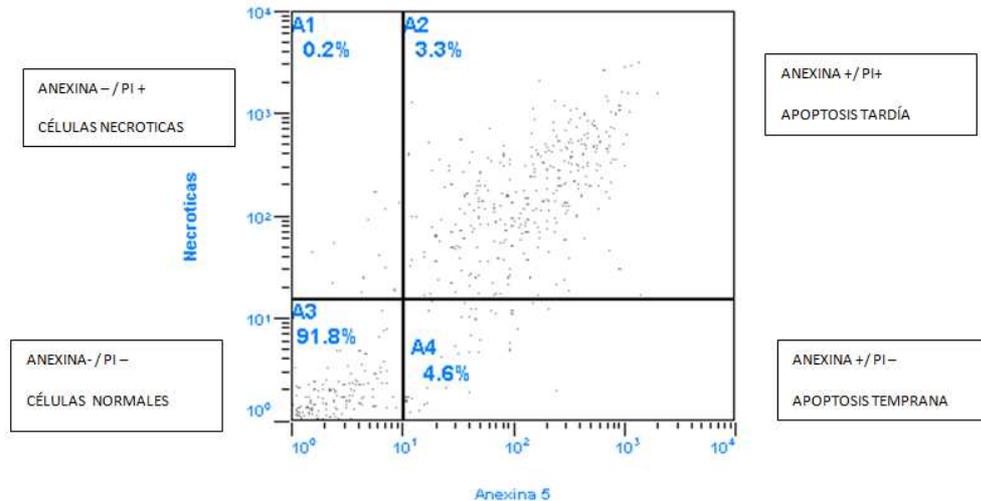


Figura 8. Cuantificación de la apoptosis mediante el kit *Anexina V-FITC* y citometría de flujo.

Teniendo en cuenta los resultados de citotoxicidad en la línea CCRF-CEM obtenidos por este grupo de investigación en ensayos previos, se probó el compuesto MD-35 en esta misma línea celular. Se realizaron ensayos a concentraciones de producto de 2, 10, 20 y 40 μM durante 24 horas de tratamiento.

Para ello se cultivaron en placa (60x15mm, *TPP*) 3×10^6 células en 6 ml de medio RPMI suplementado con SFB al 10% y se añadió la cantidad necesaria de compuesto para cada concentración. 3 ml se utilizaron para estudiar la apoptosis y los otros 3 ml para el análisis del ciclo celular. Como control negativo se utilizó la misma cantidad de DMSO que de producto. Sirve para cerciorarse de que el DMSO no provoque la entrada de las células en apoptosis, ya que el MD-35 se disolvió en este compuesto. Como control

positivo se utilizó camptotecina que se sabe que provoca la muerte celular por apoptosis. Se realizaron experimentos independientes por triplicado y en cada uno de ellos se analizó el compuesto por duplicado. La variable a medir fue el porcentaje total de células en apoptosis, que es la suma de las células que se encuentren en apoptosis temprana (cuadrante A4) más las que se encuentran en apoptosis tardía (cuadrante A2). Los resultados se expresaron como porcentaje total de células apoptóticas \pm SD (desviación típica).

Procedimiento:

- Se añaden 3×10^6 células por placa, en medio RPMI suplementado con SFB al 10% en un volumen final de 6ml.
- A las placas que se van a tratar se añade la cantidad necesaria de compuesto para tenerlo a una concentración final de 2, 10, 20 y 40 μ M. A las placas control añadiremos la misma concentración de DMSO y de camptotecina.
- Al cabo de 24 horas se toman 3 ml de cada placa y se centrifugan 5 minutos a 1.500 rpm.
- Se retira el sobrenadante y se lavan las células con PSB.
- Se vuelven a centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm.
- Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 100 μ l de binding buffer (BB) 1X diluido en PBS.
- En oscuridad se añaden 5 μ l de anexina y 5 μ l de PI.
- Se deja en oscuridad y en hielo durante 15 minutos.
- Transcurrido este tiempo se añaden 400 μ l de BB y se analiza mediante citometría de flujo.

5. Análisis del ciclo celular.

La distribución de las células entre las diferentes fases del ciclo celular en los cultivos se determinó cuantificando el contenido de DNA de las células

por citometría de flujo con yoduro de propidio (*Sigma*). Si se fijan y permeabilizan las células con etanol el PI es capaz de penetrar en ellas. Es un marcador que se intercala en la hélice del DNA y la intensidad de señal será proporcional al contenido de DNA de la célula. Las células en fase G0/G1 tienen una cantidad de DNA 1X, las que se encuentran en fase S tienen una cantidad entre 1X y 2X y las que se encuentren en G2/M tienen 2X. El PI también es capaz de unirse a las hebras de RNA, por este motivo es necesario tratar las muestras con RNasas para evitar uniones inespecíficas.

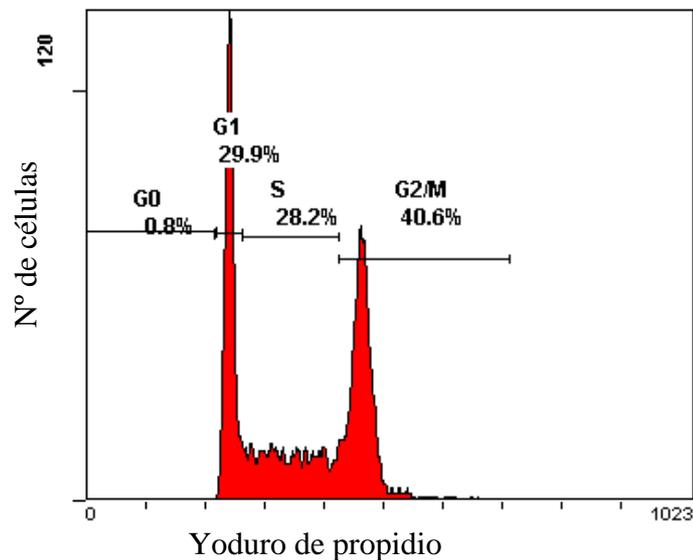


Figura 9. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo y yoduro de propidio. En el eje x se representa la cantidad de PI, que es proporcional al contenido en DNA celular, y en el eje y se representa el número de células.

De esta manera se midió el porcentaje de células CCRF-CEM presentes en cada fase del ciclo celular probando el producto MD-35 a concentraciones de 2, 10, 20 y 40 μM . Se realizaron tres experimentos independientes y en ellos se analizó cada concentración por duplicado.

Procedimiento.

- Se toman los 3 ml restantes que quedan en cada placa de las utilizadas para el análisis de apoptosis y se centrifugan 5 minutos a 1.500 rpm.
- Se retira el sobrenadante y se resuspenden las células en 1ml de PBS para lavarlas.
- Se vuelven a centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm.
- Se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet el 1 ml de etanol al 70% en PBS. Se deja 20 minutos a 4°C.
- Se vuelven a centrifugar en las mismas condiciones y se resuspende el pellet en 1 ml de solución de yoduro de propidio (100 µl de IP a 500 µg/ml, 100 µl de RNAsas a 2 µg/ml y 800 µl de PBS). Se incuba 30 minutos en oscuridad a 37°C.
- Para finalizar se centrifuga 5 minutos a 1.500 rpm y se resuspenden las células en 500 µl de PBS.
- Se analizan mediante citometría de flujo midiendo la emisión del PI a 620 nm.

6. **Análisis estadístico.**

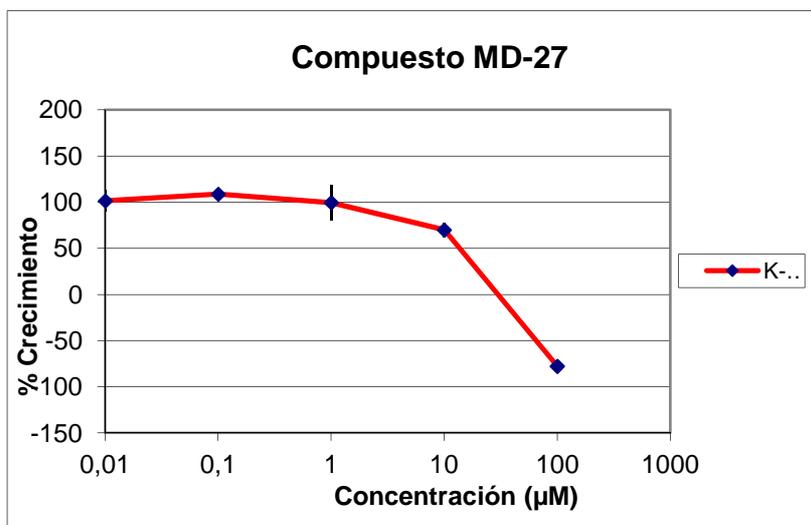
En el caso de los estudios de la apoptosis y del ciclo celular, al tratarse de muestras pequeñas ($n < 10$), no cumplían el requisito de normalidad y se analizaron mediante test no paramétricos. Para analizar las muestras independientes se utilizó el test estadístico U de Mann-Whitney mediante el paquete estadístico R 64 3.0.2. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

IV. RESULTADOS.

1. Resultados de citotoxicidad.

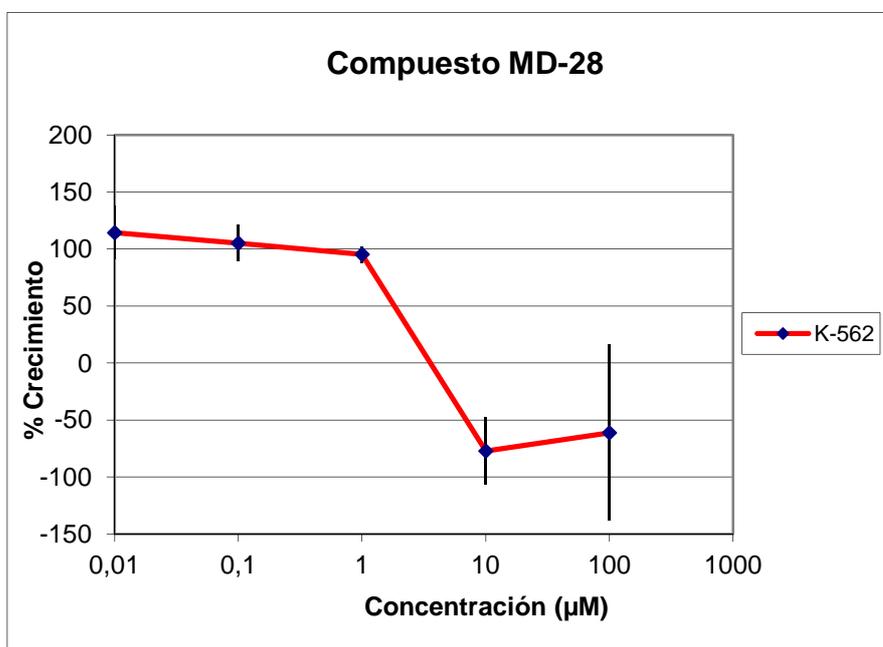
Se realizaron ensayos in vitro con 6 compuestos selenados con urea en la línea celular K-562 de leucemia mieloide crónica, con el fin de evaluar su citotoxicidad. Para medir la capacidad de inhibición del crecimiento celular de estos compuestos se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad basados en ensayos colorimétricos cuantificables con MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]. Las células se cultivaron con los compuestos durante 72 horas y a continuación se determinó la viabilidad celular mediante cuantificación de la absorbancia del formazán, medida a 550 nm. La absorbancia es directamente proporcional al número de células viables. Los resultados se expresaron como GI₅₀ (concentración de producto que provoca la inhibición del 50% del crecimiento celular), TGI (concentración del compuesto que inhibe totalmente el crecimiento celular) y LC₅₀ (concentración que mata el 50% de las células). Estos parámetros se extrapolaron de las curvas de dosis respuesta.

Los resultados se muestran en las figuras 10-15 en forma de curva dosis respuesta. En el eje de abscisas se representa la concentración del compuesto y en el eje de ordenadas el porcentaje de crecimiento. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de crecimiento \pm SD obtenidos de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.



GI50 (μM)	22,19
TGI (μM)	52,71
LC50 (μM)	83,22

Figura 10. Curva dosis respuesta del compuesto selenado MD-27 en la línea celular K-562 y parámetros citotóxicos.



GI50 (μM)	3,37
TGI (μM)	5,97
LC50 (μM)	8,58

Figura 11. Curva dosis respuesta del compuesto selenado MD-28 en la línea celular K-562 y parámetros citotóxicos

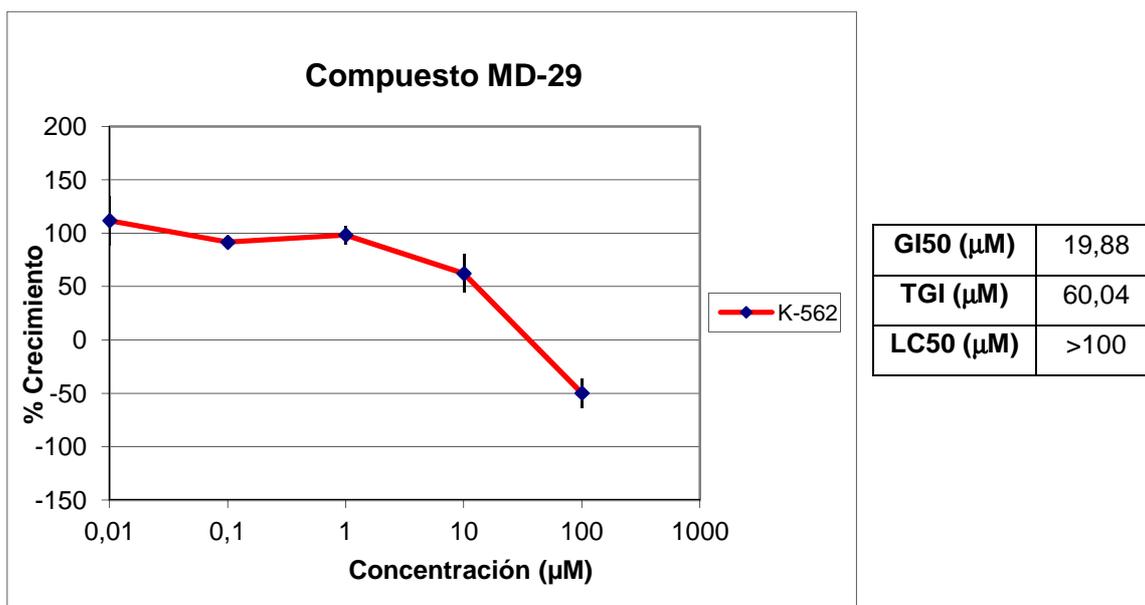


Figura 12. Curva dosis respuesta del compuesto selenado MD-29 en la línea celular K-562 y parámetros citotóxicos.

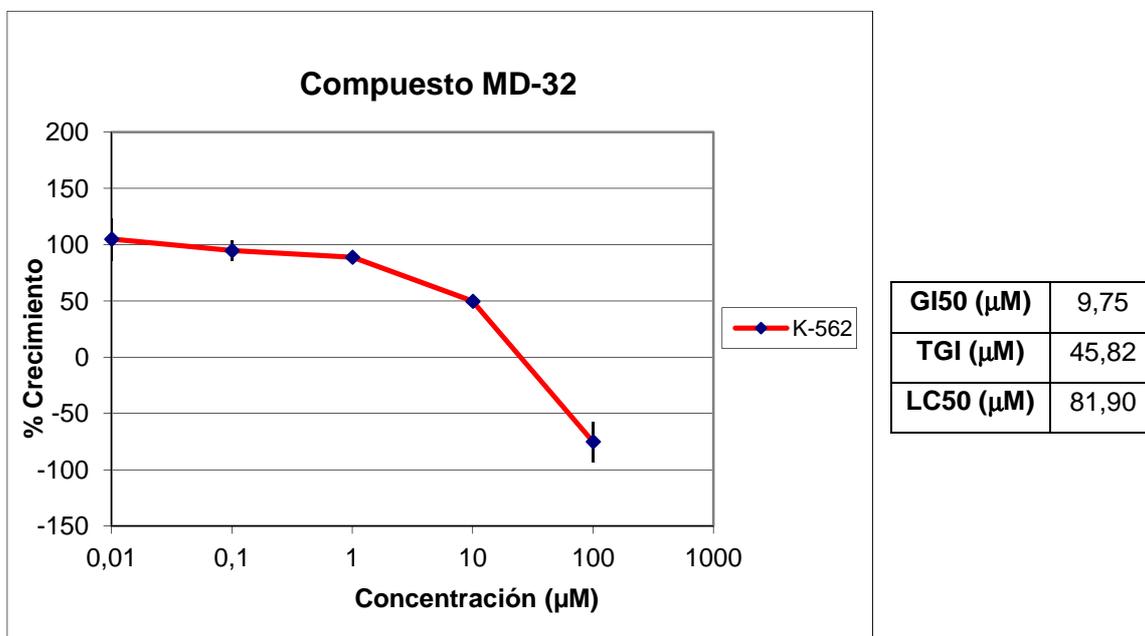
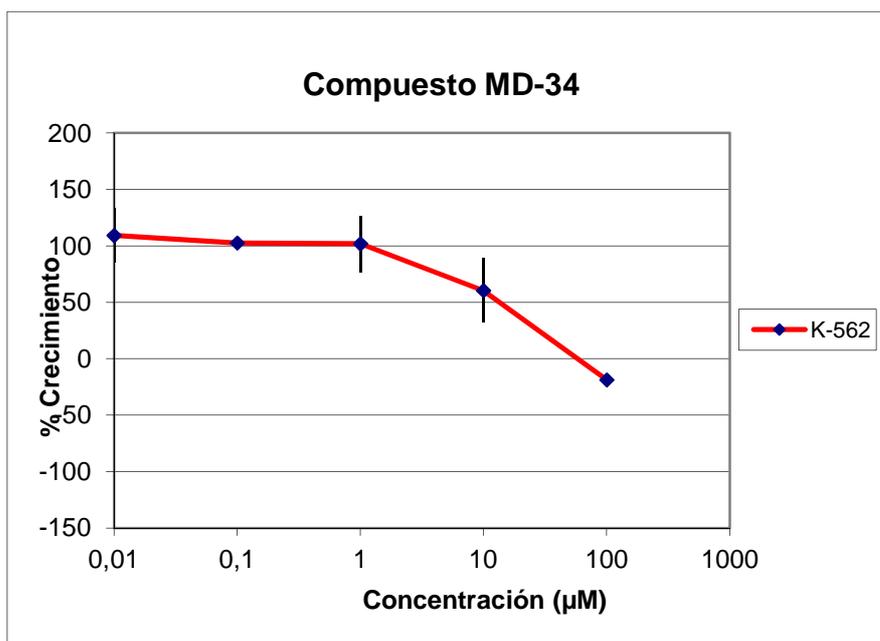
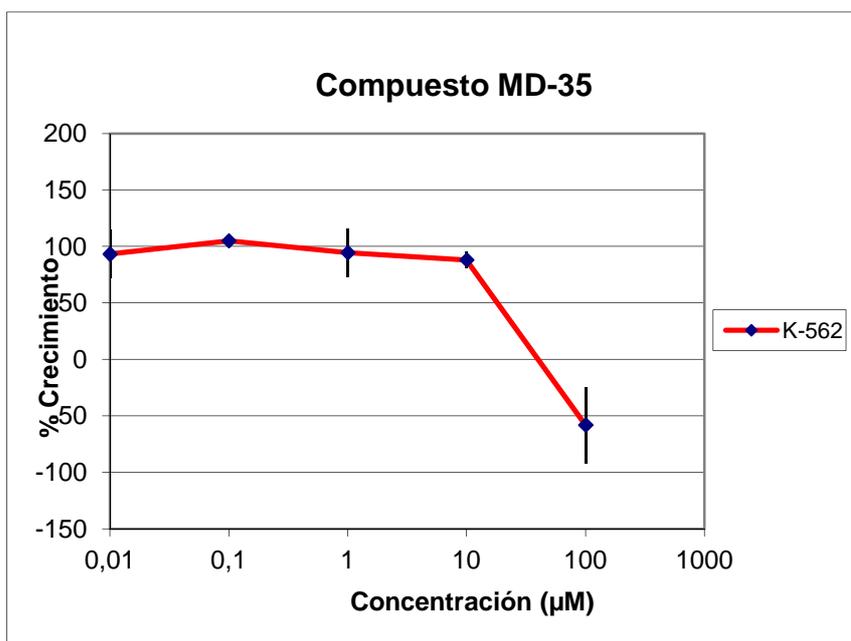


Figura 13. Curva dosis respuesta del compuesto selenado MD-32 en la línea celular K-562 y parámetros citotóxicos.



GI50 (μM)	21,78
TGI (μM)	78,71
LC50 (μM)	>100

Figura 14. Curva dosis respuesta del compuesto selenado MD-34 en la línea celular K-562 y parámetros citotóxicos.



GI50 (μM)	33,33
TGI (μM)	64,12
LC50 (μM)	94,91

Figura 15. Curva dosis respuesta del compuesto selenado MD-35 en la línea celular K-562 y parámetros citotóxicos.

Los gráficos muestran una relación inversamente proporcional entre la concentración de compuesto y el porcentaje de crecimiento celular. Se observa que a mayor concentración de compuesto menor es el porcentaje de crecimiento. Todos los compuestos presentan un mayor o menor grado de inhibición del crecimiento, pero el MD-28 parece ser el más potente, con una GI_{50} de 3,37 μ M, TGI de 5,97 μ M y con una LC_{50} de 8,85 μ M. el MD-32 también presenta buenos resultados de citotoxicidad con una GI_{50} menor de 10 μ M. MD-27, MD-29, MD-34 y MD-35 tienen parámetros de citotoxicidad más elevados y similares entre ellos, requiriendo mayor concentración para ejercer inhibición.

Los parámetros de citotoxicidad de los 6 compuestos se resumen en la siguiente tabla, en la que también se exponen los resultados obtenidos con los mismos compuestos en la línea celular CCRF-CEM, ensayados anteriormente por este grupo de investigación.

COMPUESTO	PARÁMETRO CITOTÓXICO	K-562	CCRF-CEM
MD-27	GI50 (μM)	22,19	6,9
	TGI (μM)	52,71	40,88
	LC50 (μM)	83,22	77,2
MD-28	GI50 (μM)	3,37	14,03
	TGI (μM)	5,97	48,61
	LC50 (μM)	8,58	83,19
MD-29	GI50 (μM)	19,88	2,99
	TGI (μM)	60,04	5,6
	LC50 (μM)	>100	8,21
MD-32	GI50 (μM)	9,75	6,67
	TGI (μM)	45,82	32,52
	LC50 (μM)	81,9	65,77
MD-34	GI50 (μM)	21,78	3,8
	TGI (μM)	78,71	9,94
	LC50 (μM)	>100	58,24
MD-35	GI50 (μM)	33,33	5,67
	TGI (μM)	64,12	33,8
	LC50 (μM)	94,91	66,06

Tabla 3. Parámetros citotóxicos de los compuestos selenados en las líneas celulares K-562 y CCRF-CEM.

Como muestra la tabla 3 los compuestos ensayados son más citotóxicos para la línea celular CCRF-CEM que para la K-562, obteniendo inhibición del crecimiento a concentraciones de producto mucho más bajas, excepto en el caso del MD-28, que ofrece mejores resultados en las K-562. En el caso de las CCRF-CEM el compuesto que resulta activo a una menor concentración es el MD-29, con unos parámetros citotóxicos menores de 10 μM , y el menos efectivo es el MD-28.

2. Capacidad de inducir apoptosis.

Dado que hay evidencias de que la apoptosis es un mecanismo crítico en la prevención del cáncer por los compuestos selenados, se estudió la capacidad de estos productos para inducir apoptosis en células CCRF-CEM de leucemia linfoblástica.

En el presente trabajo, se analizó si el compuesto MD-35 ejercía su efecto citotóxico mediante la inducción de la muerte celular programada en las células CCRF-CEM. Nota: en los ensayos de citotoxicidad se encontraron compuestos con resultados más prometedores (MD-29 y MD-34), sin embargo, ya fueron probados previamente por este grupo de investigación.

La cuantificación de la apoptosis se llevó a cabo por citometría de flujo, siguiendo la translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática con el *Annexin V-FITC kit (BD Pharmingen)*. Se cultivaron las células con concentraciones de producto de 2, 10, 20 y 40 μM durante 24 horas de tratamiento. Se utilizó camptotecina como control positivo y al cultivo control no se le añadió nada. El análisis de los cultivos celulares mediante citometría de flujo permite diferenciar entre las células viables (cuadrante A3, negativas para anexina y PI), las células apoptóticas (las del cuadrante A4, positivas para anexina, son las apoptóticas tempranas y las del A2, positivas para anexina e IP, las apoptóticas tardías) y las células que mueren por necrosis (cuadrante A1, positivas para IP y negativas para anexina). En la figura 15 se muestran los resultados de un experimento representativo.

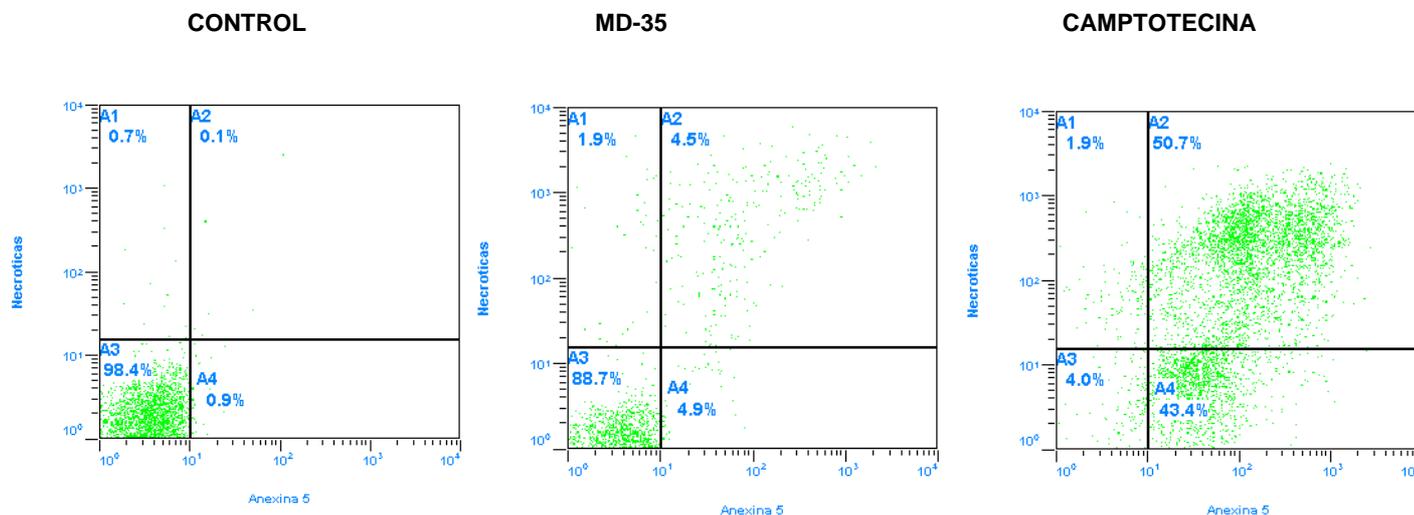


Figura 15. Experimento representativo de los ensayos de apoptosis analizados mediante citometría de flujo utilizando el kit *Annexin V-FITC kit*. En los gráficos se representa la anexina en el eje x y el IP en el eje y. El cuadrante A1 contiene las células necróticas, el A2 las apoptóticas tempranas, el A3 las células intactas y el A4 las apoptóticas tardías. El primer gráfico corresponde a un experimento control, el segundo a un cultivo tratado con el compuesto MD-35 y el tercero se trata de un control positivo con camptotecina.

Como muestra la figura 16, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con MD-35 y las células control en lo que se refiere a la capacidad de inducir apoptosis. Las distintas concentraciones del tratamiento fueron comparadas con sus respectivos controles, hallándose en todos los casos p mayores de 0.05. Por tanto, estos experimentos parecen sugerir que el compuesto MD-35 en concreto, no produce la muerte celular por inducción de apoptosis, debiéndose encontrar detrás de su efecto citotóxico la muerte por necrosis o por otras vías. Al comparar los controles con los cultivos tratados con camptotecina (control positivo) sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

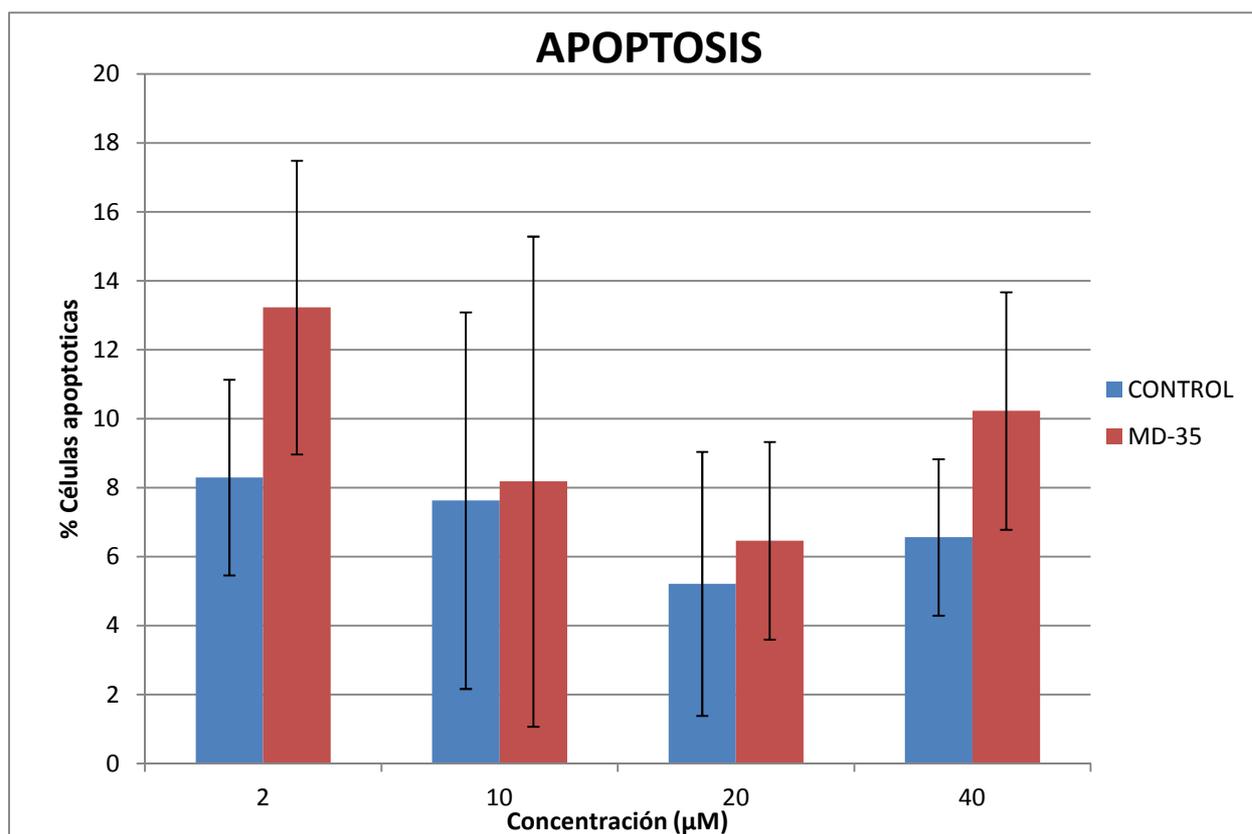


Figura 16. Estudio de la capacidad del compuesto MD-35 de inducir apoptosis en las células CCRF-CEM. En el eje de abscisas se representa la concentración de producto y en el de ordenadas el porcentaje de crecimiento celular. Los resultados se expresan como la media del porcentaje de células apoptóticas \pm SD de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Para cada concentración se incubaron las células con la cantidad correspondiente de compuesto o de control durante 24 horas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

3. Efectos sobre el ciclo celular.

Múltiples drogas anticancerígenas ejercen su efecto a través de un arresto del ciclo celular en alguna de sus fases. Para comprobar si los compuestos selenados actúan a este nivel, se realizó un análisis del número de células presentes en cada fase del ciclo en ausencia y en presencia de estos compuestos.

La distribución de las células entre las diferentes fases del ciclo celular en los cultivos se determinó cuantificando el contenido de DNA de las células por citometría de flujo con yoduro de propidio (*Sigma*), tal y como se indica en el apartado de material y métodos. Las células en fase G0/G1 tienen una cantidad de DNA 1X, las que se encuentran en fase S tienen una cantidad entre 1X y 2X y las que se encuentren en G2/M tienen 2X.

Al igual que en el estudio de la apoptosis, se ensayó el compuesto MD-35 en la línea celular CCRF-CEM. Se trataron las células con concentraciones de producto de 2, 10, 20 y 40 μM durante 24 horas y se midió el porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo. Se realizaron tres experimentos independientes y en ellos se analizó cada concentración por duplicado. Como control positivo se realizó un cultivo de CCRF-CEM en presencia de camptotecina y como control negativo se incubaron las células con el medio de cultivo habitual. En la figura 17 se muestra un experimento representativo de los efectos de los compuestos selenados sobre la distribución de las células CCRF-CEM en las distintas fases del ciclo.

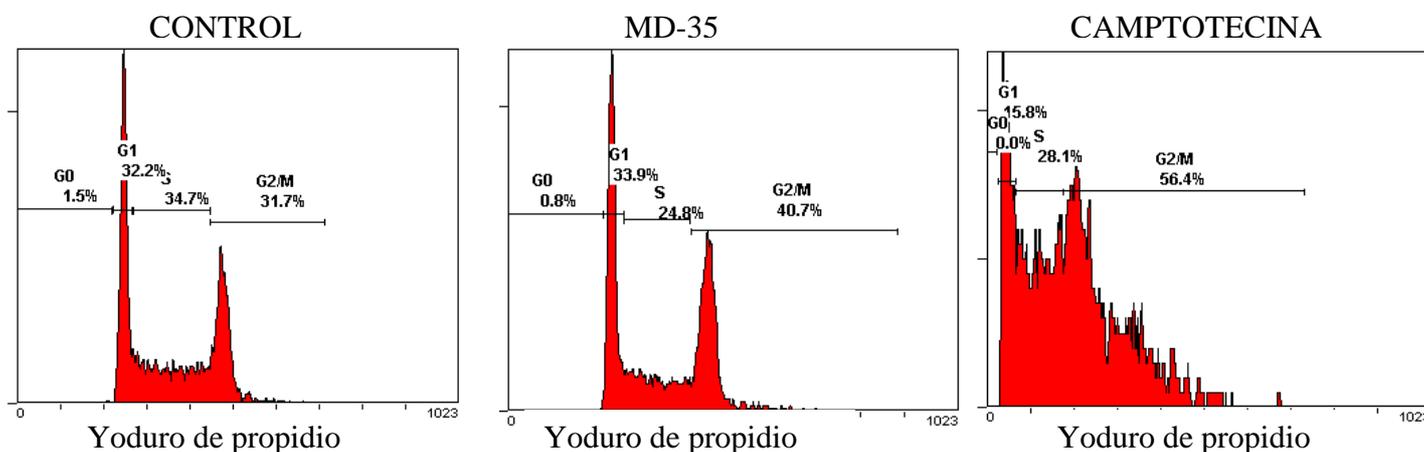


Figura 17. Efecto del compuesto selenado MD-35 sobre la distribución de las fases del ciclo celular en células CCRF-CEM. Las células se cultivaron durante 24 horas en presencia o en ausencia (control) de MD-35 a concentraciones de 2, 10, 20 y 40 μM . Se utilizó camptotecina como control positivo. En el eje de abscisas se representa la cantidad de IP, que es proporcional al contenido de DNA celular, y en el eje de ordenadas se representa el número de células. La figura muestra los resultados de un experimento representativo.

Como muestra la figura 18, se comparó la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular entre los cultivos control y los cultivos tratados con MD-35 y no se observan diferencias estadísticamente significativas, lo cual nos indica que este compuesto selenado no ejerce su efecto citotóxico a través de un arresto del ciclo en alguna de sus fases. Sin embargo, al comparar los controles con las células tratadas con camptotecina se observa una alteración completa de la distribución celular.

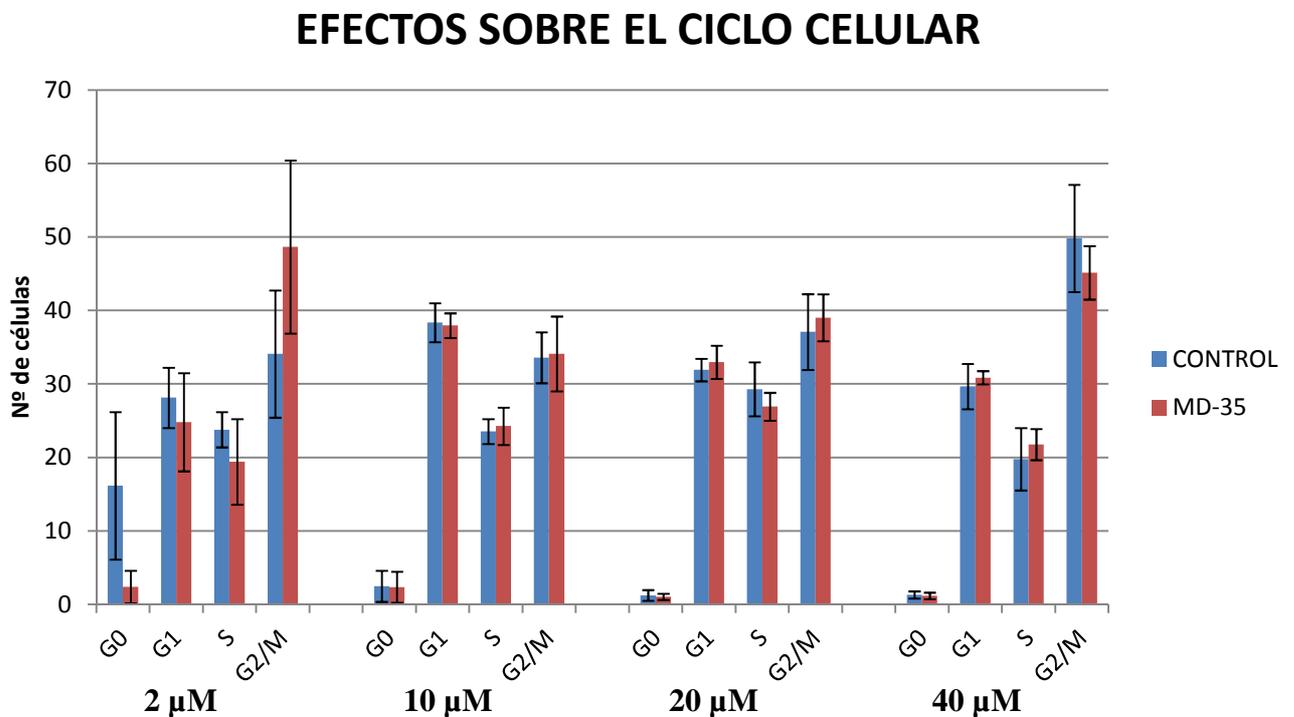


Figura 18. Efectos del compuesto MD-35 sobre el ciclo celular de la línea CCRF-CEM. En el eje de abscisas se muestran las fases del ciclo para cada concentración de producto. En el eje de ordenadas se expresa el número de células por cada una de las fases. Los resultados se expresan como la media de tres experimentos independientes realizados por duplicado \pm SD. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de células en cada fase en los cultivos control y en los cultivos tratados con el compuesto en estudio ($p > 0.05$).

V. DISCUSIÓN.

El selenio es un elemento traza necesario para la salud humana . Es esencial para muchas funciones biológicas, entre ellas formar parte de selenoproteínas indispensables para el funcionamiento del organismo. Además, hay estudios que correlacionan bajos niveles de Se en sangre con mayor probabilidad de padecer algunos tipos de cánceres, lo cual posiciona al Se como un candidato en la prevención y tratamiento del cáncer.

En el presente estudio hemos evaluado la capacidad de inducir citotoxicidad de seis compuestos derivados del selenio en la línea celular K-562 de leucemia mieloide crónica. Los resultados demuestran que todos ellos son citotóxicos en mayor o menor medida. El compuesto más efectivo en cuanto a la reducción del crecimiento celular ha sido el MD-28, con una GI_{50} de 3,37 μ M, TGI de 5,97 μ M y con una LC_{50} de 8,85 μ M. el MD-32 también presenta buenos resultados de citotoxicidad con una GI_{50} menor de 10 μ M. Los otros cuatro compuestos también son capaces de inhibir el crecimiento pero a concentraciones más elevadas de producto, por lo que no serían buenos candidatos para ser utilizados como futuros fármacos antitumorales debido a que a grandes concentraciones matarían a todas las células, tumorales o no tumorales. En otro estudio aún no publicado, realizado por este grupo de investigación, se analizaron los mismos compuestos sobre la línea CCRF-CEM de leucemia linfoblástica aguda de células t, obteniéndose resultados prometedores para los productos MD-29, siendo sus tres parámetros citotóxicos menores de 10 μ M. Los compuestos estudiados parecen ser más tóxicos sobre las células CCRF-CEM, con excepción del MD-28 que resulta más activo en las K-562. Esto está en línea con numerosos estudios que aportan evidencia sobre la inducción de citotoxicidad mediada por compuestos selenados de diversa estructura química en células tumorales de leucemia y de otros tipos de cáncer [19, 34-37].

Por otro lado, hay estudios que demuestran que ciertos compuestos selenados inducen citotoxicidad por medio de la inducción de apoptosis en las células tumorales [19, 21, 22, 39, 40]. Por ello, en este trabajo se ha estudiado la capacidad del compuesto MD-35 de producir la inhibición del crecimiento celular de la línea CCRF-CEM de leucemia linfoblástica por esta inducción de la muerte celular programada. Sin embargo, al comparar las células cultivadas con dicho compuesto y los cultivos control, no se han obtenido diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de células apoptóticas de ambos grupos para ninguna de las concentraciones ensayadas. Esto podría indicar que este producto derivado del selenio podría ejercer su efecto citotóxico por medio de otra vía de muerte o que su capacidad para producir la inhibición del crecimiento sea dependiente del tiempo. Harían falta más estudios para comprobar si aumentando el tiempo de cultivo se observa un aumento de las células apoptóticas en el cultivo tratado con MD-35 y poder observar si es un efecto dependiente de la concentración de producto. Otra posibilidad que cabe, es el hecho de tener un pequeño tamaño muestral que pueda estar disminuyendo la potencia del estudio. De hecho, el coeficiente de variación de los experimentos ha sido muy elevado. Habría que aumentar las repeticiones de cada ensayo para corregir este aspecto, aumentar el número de muestra y hacer el estudio más potente, de esta manera si hay diferencias significativas seremos capaces de detectarlas.

Por último, otro de los aspectos que se ha estudiado ha sido el efecto que causa el MD-35 sobre la progresión del ciclo de las células CCRF-CEM. Hay trabajos [22, 39, 40] que indican que el arresto del ciclo celular es una de las dianas de muchas drogas anticancerígenas. Sin embargo, en este trabajo no se han observado cambios en la distribución de las células en las distintas fases del ciclo para ninguna de las concentraciones de producto probadas. Al igual que ocurre con los estudios de apoptosis, puede ser porque el tiempo de cultivo no haya sido el suficiente o porque el tamaño muestral sea escaso. Harían falta más estudios para comprobar que este compuesto realmente no produce el arresto del ciclo celular en ninguna de sus fases, lo que sugiere que su efecto no es específico de ninguna de las fases.

Como ya se ha comentado anteriormente, la leucemia, y el cáncer en general, es una enfermedad de gran incidencia y repercusión en la sociedad actual y es muy importante el desarrollo de nuevos fármacos cada vez más específicos que actúen selectivamente sobre las células tumorales. Por ello, es vital que se siga invirtiendo esfuerzo en su investigación.

Tal y como demuestran nuestros estudios y otros muchos trabajos de investigación, algunos de estos compuestos presentan resultados prometedores en los ensayos de citotoxicidad, por lo que sería interesante seguir estudiándolos a fondo para mejorar los aspectos ya comentados y profundizar más en sus mecanismos de acción. Por otra parte, también resultaría interesante evaluar la especificidad y selectividad de aquellos compuestos que presenten mejores resultados en células tumorales, ya que lo interesante sería que afecten a las células malignas a muy baja concentración y requieran una concentración mucho más alta para afectar a las células sanas.

Estos estudios *in vitro* tan solo sirven como screening inicial, pero son necesarios para ir descartando compuestos y en un futuro poder llegar a evaluar en ensayos clínicos con pacientes tan sólo aquellos que ofrezcan los mejores resultados antitumorales y a la vez sean más selectivos, minimizando los efectos sobre las células sanas.

VI. CONCLUSIONES.

1. Se han evaluado los efectos de seis diseleniuros con urea sobre la línea celular K-562 de leucemia mieloide aguda. Los seis compuestos evaluados poseen actividad citotóxica en mayor o menor medida, con valores de GI50 que van desde 3,37 hasta 33,3 μM , de TGI entre 5,97 y 78,71 μM y de LC50 desde 8,58 hasta más de 100 μM .
2. De los seis compuestos evaluados el MD-28 es el que mayor citotoxicidad causa sobre esta línea, siendo el MD-34 el que peores resultados ofrece, requiriendo una concentración mayor para ejercer su efecto.
3. Por otra parte, se ha estudiado la capacidad de inducir apoptosis del compuesto MD-35 sobre la línea celular CCRF-CEM de leucemia linfoblástica de células t. No se ha podido demostrar inducción de apoptosis para ninguna de las concentraciones ensayadas.
4. Tampoco se ha podido demostrar el arresto del ciclo celular en ninguna de sus fases al cultivar las células CCRF-CEM en presencia de MD-35 a distintas concentraciones.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. The Merck manual, 2010. Consultado en mayo de 2014.
2. National Cancer Institute. Consultado en mayo de 2014.
3. Cancer.net. Consultado en mayo de 2014.
4. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol.* 2012 Nov; 87(11):1037-45.
5. Asociación Española contra el cáncer. Consultado en junio de 2014.
6. Cancer.org. Consultado en junio de 2014.
7. Borawska MN, Socha K., Lazarczyk B, Czyzewska E, Markiewicz R, Darewicz B. The effects of diet on selenium concentration in serum in patients with cancer. *Nutr. Cancer* 2009, 61: 629-633.
8. López-Fontana CM, Pérez Elizalde RF, Vanrell MC, Recalde GM, Uvilla AL, López Laur, JD. Relation between selenium plasma levels and different prostatic pathologies. *Actas Urol. Esp.* 2010, 34: 625-629.
9. Stevens J, Waters R, Sieniawska C, Kassam S, Montoto S, Fitzgibbon J, Rohatiner A, Lister A, Joel S. *Br.J.* Serum selenium concentration at diagnosis and outcome in patients with haematological malignancies. *Haematol.* 2011, 154: 448-456.
10. Fairweather-Tait S, Hurst R. Plasma selenium concentration and prostate cancer risk: effects are dependent on the level of exposure. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009, 89: 927-928.
11. Penney KL, Schumacher FR, Li H, Kraft P, Morris JS, Kurth T, Mucci LA, Hunter DJ, Kantoff PW, Stampfer MJ, Ma, J. A large prospective study of SEP15 genetic variation, interaction with plasma selenium levels, and prostate cancer risk and survival. *Cancer Prev. Res.* 2010, 3: 604-610.
12. Chan JM, Oh WK, Xie W, Regan MM, Stampfer MJ, King IB, Abe M, Kantoff P.W. Plasma selenium, manganese, superoxide dismutase, and intermediate- or high-risk prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27: 3577-3583.

13. Zhou L, Huang Y, Wang Z, Ye L, Hou W, Yang K. Serum and lung tissue selenium measurements in subjects with lung cancer from Xuanwei, China. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2011, 14: 39-42.
14. Narayanan, B.A. Chemopreventive agents alters global gene expression pattern: Predicting their mode of action and targets. *Current Cancer Drug Targets* 2006, 6: 711-727.
15. Rooprai HK, Kyriazis I, Nuttall RK, Edwards DR, Zicha D, Aubyn D, Davies D, Gullan R, Pilkington GJ. Inhibition of invasion and induction of apoptosis by selenium in human malignant brain tumour cells in vitro. *Int. J. Oncol.*, 2007, 30: 1263-1271.
16. Asfour IA, El-Kholy NM, Ayoub MS, Ahmed, MB, Bakarman AA. "Selenium and glutathione peroxidase status in adult Egyptian patients with acute myeloid leukemia". *Biol. Trace Elem. Res.* 2009, 132: 85-92.
17. Brozmanová J. Selenium and câncer: from prevention to treatment. *Klin. Onkol.* 2011, 24, 171-179.
18. Taskin E, Dursun N. The protection of selenium on adriamycin-induced mitochondrial damage in rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 2012, 147(1-3):165-71
19. Valdíglesias V, Pasaro E, Mendez J, Laffon B. In vitro evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Archives of Toxicology*. 2010; 84(5):337-51.
20. Burk RF, Hill KE. Selenoproteins P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr.* 2005, 25:215–235.
21. Sanmartin C, Plano D, Palop JA. Selenium compounds and apoptotic modulation: A new perspective in cancer therapy. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2008; 8(10):1020-31.
22. Zeng H, Wu M, Botnen, JH. Methylselenol, a selenium metabolite, induces cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis via extracellular-regulated kinase 1/2 pathway and other cancer signalling genes. *J. Nutr.* 2009, 139: 1613-1618.
23. Zeng H, Briske-Anderson M, Wu M, Moyer MP. Methylselenol, a selenium metabolite, plays common and different roles in cancerous colon HCT116 cell and noncancerous NCM460 colon cell proliferation. *Nutr. Cancer* 2012, 64(1):128-35.

24. Pinto JT, Lee JI, Sinha R, MacEwan ME, Cooper AJ. Chemopreventive mechanisms of α -keto acid metabolites of naturally occurring organoselenium compounds. *Amino Acids* 2011, 41: 29-41.
25. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev.* 1993 Apr; 14(2):133-51.
26. Korsmeyer SI. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulator of cell death. *Blood* 1992; 80:879.
27. Arango MC, Llanes I, Diaz t, Faxas ME. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. *Rev Cubana Oncol* 1997; 13(2):126-134.
28. Cascales M. Bases moleculares de la apoptosis. *Anal. Real Acad. Nal. Farm.,* 2003, 69.
29. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008 Oct 20; 27(48):6194-206.
30. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12; 407(6805):770-6.
31. Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X. c-FLIP (L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 2002 Jul 15; 21(14):3704-14.
32. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cáncer. *Cell Prolif.* 2003 Jun; 36(3):131-49.
33. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development.* 2013 Aug; 140(15):3079-93.
34. Plano D, Sanmartin C, Moreno E, Prior C, Calvo A, Palop JA. Novel potent organoselenium compounds as cytotoxic agents in prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2007; 17(24):6853-9.
35. Plano D, Moreno E, Font M, Encio I, Antonio Palop J, Sanmartin C. Synthesis and in vitro Anticancer Activities of some Selenadiazole Derivatives. *Archiv Der Pharmazie.* 2010; 343(11-12):680-91.

36. Mauro MO, Sartori D, Oliveira RJ, Ishii PL, Mantovani MS, Ribeiro LR. Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011; 715(1-2):7-12.
37. Ibanez E, Plano D, Font M, Calvo A, Prior C, Antonio Palop J, et al. Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio- and alkylseleno-imidocarbamates. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; 46(1):265-74.
38. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65(1-2):55-63.
39. Philchenkov A, Zavelevich M, Khranovskaya N, Surai P. Comparative analysis of apoptosis induction by selenium compounds in human lymphoblastic leukemia MT-4 cells. *Exp Oncol*. 2007 Dec; 29(4):257-61.
40. An JJ, Shi KJ, Wei W, Hua FY, Ci YL, Jiang Q, Li F, Wu P, Hui KY, Yang Y, Xu CM. The ROS/JNK/ATF2 pathway mediates selenite-induced leukemia NB4 cell cycle arrest and apoptosis in vitro and in vivo. *Cell Death Dis*. 2013 Dec 19; 4.